

А.А. НЕЙФАХ
М.Я. ТИМОФЕЕВА

МОЛЕКУЛЯРНАЯ
БИОЛОГИЯ
ПРОЦЕССОВ
РАЗВИТИЯ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н. К. КОЛЬЦОВА
НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ПРОБЛЕМЕ
«ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ
И УПРАВЛЕНИЯ ПРОЦЕССАМИ ОНТОГЕНЕЗА»

А. А. НЕЙФАХ, М. Я. ТИМОФЕЕВА

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ ПРОЦЕССОВ РАЗВИТИЯ



МОСКВА, 1977

Нейфах А. А., Тимофеева М. Я. **Молекулярная биология процессов развития.** М., «Наука», 1977, 312 с.

Книга представляет собой полную сводку современных знаний о молекулярных основах процессов развития. В ней рассматриваются изменения содержания, состава и скорости синтеза ДНК, РНК и белков на двух основных этапах развития — оогенеза и эмбриогенеза.

Книга предназначена для специалистов по молекулярной биологии и биологии развития, для биологов смежных специальностей, а также для аспирантов и студентов университетов.

Табл. 7, ил. 74, список лит.— на 21 с.

Ответственный редактор
член-корреспондент АН СССР
Г. П. ГЕОРГИЕВ

Классическая молекулярная биология уже давно покинула тесную для нее оболочку кишечной палочки и ищет для себя новых, более сложных систем в клетках эукариот. Развитие организма, дифференцировка клеток оказались одними из первых важных особенностей нового круга объектов. И если первоочередной задачей молекулярной биологии в настоящее время является исследование регуляции функции генов, то основными объектами этих исследований стали дифференцирующиеся клетки и весь развивающийся многоклеточный организм.

У эмбриолога нет пока оснований утверждать, что основные проблемы развития на клеточном уровне решены и новый подход к исследованию развития на молекулярном уровне является следующим продиктованным логикой исследования шагом. Скорее дело обстоит наоборот. Прогресс в наших знаниях о механизмах развития был не слишком велик не потому, что исчерпался предмет исследования, и не потому, что истощились возможности уже испытанных подходов. В последние десятилетия возникли такие новые экспериментальные приемы, как трансплантация ядер, гибридизация соматических клеток, клонирование недифференцированных клеток, которые уже дали и несомненно еще дадут существенные результаты. Однако попытка воспользоваться успехами молекулярной биологии для решения эмбриологических проблем — не только дань моде.

Сейчас кажется более перспективным не обычный путь исследования — от казалось бы более доступного уровня — организма, клетки к более глубокому — внутриклеточным структурам и молекулам, т. е. от следствия к первопричинам. Естественнее рассматривать развитие как реализацию генетической информации, попытаться проследить ее шаг за шагом от причин к следствиям, от ДНК через РНК к белку и уже после этого к свойствам клеток и органов. Такой подход также не обещает легких решений. Даже преодолев молекулярный этап и решив его главные проблемы: каков механизм дифференциальной активности генов у эукариот и почему в разных частях зародыша синтезируются именно эти, а не другие белки, — мы окажемся перед двумя другими порогами. Первый из них — как от набора белков перейти к свойствам и поведению клетки, второй — как от свойств клеток перейти к образованию тканей и органов. Но, может быть, именно неисчерпаемость предмета выдвигает его сейчас в число главных биологических проблем и привлекает к нему новые силы.

Было бы неверным понимать название этой книги буквально, т. е. так, как будто в ней действительно раскрываются молекулярные механизмы процессов развития. В этой книге мы ограничились в основном описательным этапом и перечислением того, что сейчас известно о том, когда и какие виды макромолекул синтезируются в ооцитах и эмбриональных клетках трех — пяти видов животных, оказавшихся более удобными для исследования. Поэтому наша монография является просто сводкой современной литературы по предмету, хотя и не может не отражать интересов и склонностей авторов. Ее задача — ввести и эмбриологов и молекулярных биологов в смежную, общую для них область — молекулярную биологию развития.

Нам хотелось также несколько расширить круг потенциальных читателей и включить в него прежде всего студентов университетов — биохимиков и эмбриологов, лишенных пока специального руководства. Чтобы облегчить понимание книги широкому кругу биологов и вместе с тем сохранить профессиональный уровень изложения, небольшое место мы уделили двум популярным введениям. Первое из них вводит молекулярного биолога, биохимика или химика в предмет и проблемы биологии развития и знакомит его с основной терминологией, зачастую отпугивающей неспециалиста. Во втором введении, предназначенном для эмбриологов, речь идет об основах молекулярной биологии сегодняшнего дня и о ее методах. Эти введения делают, как нам кажется, настоящую книгу доступной для широкого круга читателей.

Очевидно, что понимание молекулярных основ процессов развития возможно не тогда, когда будут перечислены и описаны все процессы, происходящие на молекулярном уровне на разных стадиях развития. Для действительного понимания существа явлений необходимо знать механизмы регуляции, осуществляемые на разных уровнях реализации генетической информации и в различных развивающихся системах — в оогенезе, в эмбриональных клетках и в узко специализирующихся тканях. Этому предмету — регуляции в молекулярной биологии развития — посвящена наша следующая книга, являющаяся естественным продолжением этой.

ВВЕДЕНИЕ В ЭМБРИОЛОГИЮ

ПРИНЦИПЫ РАЗВИТИЯ

Размножение — одно из основных и наиболее специфических свойств жизни. Обычно оно состоит не только в воспроизведении себе подобных, но и связано с половым процессом — обменом генетической информацией между членами популяции организмов. Эти процессы — и обмен генами, и собственно размножение — происходят и у одноклеточных и у многоклеточных, но значительно различаются у этих двух групп организмов.

Собственно размножение у одноклеточных состоит, как правило, в простом делении клеток. При делении структура клетки нарушается незначительно, и сразу после деления дочерние организмы отличаются от материнской клетки чаще всего только размерами. У наиболее сложно устроенных одноклеточных — инфузорий, — которые имеют оформленное ядро и хромосомный аппарат, делению предшествует не только удвоение числа хромосом, но и удвоение некоторых «уникальных» цитоплазматических структур, таких, например, как ротовой аппарат. Эти процессы можно рассматривать как элементы развития или дифференцировки. Размножение у некоторых сложных одноклеточных водорослей, таких как ацетабулярия, больше напоминает онтогенез многоклеточных: зигота растет, образует стебель и затем сложную шляпку, в которой созревают гаметы.

Тем не менее у большинства одноклеточных половой процесс относительно независим от собственно размножения, которое много поколений может происходить чисто вегетативным путем.

У многоклеточных вегетативное размножение существует в основном у неподвижных форм — растений, губок, кишечнополостных. Основной же формой размножения у многоклеточных является половое, когда обмен генетической информацией между членами популяции носит форму оплодотворения и тесно связан с процессом развития. Эволюционно обусловленная необходимость процесса оплодотворения привела к тому, что развитие начинается с относительно автономных половых клеток. Строение гамет должно удовлетворять двум требованиям — обеспечить процесс оплодотворения, т. е. встречу двух гамет и слияние их ядер, и обеспечить процесс развития. В результате этих сложных и в определенной мере противоречивых требований произошло

разделение гамет на два типа — мужские и женские. Женская гамета — яйцо содержит запас питательных веществ, структурную организацию, определяющую ранние стадии развития, оболочки, защищающие зародыша, а также систему, обеспечивающую встречу сперматозоида, объединение его хромосом с хромосомами яйца, ограничение от лишних спермиев, и пусковой механизм, включающий аппарат развития только после оплодотворения.

В зависимости от биологии размножения запас питательных веществ в яйце варьирует очень широко. Их совсем мало в яйцах млекопитающих или насекомых, откладывающих яйца в чужие организмы (например, оса-наездник). Их также мало в яйцах таких организмов, как морской еж, подвижные личинки которого выходят из оболочек на очень ранних стадиях. Специализированных питательных веществ — желтка, состоящего из белков и липидов, очень много в яйцах рыб, амфибий, птиц и рептилий, у которых развитие за счет собственных запасов питательных веществ продолжается долго и приводит к образованию высокоразвитого организма.

Мужские гаметы — сперматозоиды — также являются чрезвычайно высоко специализированными клетками, вся организация которых — ядро, состоящее из хромосом, конденсированных в плотный пакет, и аппарат движения — приспособлена для кратковременного хаотического движения, приводящего к встрече с яйцом.

В ходе развития происходят три тесно связанных, по известной степени самостоятельных процесса — увеличение числа клеток, клеточная дифференцировка или специализация клеток, различная в разных частях зародыша, и морфогенез тканей и органов — создание сложной надклеточной организации. В течение развития зародыш приобретает все большее сходство с родительскими организмами, поскольку в ходе развития происходит постепенная реализация генетической информации, которая в яйце была сосредоточена в хромосомах. Однако сама структура яйца уже является частичным проявлением генетической информации, реализация которой, очевидно, начинается не с момента оплодотворения, а значительно раньше — в ходе образования яйца, т. е. в оогенезе.

ООГЕНЕЗ И СПЕРМАТОГЕНЕЗ

Мужские и женские половые клетки образуются в стенках половых желез и на самых ранних стадиях гаметогенеза почти не отличаются от соседних эпителиальных клеток стенки железы. Однако в действительности будущие половые клетки образуются своим особым путем. Так, у млекопитающих и птиц в ходе раннего эмбрионального развития будущие половые клетки — гаметциты — образуются вне тканей собственно зародыша и на по-

следующих стадиях, когда уже сформирована половая железа, мигрируют в нее по кровеносному руслу. У других животных, например, у дрозофилы, у лягушки или аскариды, гаметоциты возникают из клеток, локализованных в определенных зонах яйца, отличающихся особенностями цитоплазмы. Если эту цитоплазму повредить действием ультрафиолетового излучения, то половые клетки не образуются. Все это как будто бы говорит об особых свойствах половых клеток, отличных от остальных соматических клеток. Вместе с тем в опытах по пересадке ядер у амфибий было достаточно убедительно показано, что ядра соматических клеток, если их пересадить в яйцо, во многих случаях способны обеспечить нормальное развитие. Это противоречие пока не имеет удовлетворительного объяснения. Можно предполагать, что хотя ядра соматических клеток, как правило, сохраняют всю генетическую информацию, особые пути развития половых клеток лучше обеспечивают сохранность их генотипа в ряду клеточных поколений.

Процесс оогенеза сопровождается определенными изменениями в ядре и цитоплазме ооцита. Ядро увеличивается, количество ДНК в нем удваивается, как во всякой клетке в начале делений митоза или мейоза в ядре, обособляются хромосомы. Ядро, таким образом, становится тетраплоидным, но дальнейших фаз мейоза пока не наступит. Формально на протяжении всего оогенеза ядро остается на начальной стадии мейоза, но хромосомы при этом не только не прекращают своей функции транскрипции (как во время митоза и мейоза), а, напротив, резко усиливают ее. У многих животных хромосомы удлиняются, у них образуются многочисленные боковые выросты — петли ДНП, на которых идет активный синтез РНК. Такие хромосомы получили название ламповых щеток. У хвостатых амфибий ламповые щетки и петли на них особенно велики, и это позволило исследовать их индивидуально. Оказалось, что форма и порядок петель строго постоянны и соответствуют определенному генотипу. В тех случаях, когда у животного отсутствует небольшой участок хромосомы, соответствующие петли не образуются. Это позволяет предположить, что каждая петля соответствует одному активному гену или, точнее, участку хромосомы, определяющему функцию одного или нескольких связанных генов. Общее число петель составляет несколько тысяч — число, имеющее тот же порядок, что и число активных генов в оогенезе, определенное методом молекулярной гибридизации.

Кроме ламповых щеток, в ядре ооцитов у большого числа животных образуется множество ядрышек. Они возникают вследствие избирательного синтеза ДНК рибосомальных генов — амплификации рДНК.

В цитоплазме ооцитов накапливаются продукты деятельности ядра — информационные, рибосомные и транспортные РНК; некоторые из них частично используются для синтеза белка в оогенезе, но значительная часть сохраняется до начала эмбриональ-

ного развития. На протяжении оогенеза различают периоды «малого роста» и «большого роста». Во время «большого роста» в ооцит из материнского организма поступает особый белок — вителлогенин, который откладывается в цитоплазме в виде гранул желтка.

У некоторых видов ооцит растет вне связи с соседними клетками, но обычно он окружен слоем фолликулярных клеток, которые, очевидно, способствуют его росту. Наконец, в ряде случаев, например у насекомых, растущий ооцит специально связан с несколькими соседними так называемыми питающими клетками, и в этом случае в него поступают РНК и белки, синтезированные в этих клетках.

В конце роста ооцита происходит его созревание — под влиянием гормонов гипофиза и через посредство гормонов, образующихся в фолликулярных клетках, в нем происходит ряд процессов: ламповые щетки уменьшаются в размерах, синтезы в ядре прекращаются, само ядро — зародышевый пузырек — разрывается и его содержимое смешивается с цитоплазмой. Хромосомы оказываются у поверхности яйца, где они проходят фазы мейоза, начатого еще в раннем оогенезе. Яйца отделяются от фолликулярных клеток, поступают в яйцеводы и в таком виде готовы к оплодотворению.

Образование сперматозоидов начинается с делений мейоза, в результате которых из сперматогонии образуются четыре сперматоцита. Далее наступает процесс завершения сперматогенеза — спермиогенез. Синтезы в ядре прекращаются, само ядро конденсируется и содержащиеся в нем гистоны замещаются особыми богатыми аргинином гистонами или еще более примитивными основными белками — протаминами. В цитоплазме в результате ряда преобразований митохондрий и аппарата Гольджи образуются структуры сперматозоида — акросома (в передней части головки), шейка и хвост. Характерно, что все эти сложные преобразования происходят без непосредственного контроля со стороны ядра, гены которого после мейоза совершенно не активны. Более того, на дрозофиле показано, что многие гены, контролирующие спермиогенез, локализованы в Y-хромосоме, которая в результате мейоза попадает только в половину сперматид. Таким образом, весь процесс собственно спермиогенеза происходит за счет генетической информации, выданной ядром еще до мейоза, в сперматогониях.

ОПЛОДОТВОРЕНИЕ

Биологический смысл оплодотворения состоит в обмене генетической информацией между членами популяции, который важен не для отдельной особи, а для эволюции популяции в целом. Однако процесс оплодотворения включен в цепь необходимых

процессов развития и, во-первых, обеспечивает восстановление диплоидного набора хромосом, а во-вторых, является обычно пусковым механизмом для начала эмбрионального развития.

В случае физиологической полиспермии в яйцо нормально проникает несколько спермиев, а соединяется с женским ядром — пронуклеусом только один. В этом случае действует неизвестный нам механизм, подавляющий все проникающие в яйцо спермии кроме одного. У животных с моноспермией яйцо имеет приспособления, обеспечивающие проникновение только одного спермия. Для этого служат специальные отверстия в оболочке яйца — микропиле, ограничивающие вхождение спермиев, и поверхностная реакция, отделение яйцевой мембраны, блокирующие вхождение излишних спермиев.

Во многих случаях можно вызвать искусственную активацию яйца или осеменить его спермием с инактивированными (например, радиацией) хромосомами. В таких случаях развивается гаплоидный зародыш, обычно погибающий на поздних стадиях эмбрионального или личиночного развития.

Оплодотворение вызывает не только определенный ряд событий в ядерном аппарате — сближение мужского и женского пронуклеусов, синтез ДНК в них, подготовку и начало делений дробления, но и активрует важные процессы в цитоплазме. Вслед за реакцией поверхностного слоя яйца на сперматозоид (кортикальной реакцией), которая блокирует полиспермию и вызывает отделение яйцевой оболочки, в нем происходят сложные перемещения цитоплазматического материала, получившие название ооплазматической сегрегации. Она состоит в том, что в цитоплазме яйца, в основном в его поверхностных слоях, обособляются и перемещаются различные зоны, в результате чего яйцо приобретает вид более или менее сложной мозаики. В простейших случаях, например в яйцах морского ежа, возникают различия цитоплазмы, направленные вдоль одной оси — от анимального к вегетативному полюсу. В дальнейшем благодаря этим различиям цитоплазма клеток анимальной части яйца отличается от цитоплазмы вегетативной части и происходит дифференцировка зародыша на эктодерму и энтодерму.

У амфибий различия вдоль анимально-вегетативной оси возникают еще в оогенезе и внешне выражаются в большей концентрации и больших размерах желточных гранул на вегетативном полюсе. После оплодотворения у них на одной стороне яйца (будущей спинной) в области экватора образуется так называемый серый серп — зона, материал которой впоследствии образует мезодерму. На вегетативном полюсе у амфибий существует область, которая не имеет внешних отличий, но, как было экспериментально установлено, определяет формирование половых клеток.

У видов с «мозаичным развитием» — червей, моллюсков, асцидий и других, — образуется много (4—8) различных зон,

соответствующих будущим зачаткам зародыша. Оплазматическая сегрегация служит, таким образом, первым механизмом дифференцировки. Она определяется свойствами цитоплазмы яйца, т. е. возникает в результате активности генов, функционировавших в оогенезе. Когда в результате делений дробления одинаковые ядра распределяются по цитоплазме яйца и в образующихся клетках ядра окажутся в различном окружении, очевидно, именно эти отличия определяют их разную функцию. Такими сейчас представляются механизмы первичной дифференцировки зародыша. Ни механизм оплазматической сегрегации, ни природа сегрегируемых веществ, определяющих первичную дифференцировку, пока совершенно неизвестны.

ДЕЛЕНИЯ ДРОБЛЕНИЯ ЯЙЦА

В зависимости от количества желтка в яйцах разных видов меняется и характер дробления. Если желтка совсем мало, то дробление яиц бывает обычно полным и равномерным (морской еж). При большем количестве желтка (амфибии) происходит полное дробление, но неравномерное, и образованные в результате дробления клетки — blastomeres — крупнее на вегетативном полюсе, где больше желтка, и мельче — на анимальном, где его меньше. У костистых рыб желтка еще больше, и, главное, он сконцентрирован на вегетативном полюсе. Дробление таких яиц — неполное: деление происходит только в особом цитоплазматическом бугорке, составляющем $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{10}$ часть всего яйца. Наконец, если желтка еще больше, как это бывает у птиц, рептилий и некоторых видов рыб, дробление является дискоидальным, т. е. происходит только в небольшом диске цитоплазмы на поверхности яйца.

У насекомых (например, дрозофилы) первоначально в центре яйца несколько раз делятся только ядра, затем они мигрируют к поверхности яйца, где продолжают делиться, образуя слой клеток, окружающих все яйцо.

Первые деления дробления обычно синхронны, но затем эта синхронность нарушается. При полном дроблении внутри яйца между blastomeres появляется полость — blastocoel, — и с этого времени эту стадию развития зародыша называют стадией blastuлы. По мере дробления клетки blastuлы становятся все мельче, но внешне они все очень похожи одна на другую, и отличаться могут только по размерам и содержанию желтка. Однако, так как они образовались из различных участков цитоплазмы яйца, они в действительности уже по существу не одинаковы. Отличия эти пока только потенциальные и еще не определяют различное поведение клеток — их форму, направление и характер движений, которые осуществляются на следующих стадиях развития.

У млекопитающих в результате дробления образуется полый клеточный пузырек — бластоцист, лишь внешне напоминающий бластулу. Большая часть его стенок впоследствии образует трофобласт — область контакта со стенкой матки, и лишь небольшая группа клеток — зародышевый узелок — даст начало собственно зародышу.

Благодаря делениям дробления создается ряд условий, необходимых для последующего развития:

1. Образование клеток делает возможным их многообразные перемещения — морфогенетические движения, составляющие основу формообразования. В разных частях зародыша эти движения могут быть различными.

2. Образование клеточных границ фиксирует различия цитоплазмы, созданные оплазматической сегрегацией, и создает клетки с различной цитоплазмой.

3. Увеличение числа ядер увеличивает количество генетического материала в зародыше или, иначе, уменьшает цитоплазматическую территорию вокруг каждого ядра и делает возможным ядерный контроль над этой территорией.

4. Появление многих клеток с собственными ядрами делает возможным включение различных наборов генов в разных клетках, т. е. возможность дифференцировки в различных направлениях.

ГАСТРУЛЯЦИЯ

После образования бластулы следующим процессом развития является гастрюляция, т. е. разделение клеток зародыша на три клеточных пласта — зародышевых листка, — которые путем взаимных перемещений концентрически располагаются один над другим. Снаружи зародыш окружает эктодерма — зачаток эпителия кожи, всей нервной системы, пигментных клеток и некоторых других образований. Под эктодермой располагается мезодерма, из которой впоследствии образуются хорда, скелет, мышцы, соединительная ткань, почки, сердце, сосуды и кровь. Наконец, внутренний листок — энтодерма — образует кишечник и его производные — легкие, печень, поджелудочную железу.

Во время гастрюляции основным отличием клеток, принадлежащих к разным зародышевым листкам, являются их различные морфогенетические движения; характер этих движений различен у разных групп животных. Эктодерма в ходе гастрюляции, как правило, распластывается и, оставаясь на поверхности, стремится окружить весь зародыш. Энтодерма, напротив, свертывается в трубку — первичную кишку. У зародышей морского ежа она вворачивается внутрь полости бластулы. Мезодерма образуется на границе эктодермы и энтодермы и также, вворачиваясь, проникает под эктодерму, отделяя ее от энтодермы. Существенно, что механизм гастрюляции, во многом еще не понятый, состоит

не столько в точном программировании клеточных перемещений, сколько в создании определенных контактных взаимоотношений между клетками разных зародышевых листков. В классических опытах Гольтфредера клетки были диссоциированы — отделены одна от другой, а затем перемешаны и вновь соединены. Через некоторое время, благодаря индивидуальным движениям клеток, клетки эктодермы оказались снаружи, энтодермы — внутри, а мезодермы — между ними. Аналогичные опыты проведены и на зародышах морского ежа.

Клетки зародышевых листков отличаются друг от друга не только различной способностью к морфогенетическим движениям, но и различными потенциями к развитию. Наиболее жестко предопределена (детерминирована) судьба энтодермы — в любых условиях она дифференцируется только в кишечник и его производные. Возможности мезодермы существенно шире, но обычно при изоляции она дифференцируется в зачатки хорды, мышц и т. д. Эктодерма при изоляции образует только эпителий, но способна в соответствующих условиях дифференцироваться в нервную ткань и многие другие ткани.

В классической экспериментальной эмбриологии, или механике развития, принято, говоря об эмбриональной ткани, различать ее проспективную судьбу, т. е. то, чем она должна была бы стать при нормальном развитии, и проспективные потенции — то, чем она может стать в соответствующих условиях. По мере развития происходит постепенное ограничение проспективных потенций и зародыш разделяется на все большее число зачатков, имеющих все более узкие возможности для дальнейшей дифференцировки. В пределе проспективная потенция становится равной проспективной судьбе, т. е. клетки узко специализируются и уже не могут стать ничем, кроме того, чем они стали в нормальном развитии. В ряде случаев такой предел не достигается и клетки или остаются малодифференцированными (стволовые, камбиальные клетки) или, иногда, способны к метаплазии (дедифференцировке и повторной дифференцировке в новом, обычно близком направлении).

Гастрюляцию, во всяком случае у амфибий, принято считать первым проявлением дифференцировки — возникновением различий между прежде сходными клетками бластулы, первым шагом на пути осуществления проспективной судьбы и первым ограничением потенций. Строго говоря, это не совсем так. Уже на стадии бластулы у амфибий клетки энтодермы ограничены в своих потенциях. Наоборот, на стадии гастрюлы клетки, в норме образующие хорду, способны, попав в соответствующее окружение, образовать многие другие ткани зародыша. Сейчас, вероятно, правильнее говорить, что, например, у амфибий на ранней бластуле ядра еще не функционируют и различия между клетками только цитоплазматические. На более же поздних стадиях в разных частях зародыша начинается разная функция ядер, синте-

зируются различные белки, и клетки приобретают новые, различные свойства. Таким образом, различия между зародышевыми листками и сама гастрюляция, очевидно, являются опосредованной через функцию ядер реализацией тех отличий между частями зародыша, которые возникли еще в ходе ооплазматической сегрегации.

Так происходит гастрюляция у амфибий и у некоторых других животных. У морского ежа реальные различия между клетками возникают до гастрюляции, на стадии бластулы. У животных с так называемым мозаичным развитием уже на ранних стадиях различия между группами клеток глубже и они уже со стадий дробления детерминированы, т. е. способны образовывать только определенные органы.

В результате гастрюляции: 1) создается первичный план строения зародыша, во многом, как правило, совпадающий с основным планом строения взрослого организма; 2) перспективные зародышевые листки, раньше граничившие лишь своими краями, теперь существуют реально и приходят в контакт своими поверхностями. Это создает возможность для взаимных влияний, которые служат пусковыми механизмами для дальнейшего развития — возникновения различий между одинаковыми ранее клетками внутри зародышевого листка.

ОРГАНОГЕНЕЗ

Следующей за гастрюлой стадией развития позвоночных является стадия нейрулы. Как указывает само название, в этот период закладывается зачаток нервной системы. У амфибий и примерно также у других позвоночных в эктодерме спины образуются два продольных валика, которые, соединяясь, образуют нервную трубку. Сверху ее покрывает сомкнувшаяся эктодерма, под ней лежит хорда. Передняя часть нервной трубки дифференцируется в головной мозг, остальная — в спинной. Материал нервных валиков образует так называемую эктомезэнхиму, из которой потом дифференцируются, в частности, пигментные клетки.

Как это показал еще в 1918 г. Шпеман, зачаток нервной системы возникает в эктодерме в ответ на индукционное влияние зачатка хордо-мезодермы, т. е. спинной части мезодермы. Эмбриональной индукцией называется контактное влияние одной ткани (индуктора) на другую (индуцируемую), приводящее к новой дифференцировке. На стадии гастрюлы вся эктодерма способна дифференцироваться в нервную ткань и почти вся она приходит в контакт с мезодермой. Однако зачаток мезодермы неоднороден — индуцирующим действием обладает только та его часть, которая гастрюлирует первой и впоследствии образует хорду и мышцы спины. Более того, в пределах этого зачатка передняя часть хордо-мезодермы индуцирует головной мозг, а зад-

няя — спинной мозг. Эти неоднородности в пределах мезодермы создаются еще в процессе ооплазматической сегрегации. В результате гастрულიции определенные участки эктодермы (над хордой) подвергаются несколько различным индуцирующим влияниям вдоль оси голова — хвост.

Таким образом, в результате первичной эмбриональной индукции количество зачатков в зародыше, дифференцирующихся в различных направлениях, значительно возрастает. Природа индуцирующих веществ изучена очень мало, хотя ряд данных позволяет считать, что индукцию нервной системы осуществляют высокомолекулярные вещества белковой природы. Важной особенностью индукции является необходимость компетенции — способности индуцируемой ткани ответить на действие индуктора специфической дифференцировкой. Так, компетенцией к образованию нервной ткани обладает только эктодерма и только на стадиях гастрюлы — ранней нейрулы.

Индукция нервной трубки только первый пример механизма этого рода. На последующих стадиях развития обнаружено много сходных явлений. Так, нервная трубка и хорда на более поздних стадиях развития сами становятся индукторами для окружающих мезенхимных клеток, которые в результате дифференцируются в хрящи позвоночного столба. Зачаток глаза — глазной пузырь — индуцирует в эктодерме образование хрусталика глаза, а весь глаз индуцирует в коже над ним образование роговицы. Сама кожа образуется в результате взаимных индукционных влияний эктодермального эпителия и подкожной мезенхимы.

Значительно меньше известно о других факторах дифференцировки. Так, очевидно, что очень большое место в развитии занимают механизмы, усиливающие небольшие различия вдоль эмбрионального зачатка и приводящие к его разделению на самостоятельные закладки органов. Мезодерма расчленяется на хорду, зачатки мышц, мезенхиму, зачатки почек, сердца, кровяных клеток. Вероятно, благодаря этим же механизмам головной мозг разделяется на самостоятельные, различно и сложно дифференцирующиеся отделы.

Внешним сигналом для возникновения различий между одинаковыми клетками может быть не только индукция соседних тканей, но и иные внешние для клеток факторы. Вероятно, различия условий обмена со средой приводят к тому, что глазной зачаток дифференцируется на два слоя — сетчатку и пигментный эпителий. В яйцах млекопитающих ооплазматическая сегрегация отсутствует или играет небольшую роль — первичные различия между клетками возникают, по-видимому, в зависимости от контактов с окружающей средой и, следовательно, от того, какие клетки в результате дробления случайно окажутся внутри, а какие — на поверхности раннего зародыша. Если на стадии нескольких десятков клеток изменить их взаимное расположение, это не скажется на развитии.

Общей чертой всех рассмотренных до сих пор факторов дифференцировки является то, что они определяют не столько характер дифференцировки, сколько ее место, т. е. пространственную организацию зародыша. Характер же дифференцировки зависит от индуцируемой ткани и в основном определяется ее компетенцией. Иначе действует такой фактор, как гормоны. Они играют важную роль на более поздних стадиях развития. По кровеносному руслу или путем диффузии гормон от места его секреции распределяется по всему организму относительно равномерно. Но действие он оказывает только на отдельные виды тканей, ткани-мишени, причем разные ткани реагируют на него совершенно различно. Хорошей иллюстрацией такого действия гормона является метаморфоз головастика. По мере повышения концентрации тироксина, синтезируемого в щитовидной железе, происходят изменения в разных органах — атрофируется хвост, укорачивается кишечник, вырастают конечности, образуются легкие, меняется строение кожи, в печени изменяется набор ферментных систем и т. д. Очевидно, что все перечисленные ткани были заранее подготовлены к этим процессам — компетентны к ним, и гормон нужен лишь для того, чтобы определить время наступления указанных преобразований согласованно во всем организме.

Таким образом, в биологии развития сегодня хорошо изучена морфология развития, собственно эмбриология. Известны также некоторые механизмы дифференцировки, такие, как ооплазматическая сегрегация, контактная индукция. Однако молекулярная природа этих явлений до сих пор не ясна, и очевидно также, что пока мы не можем объяснить все разнообразие процессов дифференцировки. Больше всего нам известно о механизмах действия гормонов, но, как будет показано ниже, и в этом случае способ избирательного действия на отдельные гены до сих пор не понятен. Очень мало известны механизмы морфогенеза: каким путем одинаковые или разные клетки совместно образуют сложные трехмерные образования — ткани и органы.

Очевидно, что молекулярная биология в конце концов сможет ответить на один из важнейших вопросов: каким образом в развитии осуществляется дифференциальная активность генов и в клетках создается определенный набор белковых молекул. Однако для понимания всей биологии развития не менее важно и выяснение процессов, происходящих на последующих уровнях биологической организации: каким образом различные наборы белков определяют разные свойства клеток, а те, в свою очередь, формируют ткани и органы организма.

ВВЕДЕНИЕ

В МОЛЕКУЛЯРНУЮ БИОЛОГИЮ

ДНК

Основным хранителем генетической информации в органическом мире является ДНК. РНК выполняет эту функцию только у части вирусов. Скелет молекулы ДНК составляет полимерная цепочка, образованная чередованием пятичленного сахара — дезоксирибозы и фосфорной кислоты. Остатки фосфорной кислоты присоединены к третьему и пятому углеродным атомам дезоксирибозы, и поэтому цепочка является ориентированной: каждое ее звено имеет 3'- и 5'-концы, и, следовательно, вся цепочка также на одном конце имеет свободный гидроксил 3'-углерода дезоксирибозы, а на другом — остаток фосфорной кислоты, связанной с 5'-углеродом дезоксирибозы.

К первому углеродному атому каждого остатка дезоксирибозы присоединено азотистое основание — пуриновое: аденин (А) или гуанин (Г) или пиримидиновое: тимин (Т) или цитозин (Ц).

Таким образом, каждый элемент цепочки ДНК — нуклеотид состоит из трех соединений: дезоксирибозы, азотистого основания и фосфорной кислоты. В зависимости от азотистого основания, входящего в его состав, различают дезоксигуаниловый, дезоксиадениловый, дезоксицитидиловый и дезокситимидиловый нуклеотиды. Все разнообразие ДНК (или, иначе, первичная структура ДНК) в природе создается чередованием этих дезокси-нуклеотидов в одной полинуклеотидной цепи.

Нативная (т. е. неповрежденная, содержащаяся в клетке) молекула ДНК состоит из двух полимерных цепочек, соединенных особым образом — комплементарно. Принцип комплементарности состоит в том, что против пуринового основания А одной цепи всегда стоит пиримидиновое основание Т другой цепи, а против пуринового основания Г — пиримидиновое основание Ц. Между собой их связывают водородные связи. Поэтому между двумя комплементарно связанными полинуклеотидными цепями сохраняется определенное и одинаковое по всей длине молекулы расстояние. Из принципа комплементарности следует, что полинуклеотидная последовательность одной цепи молекулы ДНК однозначно определяет полинуклеотидную последовательность другой цепи. Поэтому в нативной двуцепочечной ДНК имеется определенное соотношение нуклеотидов, где $A=T$, $G=C$, а сумма пу-

ринов (А+Г) равна сумме пиримидинов (Т+Ц) (правило Чаргаффа).

В то же время соотношение пар А+Г и пар Г+Ц для ДНК животных варьирует довольно широко. Это соотношение сейчас чаще выражают в виде процента Г+Ц пар в составе ДНК. Для большей части ДНК эта величина близка к 40%, а для небольших ее участков, кодирующих, например, рибосомную РНК, она достигает 60—70%. Двухцепочечная молекула ДНК в обычных условиях (в клетке, в растворах с нейтральным рН, при физиологических значениях ионной силы и температуры) образует двойную спираль, где на каждый виток приходится 10 пар нуклеотидов, расстояние между соседними нуклеотидами одной цепи — 3,4 Å, ее диаметр — 20 Å.

Двойная цепочка ДНК имеет важную особенность — она антипараллельна, т. е. если направление фосфодиэфирных связей в одной цепи: 3'→5', то в другой оно: 5'→3'.

Первичная структура ДНК — полинуклеотидная цепочка — достаточно прочна. Она может быть разорвана только при жестких воздействиях или с помощью специфических ферментов — дезоксирибонуклеаз (ДНКаз). Комплементарное взаимодействие двух цепей внутри молекулы ДНК — значительно менее прочно. При повышении температуры до 70—90° водородные связи разрываются и ДНК денатурирует, т. е. расходуется на две одиночные цепи, закручивающиеся в беспорядочные клубки. Процесс денатурации ДНК обратим, и при более низкой температуре (отжиге) обе нити могут снова образовать двойную спираль. Ренатурация возможна, однако, только при условии восстановления комплементарности, т. е. против последовательности нуклеотидов на одной нити, например — А—Т—Г—А—Ц—, должна встать нить с комплементарной последовательностью, т. е. —Т—А—Ц—Т—Г—. Это происходит быстро, если в растворе много одинаковых последовательностей ДНК и каждой из них легко встретить комплементарную себе пару. Если же данная последовательность встречается редко, то до ее случайной встречи с комплементарной нитью ДНК проходит очень большое время (подробнее см. ниже).

Определение ДНК в тканях производится обычно химическими методами. Так, по методу Фельгена в результате обработки фиксированных тканей кислотой при нагревании от ДНК отщепляются пуриновые основания, а освободившиеся альдегидные группы дезоксирибозы дают цветную реакцию с реактивом Шиффа. Эту окраску можно измерить в клетках количественно с помощью микрофотометрии. Для биохимических определений из тканей предварительно удаляются низкомолекулярные соединения, липиды и РНК (метод Шмидта и Тангаузера и метод Огура и Розена). В остатке ДНК гидролизуют кислотой при нагревании и количество нуклеотидов ДНК определяют в гидролизате спектрофотометрически по поглощению при 260 нм либо с по-

мощью цветной реакции на дезоксирибозу (дифенламинный метод Дише в модификации Бартопа). Если клетки предварительно инкубировали с радиоактивным предшественником (например, тимидином, меченым по ^3H или по ^{14}C , или фосфорной кислотой с ^{32}P), то вновь синтезированная ДНК окажется меченой и вслед за определением ее количества можно измерить и ее радиоактивность. Меченую ДНК можно определять и на препаратах клеток автордиографически по трекам в фотоэмульсии, которой покрывают препарат.

При соблюдении всех предосторожностей (мягкое разрушение клеток, защита от ДНКаз и др.) удастся получить ДНК с молекулярным весом порядка нескольких десятков и даже сотен миллионов дальтон. В составе хромосом ДНК имеет еще большие размеры и, может быть, ДНК одной хромосомы является одной молекулой.

Выделенную ДНК изучают различными методами. Химические методы (гидролиз до нуклеотидов или оснований, бумажная, ионообменная, тонкослойная хроматография) позволяют определить нуклеотидный состав, откуда можно получить процент Г+Ц пар. Эта цифра может свидетельствовать о преобладании тех или иных генов в данном препарате ДНК.

Молекулярный вес ДНК определяют по скорости осаждения, измеряемой на аналитической центрифуге. Молекулярный вес нативной ДНК можно также вычислить, определяя ее длину на электронной микрофотографии.

Одним из наиболее ценных методов фракционирования и характеристики ДНК является равновесное центрифугирование в градиенте плотности. Обычно используют растворы CsCl. При длительном центрифугировании в ультрацентрифуге по длине пробирки образуется градиент плотности, в котором фракции ДНК занимают положение, соответствующее их плавучей плотности. Метод позволяет определить плавучую плотность ДНК с точностью до четвертого знака и, таким образом, учесть минимальные изменения, связанные с нуклеотидным составом (содержанием Г-Ц пар), наличием тяжелых изотопов (например, ^{15}N) и т. д.

Если работа ведется на препаративной ультрацентрифуге, по окончании центрифугирования содержимое пробирки разделяют по каплям на определенное число фракций (проб). В каждой фракции измеряют количество ДНК по поглощению в ультрафиолете при 260 нм и, если необходимо, ее радиоактивность.

Метод молекулярной гибридизации основан на способности денатурированных ДНК при «отжиге» (инкубации при 60—70°) вновь образовывать двуспиральные структуры (ренатурировать). Скорость ренатурации при прочих равных условиях зависит от концентрации нуклеотидных последовательностей, комплементарных друг к другу. Эта концентрация пропорциональна общей концентрации ДНК в растворе и доле участков, имеющих комплементарную последовательность нуклеотидов, среди остальных

последовательностей. Доля таких участков тем меньше, чем больше различных генов в ДНК данного генома. Отсюда кинетика процесса ренатурации позволяет заключить, насколько сложен (разнообразен) данный геном.

Изучение кинетики ренатурации ДНК позволило установить, что геном эукариот состоит из уникальных последовательностей (30—70% ДНК) и так называемых «повторов», т. е. последовательностей, которые представлены в геноме многократно. Часть из них (до 10%) повторяется 10^6 раз (например, сателлитные ДНК центромерных участков хромосом мыши). Большая часть повторов представлена 10^1 — 10^5 копиями и называется умеренными повторами. Сюда относятся гены рРНК, тРНК, 5S рРНК, гистонов, которые в сумме составляют несколько процентов генома. Функция большей части умеренных повторов неизвестна, но предполагается, что они образуют регуляторные участки генов. Структурные гены, кодирующие белки, являются уникальными, но очевидно, что не все уникальные последовательности генома входят в состав структурных генов. Это следует уже из того, что количество ДНК в ядре эукариот в десятки раз больше, чем должно было бы содержаться в предполагаемом числе генов.

В клетках эукариот ДНК входит в состав хромосом, локализованных в ядре, а также в состав клеточных органелл — митохондрий и хлоропластов. В хромосоме ДНК находится в виде комплексов с белками — дезоксирибонуклеопротеидов (ДНП), образуя основную часть ядра — хроматин.

Белки хроматина представлены сильно основными белками — гистонами и кислыми (пегистоновыми) белками. Имеется пять типов гистонов, которые обычно содержатся в клетках примерно в равных количествах. Мы приводим новые и в скобках старые обозначения. Богатые лизином гистоны: Н1 (f1), Н2А (f2a2), Н2В (f2в) и богатые аргинином: Н3 (f3), Н4 (f2a1).

Гистоны и ДНК образуют правильные структуры — нуклеосомы, состоящие из восьми молекул гистонов (по две Н2А, Н2В, Н3 и Н4), на которые накручено кольцо ДНК из 150—200 пар нуклеотидов. Между молекулами находятся участки ДНК длиной в 30—40 пар, связанные с гистоном Н1. Весовое отношение ДНК/гистон обычно равно 1.

Помимо этих гистонов в ядрах эритроцитов птиц содержится фракция Н5 (f2с), замещающая гистон Н1; в сперматозоидах многих животных обычные гистоны замещены совсем простыми белками — протаминами, почти целиком состоящими из лизина и аргинина, или протаминподобными гистомами. У разных видов гистоны одного типа (кроме Н1) почти идентичны друг другу.

В составе хромосом гистоны подвергаются некоторым модификациям (фосфорилированию, метилированию, ацетилированию), что увеличивает разнообразие строения этих гистоновых фракций и, по-видимому, существенно для регуляции функций ДНК (репликации, транскрипции).

Негистоновые кислые белки являются вторым белковым компонентом хроматина. Это более неопределенная фракция, чем гистоны. Весовое отношение негистоны/гистоны составляют от 0,2 до 1 и вероятно зависит от методов выделения хроматина. Количество различных сортов негистоновых белков варьирует от 10 до 100. Предполагается, что оба типа белков — гистоны и негистоновые белки — участвуют в регуляции транскрипции генетической информации, причем специфичность регуляции определяют негистоновыми белками.

Принципы синтеза ДНК сформулированы еще Уотсоном и Криком в 1953 г. Комплементарные нити ДНК отделяются друг от друга, и около каждой выстраиваются свободные нуклеотиды, комплементарные нуклеотидам данной нити, которые, соединяясь между собой фосфодиэфирной связью, образуют новые нити ДНК. ДНК строится из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dATФ, dГТФ, dТТФ, dЦТФ). При образовании фосфодиэфирной связи от каждого из них отщепляется пирофосфат (два связанных остатка фосфорной кислоты).

Действительный механизм синтеза ДНК гораздо сложнее и лучше известен для прокариот. В синтезе ДНК участвует целый ряд ферментов (6—10), из которых главным является ДНК-полимераза. Синтез ДНК может идти только в направлении 3'→5', и поэтому двойная цепь ДНК реплицируется небольшими участками (фрагментами Оказаки) по одной нити в одном направлении, по другой — в обратном. Репликация состоит из ряда процессов, каждый из которых контролируется своим ферментом, — расплетение ДНК, синтез небольшого участка РНК — «затравки», собственно синтез ДНК, пришивание ее к ДНК следующего участка и т. д. Кроме того, существует еще часть ферментов, которые определяют репарацию ДНК, — удаление поврежденных и некомплементарных участков и их замещение комплементарной цепочкой ДНК. У эукариот все эти процессы могут быть еще сложнее.

По окончании синтеза происходит модификация ДНК с помощью особых ферментов — метилаз, обнаруженных у прокариот и эукариот. Места метилирования строго специфичны и определяются последовательностью нескольких пар нуклеотидов. Модификация во всяком случае у прокариот необходима для защиты ДНК от специфического действия собственных фосфолиэстераз, предназначенных разрушать «чужие» (например, вирусные) ДНК.

Синтез ДНК происходит в синтетической фазе клеточного цикла (фаза S), которая продолжается от нескольких минут (во время делений дробления) до нескольких часов. Репликация хромосом эукариот начинается (иницируется) сразу во многих точках. Расстояние от одной точки инициации до другой называется репликон. В ходе дифференцировки число и размер репликонов может меняться.

Молекулы РНК очень близки по своему строению к ДНК. Они представляют собой такую же полимерную цепочку, состоящую из нуклеотидов. В отличие от ДНК в состав рибонуклеотида входит не дезоксирибоза, а рибоза, в число оснований РНК вместо тимина входит урацил, и молекулы РНК, как правило, одноцепочечные.

В клетках РНК представлена молекулами разного типа, отличающихся по ряду признаков, прежде всего, по их функции, хотя все они участвуют в синтезе белка. Основную долю (около 90%) клеточных РНК составляют рибосомальные РНК (рРНК). Они входят в состав рибосом. Имеется три вида молекул рРНК: с молекулярным весом $1,3-1,75 \cdot 10^6$; $0,7 \cdot 10^6$ и $3,6 \cdot 10^4$ дальтон — у животных и $1,1 \cdot 10^6$; $0,56 \cdot 10^6$ и $3,6 \cdot 10^4$ дальтон — у бактерий. рРНК митохондрий еще меньше — $5,3 \cdot 10^5$ и $3 \cdot 10^5$ дальтон. Коэффициенты седиментации рРНК, которые чаще употребляются для их характеристики, равны 25—28S, 18S и 5S у животных, 23S, 16S и 5S — у бактерий и 16S и 12S — в митохондриях (рРНК у беспозвоночных — 25S, у рыб и амфибий — 26S, у птиц и млекопитающих — 28S).

В каждой рибосоме содержится по одной молекуле каждого вида рРНК, которые находятся в комплексе с белками рибосом. Нуклеотидный состав рРНК относится к Г-Ц типу (60—70% Г+Ц).

Вторым типом РНК являются транспортные РНК — тРНК. Их содержится в клетке до 10% от суммы всех РНК. Молекулярный вес тРНК (около 80 нуклеотидов) равен в среднем $2,5 \cdot 10^4$ дальтон (4S РНК). В клетке тРНК выполняют функцию связывания аминокислот (акцепторная функция), их переноса к месту синтеза белка — рибосомам (трансферная функция) и функцию опознавания и специфического связывания на рибосоме со «своим» триплетом на мРНК (адапторная функция).

Имеется около 60 видов тРНК, различающихся по первичной структуре (последовательности нуклеотидов). Каждой аминокислоте соответствует один или чаще несколько (до шести) изоакцепторных видов тРНК.

Вторичная структура у всех тРНК сходна: полинуклеотидная цепь свернута, напоминая клеверный лист, который в свою очередь складывается в более сложную — трехмерную структуру.

У всех тРНК на 3'-конце молекулы содержится триплет — А-Ц-Ц. К аденозину этой тройки и присоединяется аминокислота. Каждая тРНК имеет особый триплет — антикодон, которым она комплементарно связывается с кодоном (триплетом, кодирующим одну аминокислоту) на мРНК. В составе тРНК имеются, помимо обычных нуклеотидов, необычные, минорные. К их числу относятся псевдоуридиловая кислота и нуклеотиды, имеющие в своем составе метилированные основания (метилированные гуанины,

метилованные аденины, оксиметилцитозин) и еще более сложные производные оснований.

Третьим типом РНК клетки являются информационные матричные или мессенджер РНК (здесь обозначается как мРНК). Эта важная категория РНК выполняет функцию собственно переносчика генетической информации от ДНК в ядрах к месту синтеза белка — на рибосомы цитоплазмы. Последовательность нуклеотидов мРНК содержит информацию о последовательности аминокислот в белке, т. е. о его строении. Размер мРНК зависит от молекулярного веса кодируемого белка (от 7—9S для гистонов до 26S для миозина). Поэтому их часто называют гетерогенными РНК.

Суммарный нуклеотидный состав мРНК подобен составу ДНК. Это объясняется тем, что мРНК являются копиями большей части ДНК клетки. Поэтому во многих случаях мРНК называют ДНК-подобными РНК (Д-РНК).

Методы выделения и анализа индивидуальных мРНК (кодирующих отдельные белки) только начинают разрабатывать. В настоящее время выделены лишь немногие мРНК (гистонов, α - и β -цепей глобина, иммуноглобулина, овальбумина и др.). Помимо последовательности, кодирующей структуру белка, у многих мРНК на 3' конце имеется нетранслируемая полиА-последовательность. На 5'-конце мРНК также имеется нетранслируемая последовательность, которая оканчивается особой структурой: m⁷GpppNmNm.

Все эти три вида РНК (рРНК, тРНК, мРНК) содержатся в цитоплазме. Кроме того, значительное количество РНК находится в ядрах. Все виды РНК (кроме митохондриальных) синтезируются (транскрибируются) в ядрах. После некоторых преобразований — процессинга (см. ниже) — они выходят в цитоплазму. Поэтому в ядрах содержатся только что синтезированные РНК, РНК, находящиеся в ходе процессинга, и, частично, уже зрелые РНК. Кроме того, предполагается, что в ядрах содержатся особые ядерные РНК, выполняющие свою роль в ядре и целиком деградирующие в нем. Об их функции пока практически ничего не известно.

При исследовании РНК используются методы, аналогичные использованным при исследовании ДНК. Выделенные препараты РНК анализируют разными методами. Суммарный нуклеотидный состав (процент Г+Ц) РНК клетки соответствует составу рРНК, поскольку ею представлены более 90% всей РНК. Для определения нуклеотидного состава меченых РНК в качестве метки используют неорганический фосфат, меченный ³²P, так как он равномерно включается во все нуклеотиды. Нуклеотидный состав радиоактивной РНК при коротком мечении может отличаться от состава рРНК, так как скорость синтеза мРНК выше, а время ее жизни короче, чем у рРНК.

Выделение РНК из гомогената тканей проводится экстракцией в присутствии фенола, денатурирующего и растворяющего

белки. В некоторых случаях применяются детергенты (додецилсульфат натрия — SDS) или термическая обработка, позволяющая выделить фракции цитоплазматических, ядрышковых, хроматиновых РНК.

Грубое фракционирование РНК можно провести путем солевого переосаждения препарата нуклеиновых кислот в присутствии 1,5—2М NaCl, получаемый осадок содержит рРНК и мРНК, а в супернатанте остаются ДНК, тРНК и 5S рРНК. Несколько более тонкое фракционирование проводится с помощью гель-фльтрации на сефадексах, которые делят нуклеиновые кислоты соответственно их молекулярным весам. Этот метод используется для разделения смеси ДНК и низкомолекулярных тРНК и 5S рРНК.

Чаще других используется метод седиментации в градиенте концентрации сахарозы. В отличие от центрифугирования в CsCl в этом случае разделение молекул идет в основном по молекулярному весу. В пробирку накладывают в виде плавного градиента раствора сахарозы от 5 до 20% или от 15 до 30%. Смесь РНК наносится тонкой полоской на поверхность градиента. При центрифугировании молекулы РНК движутся ко дну с различной скоростью, которая, в основном, определяется их размерами. По окончании центрифугирования в пробирке оказываются слои РНК различного размера (коэффициента седиментации). Содержимое пробирки разделяют по каплям на фракции, измеряют в них содержание РНК в ультрафиолете (260 нм) и определяют радиоактивность.

Суммарный препарат РНК дает на седиментограмме по поглощению при 260 нм два пика высокомолекулярных рРНК — 28S и 18S и суммарный пик низкомолекулярных РНК — 5S и 4S. Наличие мРНК можно определить только по радиоактивности, так как количество их в клетках незначительно, но синтезируются они с большой скоростью. Об образовании рРНК можно судить по пикам радиоактивности, совпадающим с пиками оптической плотности, т. е. 28S и 18S.

Большее разрешение при разделении молекул на индивидуальные фракции может быть получено путем электрофореза РНК в полиакриламидном геле. Подвижность молекул нуклеиновых кислот и белков в электрическом поле зависит от их суммарного заряда и от объема молекулы. После электрофореза распределение РНК вдоль геля определяют по поглощению в ультрафиолете или специальными красителями. Для измерения радиоактивности гель нарезают на диски, каждый диск просчитывают отдельно или весь гель прижимают к фотоэмульсии и о радиоактивности фракций судят по почернению негатива.

Метод молекулярной гибридизации РНК с ДНК позволяет провести идентификацию РНК, сопоставление РНК, синтезируемых в разных условиях, или выявление синтеза нового вида молекул РНК, а также определение доли считываемых последовательно-

стей ДНК генома. Так как все молекулы РНК являются копиями тех или иных последовательностей ДНК данного генома, то в ходе инкубации (отжига) с однонитчатой (денатурированной) ДНК комплементарные нити РНК и ДНК могут образовывать гибриды. Для того, чтобы обнаружить гибриды, используются меченые РНК или ДНК, выделяют ренатурированные фрагменты и по их радиоактивности судят о проценте гибридизации.

В зависимости от целей исследования гибридизация ведется при избытке РНК по отношению к ДНК (определение доли транскрибируемой ДНК) или в избытке ДНК по отношению к РНК (процент гибридизации препарата РНК). Кроме того, для сравнения препаратов РНК с целью обнаружения гомологичных нуклеотидных последовательностей используется прием гибридизации в присутствии конкурентной РНК. Этот препарат РНК должен быть немеченым и добавляется в значительном избытке по отношению к взятым количествам меченого препарата. Гибридуясь с теми же последовательностями ДНК, он, естественно, препятствует гибридизации исследуемой меченой РНК. Чем больше сходство меченой и немеченой РНК, тем больше степень их конкуренции, тем меньше радиоактивность гибридов.

Фермент, осуществляющий синтез РНК на ДНК, называется ДНК-зависимой РНК-полимеразой. РНК-полимераза работает на двуцепочечной нативной ДНК, двигаясь в направлении от 3'- к 5'-концу, одной из нитей и строит РНК, комплементарную к ней. Эта нить ДНК называется значащей нитью. Субстратами синтеза РНК являются рибонуклеозидтрифосфаты (НТФ). В ходе реакции пирофосфат отщепляется от молекулы НТФ, создается фосфодиэфирная связь между молекулами нуклеозидмонофосфатов и образуется молекула РНК, комплементарная к значащей нити ДНК.

РНК-полимераза — сложный белок, построенный из нескольких полипептидных цепей (субъединиц). У эукариот обнаружено три типа РНК-полимераз — I, II и III. Они различаются по поведению при хроматографии, по чувствительности к α -аманитину (яд из гриба бледной поганки), потребности в ионах Mg и Mn и по функции. РНК-полимераза I находится в ядрышке и синтезирует рРНК, РНК-полимераза III — тРНК и 5S рРНК, а РНК-полимераза II — все остальные, т. е. ДНК-подобные РНК и в первую очередь все мРНК.

Синтез РНК, так же как репликация ДНК, складывается из нескольких этапов. Первым этапом транскрипции является присоединение молекулы РНК-полимеразы к особому участку ДНК, с которого может начаться правильная транскрипция. По аналогии с прокариотами эти участки называются промоторами, хотя у эукариот они еще не идентифицированы. Особенности строения промотора сами по себе могут определять только место присоединения РНК-полимеразы. Этого недостаточно для того, чтобы объяснить избирательную (дифференциальную) активность генов,

так как один и тот же ген транскрибируется в одной клетке и не транскрибируется — в другой, хотя структура их промоторов одинакова.

Следующим этапом после посадки фермента на матрицу является инициация синтеза, затем собственно синтез полинуклеотидной цепи РНК и, наконец, терминация — окончание синтеза и освобождение синтезируемых РНК. Синтезируемые и обнаруживаемые в ядре РНК — это единицы транскрипции ДНК имеют, как правило, много больший размер, чем те РНК, которые функционируют в цитоплазме. Поэтому следующим этапом является превращение гигантских РНК-предшественников (про-мРНК) в зрелые молекулы. Этот процесс носит название процессинга РНК (или созревания).

Рибосомные РНК синтезируются в ядрышке. Предшественник рРНК (про-рРНК) содержит последовательности обеих высокомолекулярных рРНК (28S и 18S) и лишние последовательности. Гигантский предшественник комплексируется с белками и метилируется специальными ферментами (метилазами рРНК) по остаткам рибозы и отдельным основаниям. Точки метилирования расположены специфическим образом и, вероятно, определяют недоступность последовательностей, входящих в состав рРНК, для действия нуклеаз во время процессинга. Сначала про-рРНК отщепляет часть цепи и образуется следующий предшественник с меньшим молекулярным весом, но содержащий обе рРНК. Затем он распадается на две неравные цепи. Одна содержит 28S рРНК, другая — 18S рРНК, в состав которых входят также лишние нуклеотиды. На последнем этапе происходит отщепление этих лишних нуклеотидов и зрелые рРНК выходят в цитоплазму.

Предшественники на всех этапах превращения находятся в комплексе со специфическими белками рибосом и в цитоплазму выходят не свободные 28S и 18S рРНК, а РНК-частицы, которые превращаются в субъединицы рибосом. Размеры основного и промежуточных предшественников, а также зрелых рРНК несколько менялись в ходе эволюции и происходило некоторое увеличение длины цепи большой рРНК (от 25S до 28S) и длины добавочных нуклеотидных последовательностей (от 20 до 50%) всей про-рРНК. Поэтому у млекопитающих и птиц молекулярный вес основного предшественника равен $4,3 \cdot 10^6$ дальтон (45S), а у амфибий и рыб — $2,6 \cdot 10^6$ дальтон (41S).

Транспортные РНК также транскрибируются в виде больших предшественников (до 180 нуклеотидов — 6,5S). Здесь сначала происходит отщепление лишних последовательностей, а затем метилирование и другие модификации нуклеотидов.

Полагают, что и мРНК транскрибируются в ядре в виде гигантских молекул (про-мРНК). Затем большая часть этих молекул распадается и к мРНК происходит достройка полиА-последовательностей с 3'-конца. Полиадепилирование затрагивает, однако, не все типы мРНК. Размер мРНК может составлять це-

большую часть от размера про-мРНК. В ядре про-мРНК находятся в комплексе с белками-информоферами. Предполагается, что эти белки участвуют в ограничении процессинга и в транспорте мРНК из ядер в цитоплазму, где мРНК образует другие комплексы с белком (информосомы).

Основным методом исследования синтеза РНК является метод меченых атомов. Меченные ^3H , ^{14}C или ^{32}P низкомолекулярные предшественники РНК добавляют к инкубационной среде или вводят в животное. В некоторых случаях применяют меченую ^{14}C углекислоту, которая добавляется к среде в виде бикарбоната. После инкубации с изотопом производят выделение, фракционирование и анализ РНК по описанным выше методам.

Показателем скорости синтеза РНК обычно является величина радиоактивности, отнесенная к содержанию РНК в пробе (удельная активность РНК). Однако в такой оценке важную роль играет степень радиоактивности пула нуклеотидных предшественников. Пулом называется содержание молекул того или иного соединения внутри клетки. Так, применительно к синтезу РНК можно говорить о пулах низкомолекулярных предшественников — уридина, УТФ, цитидина, ЦТФ и др.

Для того, чтобы определить абсолютную скорость синтеза РНК, необходимо отнести радиоактивности нуклеотида, например УМФ, включенного в РНК, к радиоактивности непосредственного предшественника синтеза — нуклеотидтрифосфата (в данном случае УТФ). Радиоактивность УТФ зависит от скорости его проникновения в клетку, скорости фосфорилирования и от содержания (пула) немеченого УТФ в клетке. Однако если задачей исследования является сравнение лишь относительных скоростей синтеза различных фракций в одном типе клеток, радиоактивность пула предшественников можно не учитывать.

В исследованиях синтеза РНК большую роль играет использование специфических ингибиторов, в частности антибиотиков. Наиболее широко применяется актиномицин Д (C_1), который, действуя на матрицу, останавливает работу РНК-полимеразы. Синтез мРНК специфически подавляется α -аманитином. Транскрипция в митохондриях более чувствительна к бромистому этидию.

БЕЛКИ

В химическом отношении белки это полимерные цепи, состоящие из остатков аминокислот, связанных между собой пептидной связью. В составе полипептидов чередуются 20 различных аминокислот. Порядок их расположения в цепи составляет первичную структуру белка и определяет в конечном итоге все свойства белковой молекулы. Часть полипептидной цепи у многих белков закручена в виде α -спирали (реже β -структура). Это — вторичная структура белков. В глобулярных белках (к этой кате-

гории относится большинство белков, в том числе ферменты) молекула образует третичную структуру, т. е. сложена определенным образом. Высшие структуры белков стабилизируются —S—S—связями между остатками серосодержащей аминокислоты — цистеина, водородными связями между сближенными в результате сложения цепи аминокислотными остатками и ионными связями между заряженными радикалами аминокислот. В глобуле аминокислотные остатки, которые неспособны растворяться в воде (гидрофобные, неполярные), обращены внутрь молекулы, а те, которые способны растворяться в воде (гидрофильные, полярные), обращены к поверхности глобулы. Такая конфигурация поддерживается окружающими молекулами воды (гидрофобными взаимодействиями).

Вторичная и третичная структуры превращают молекулу ферментного белка в трехмерное образование, в котором определенные аминокислоты оказываются расположенными рядом, образуя «активный центр», способный осуществлять ферментативные реакции. В той же молекуле фермента при образовании пространственной структуры создаются участки, ответственные за присоединение к тем или иным клеточным структурам, определяющим его локализацию в клетке. Наконец, многие ферменты имеют участки, способные присоединять определенные клеточные метаболиты, что вызывает некоторое изменение структуры молекулы в целом и, главное, активного центра фермента. Таким образом может осуществляться регуляция функции фермента.

Большинство ферментов имеет еще и четвертичную структуру, которая организуется при соединении двух и более (иногда десятков) полипептидных цепей (субъединиц). Фермент может состоять из субъединиц с одинаковой или разной первичной структурой.

Ферменты одинакового действия из разных тканей могут различаться по набору субъединиц. Классическим примером является лактатдегидрогеназа. Этот фермент представляет собой тетрамерные комбинации двух субъединиц А и В (Н и М) — A_4 ; A_3B ; A_2B_2 ; AB_3 и B_4 . Все эти пять форм носят название изозимов, т. е. они обладают лактатдегидрогеназой активностью, но несколько различаются по потребности к условиям для ее проявления.

Белки отличаются друг от друга составом аминокислот и размером молекулы, что определяет и ряд других физических и химических свойств — растворимость, суммарный заряд, изоэлектрическую точку, чувствительность к температуре, сорбционные свойства и т. д. Все эти особенности используются для их разделения, получения белков в чистом виде и анализа. В клетке белки входят в состав различных структур или находятся в растворимом состоянии. Получение растворимых белков проводят экстракцией гомогената ткани. Для растворения других белков применяют специальные методы разрушения их связей с мембранами,

растворы мочевины и др. Экстракты белков фракционируют осаждением сульфатом аммония, термической, спиртовой обработкой. Более очищенные препараты ферментов и белков разделяют с помощью ряда методик.

Хроматография на целлюлозных ионообменниках основана на различиях в суммарном заряде белковых молекул. Белки можно отделять друг от друга, последовательно смывая (элюируя) растворами с повышающейся концентрацией соли или изменяющимся рН.

Гель-фильтрация на сефадексах достигается за счет того, что отличающиеся по молекулярному весу и объему белковые глобулы различно диффундируют в поры сефадекса. Это определяет разную скорость движения молекул вдоль колонки. Для более тонкого разделения белков используются методы электрофореза, в том числе электрофорез в полиакриламидном геле. Метод электрофореза белков основан на различной подвижности молекул с разным суммарным зарядом и молекулярным весом в электрическом поле. В присутствии додецилсульфата натрия (SDS) электрофорезом в полиакриламидном геле разделяют белки только по их молекулярным весам.

Очень эффективное разделение белков достигается методом изоэлектрического фокусирования, основанного на том, что вдоль колонки создается градиент рН и разные белки занимают те положения вдоль колонки, которые соответствуют их изоэлектрическим точкам. Тонкими методами выделения и идентификации являются иммунохимические методы: иммунсорбция, иммунофорез, иммунопреципитация. Эти методы обладают чрезвычайной специфичностью и чувствительностью.

Количество белка в растворе определяют по поглощению при 280 нм или по специфическим цветным реакциям (например, метод Лоури). В геле их окрашивают особыми красителями. Белки, обладающие ферментативной активностью, можно определять с помощью реакции, которую они катализируют, — по убыли субстратов или образованию продуктов реакции.

Особое распространение получил в последние годы ко-электрофорез белков, меченных разными изотопами, позволяющий точно сравнить состав белков, синтезируемых при разных условиях в разных тканях, на разных стадиях. Белки, меченные в разных клетках по одной аминокислоте, но разными изотопами, смешиваются и подвергаются электрофорезу совместно. Если отношение радиоактивности одного изотопа к радиоактивности другого оказывается различным в разных фракциях, это указывает на то, что в сравниваемых клетках состав синтезируемых белков различается качественно или количественно.

Биосинтез белка происходит в цитоплазме на рибосомах и требует участия следующих компонентов: рибосомы, мРНК, набора тРНК с присоединенными к ним аминокислотами (аминоацил-тРНК), ГТФ, белковых факторов инициации (IF), трансля-

ции (Tu, Ts, G) и терминации (R, S). Присоединение аминокислоты к соответствующей тРНК происходит при участии специфического фермента (аминоацил-тРНК-синтетазы), который «опознает» аминокислоту и тРНК и соединяет их макроэргической связью, используя энергию АТФ. Таким путем устанавливается соответствие между аминокислотой и антикодоном тРНК, чем определяется последующее соответствие между порядком нуклеотидов в мРНК и аминокислот в белке.

Последовательность аминокислот в белке (первичная структура) закодирована в мРНК в виде последовательности нуклеотидов: одной аминокислоте соответствует один триплет (три нуклеотида), который называют кодоном. Из 64 возможных триплетов, кроме трех бессмысленных (терминирующих), 61 соответствует той или иной из 20 аминокислот, входящих в состав белков. Каждая аминокислота, таким образом, кодируется несколькими кодонами, обычно различающимися по третьему нуклеотиду. Во время синтеза белка каждый кодон на рибосоме опознается и комплементарно соединяется с антикодоном тРНК, с которой связана соответствующая аминокислота. Так, генетическая информация, закодированная в ДНК, через РНК реализуется в виде последовательности аминокислот в белке. Во время синтеза белка (трансляции) к рибосоме присоединены мРНК и две молекулы тРНК, комплементарно связанные своими антикодонами с двумя кодонами мРНК, находящимися в данный момент в активных центрах рибосомы. К одной тРНК присоединен уже синтезированный к данному моменту начальный отрезок полипептида, а ко второй тРНК — аминокислота, которая будет включена в состав полипептида при следующем шаге трансляции.

Во время каждого шага трансляции недостроенный конец полипептидной цепочки отделяется от первой тРНК и присоединяется пептидной связью к аминокислоте, связанной со второй тРНК. Вслед за тем мРНК сдвигается относительно рибосомы на один кодон (три нуклеотида), и при этом первая тРНК (теперь свободная) оказывается вне рибосомы, а вторая (теперь связанная с полипептидом) перемещается на место первой. На ее же освободившееся место, комплементарно связываясь со следующим кодоном, становится третья тРНК со своей аминокислотой. В этих перемещениях участвуют факторы трансляции (Tu, Ts, G) и используется энергия двух молекул ГТФ.

Трансляция на мРНК одновременно происходит в нескольких точках, т. е. вдоль мРНК движется несколько рибосом, несущих на себе строящиеся полипептидные цепи. Такие комплексы из одной мРНК и нескольких рибосом называются полирибосомами (полисомами).

Важными моментами биосинтеза белка является начало (инициация) и конец (терминация) трансляции. Трансляция начинается с присоединения 5'-конца мРНК, на котором обычно находится «кэп», особая группа — $m^7GpppNmNm$ — очевидно, необхо-

димая для начального присоединения к рибосоме. Первый считываемый кодон (иницирующий триплет АУГ или ГУГ) комплементарно связывается с особой иницирующей тРНК, несущей метионин (У прокариот — формилметионин) и способной сразу становиться на место первой тРНК. В инициации также участвуют особые белки — факторы инициации (IF). Отсутствие даже одного из них останавливает начало трансляции.

Терминация трансляции наступает тогда, когда на мРНК оказывается так называемый «бесмысленный» триплет (УАА, УАГ или УГА), которому не соответствует ни одна тРНК. В терминации также участвуют факторы терминации RF-1, RF-2, S.

По мере образования полипептида он начинает свертываться, образуя вторичную и третичную структуры белка. После биосинтеза многие белки, особенно те, которые функционируют вне клетки (например, коллаген, пищеварительные ферменты, гормоны), подвергаются модификации. Она состоит в том, что от полипептида специфической протеазой отщепляется определенная часть. Только после этого, например, секретрируемые ферментные белки становятся активными. Модификация состоит также в присоединении к белкам полисахаридных или липидных групп, их ацетилирования, фосфорилирования и т. д. Синтезированные белки могут секретироваться, оставаться в цитозоле или вступать в комплексы с белками и другими макромолекулами (нуклеиновыми кислотами, липидами, полисахаридами), образуют надмолекулярные структуры и включаются в состав органелл клетки.

ДНК

Одним из основных постулатов современной генетики, молекулярной биологии и биологии развития является сохранение генетической информации, т. е. ДНК, в ряду поколений клеток и организмов, а следовательно, поддержание ее постоянства на всем протяжении индивидуального развития. Это должно во всяком случае быть справедливым для генеративного пути, т. е. в ряду клеточных поколений от гаметы до гаметы.

Однако действительная картина, обнаруживаемая уже при определении количества ДНК в ооцитах и эмбриональных клетках, оказывается значительно сложнее. Количество ДНК в ооцитах возрастает от десятков до миллионов раз за счет увеличения числа митохондрий и соответственно количества митохондриальной ДНК. В ядре ооцитов многих видов животных общее количество ДНК увеличивается за счет амплификации рибосомных генов — ядрышкового организатора. У некоторых видов в начале эмбриогенеза в соматических клетках происходит диминуция хроматина или элиминация хромосом и, таким образом, уменьшение ядерной ДНК. До самого последнего времени обсуждается вопрос о возможности амплификации структурных генов как способе регуляции их функции во время дифференцировки. Наконец, классическая картина митотического цикла во время делений дробления яйца существенно изменена за счет почти полного исчезновения периодов G_1 и G_2 . Существенным изменениям в оогенезе и эмбриогенезе подвергаются организация хромосом и ядер — происходит образование петель «ламповых щеток», изменяется структура ядрышек в ооците, возникают карิโอмерные ядра в раннем дроблении и политепные хромосомы в провизорных органах личинки двукрылых. Изменения в содержании ДНК и структуре хромосом естественно связаны с особенностями их функции в развитии и являются способом регуляции.

ДНК В ЯЙЦЕ

Определение содержания ДНК в яйце методически очень сложно. Яйцо по размеру намного больше обычной клетки и содержит значительное количество запасных веществ, в том числе таких близких по химическому строению соединений, как РНК,

нуклеотидпептиды, низкомолекулярные дезоксирибонуклеотиды и их производные. У многих животных к завершению созревания яйца ядра, как структурного образования, нет, так как ядерная оболочка растворяется и хромосомы находятся в цитоплазме. Поэтому цитофотометрическое определение ДНК в ядре с использованием фельгеновского метода окрашивания возможно лишь на стадии оогенеза, а также в яйце после оплодотворения (или же партеногенетической активации), когда сформируется женский пронуклеус.

Для химического определения ДНК в целом яйце потребовалось развитие специальных высокоспецифических методов. Но даже несмотря на использование этих методов для многих объектов еще нет точных значений содержания ДНК в яйце.

В ранних исследованиях, проведенных в 50-х годах, когда биохимия и химия нуклеиновых кислот только начинали развиваться, были получены парадоксальные результаты. Так, Маршак и Маршак (Marshak, Marshak, 1952, 1953, 1954, 1955, 1956), применив фельгеновскую реакцию, не обнаружили ДНК в ядре зрелых яиц морского ежа *Arbacia*. Это даже дало им основание постулировать, что ДНК не является единственным компонентом генетического материала ядра, ответственным за передачу генетической информации, поскольку на самом важном этапе — образования половых клеток — она исчезает из ядра. Подобная идея не получила широкого распространения ввиду появления к этому времени точных доказательств генетической роли ДНК, но потребовалось длительное время для выяснения причины ошибочных измерений содержания ДНК в яйце.

Лишь в 1955 г. совершенствование метода Фельгена позволило обнаружить ДНК и в ядрах яиц морских ежей (Burgos, 1955; Brachet, Ficq, 1956). Позже Хайнегарднер (Hinegardner, 1961) выделил ядра из яиц морских ежей *Echinometra mathaei* и продемонстрировал наличие в них ДНК. Содержание ДНК в ядре ооцита кузнечика, равное 4 с, показали цитофотометрическим методом Свифт и Клейнфельд (Swift, Kleinfeld, 1953).

В отличие от данных Маршак одновременно появились сообщения о громадном содержании ДНК в целых яйцах разных видов животных — амфибий (Hoff-Jorgensen, Zeuthen, 1952; Sze, 1953), кур (Hoff-Jorgensen, 1954; Solomon, 1957a, b), разных видов морских ежей (Elsson, Chargaff, 1952; Mazia, 1949; Vendrely, Vendrely, 1949; Zeuthen, 1951) и насекомых (Nigon, Dailler, 1958; Durante, 1955; Schultz, 1956). Определяемые различными методами количества ДНК в яйце оказались равны многим сотням и тысячам гаплоидных эквивалентов ДНК (табл. 1). Это противоречило общим представлениям о постоянстве содержания ДНК в хромосомах, на основании которых в яйцеклетке должно быть не более четырех гаплоидных эквивалентов (в соответствии с числом хромосом, возникших в результате подготовки к мейозу). Расчеты объема, который может занимать тотальная ДНК, пай-

Таблица 1

Содержание ДНК в яйцеклетках различных животных

Вид	Методы выделения и определения ДНК в яйце	ДНК в яйце, мкг	ДНК в ядре соматической клетки, мкг	ДНК в яйце, диплоидных эквивалентах	Источник
<i>Морские ежи</i>					
Paracentrotus lividus	Определение микробиол. методом тимины во фракции ДНК, выделяемой по методу Шмидта и Таннгаузера	$2,6 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-6}$	13	Elsson, Chargaff, 1952
Strongylocentrotus lividus	Определение по поглощению в УФ и дезоксирибозе во фракции ДНК, выделяемой центрифугированием в CsCl и обработанной амлазой	$3,1 \cdot 10^{-6}$	—	—	Piko et al., 1967
Lytechinus pictus	То же	$8,3 \cdot 10^{-6}$	$1,8 \cdot 10^{-6}$	4,6	Piko et al., 1967
Arbacia acqutuberculata	Определение по дезоксирибозе во фракции ДНК, выделяемой по методу Шмидта и Таннгаузера	$2,2 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-6}$	170	Vendrely, Vendrely, 1949
Arbacia lixula	Определение микрофлуорометрическим методом во фракции ДНК	—	—	12	Baltus et al., 1965
<i>Насекомые</i>					
Дрозofiла	Определение флуорометрическим методом во фракции ДНК, выделенной по методу Шмидта и Таннгаузера	$4,9 \cdot 10^{-3}$	$4,8 \cdot 10^{-6}$	10^3	Tsien, Wattiaux, 1971; Patterson, et al., 1954
	Определение микробиологическим методом			$5 \cdot 10^2$	Schultz, 1956
<i>Черви</i>					
Urechis caupo		$1 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-6}$	5	Schwartz, 1970

Таблица 1 (продолжение)

Вид	Методы выделения и определения ДНК в яйце	ДНК в яйце, мкг	ДНК в ядре соматической клетки, мкг	ДНК в яйце диплоидных эквивалентах	Источник	
<i>Рыбы</i>						
Осёр	Определение по дезоксирибозе в кислотонерастворимой фракции, выделенной по методу Шмидта и Таннгаузера	$1,8 \cdot 10^{-1}$	$4,6 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^4$	Шмерлинг, 1965	
Вьюн <i>Misgurnus fossilis</i>	Определение микробиологическим методом	$5,8 \cdot 10^{-3}$	$4,8 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^3$	Тимофеева, 1967	
Форель <i>Salmo irideus</i>	Определение по поглощению при 260 нм во фракции ДНК, выделяемой по методу Огура и Розена	2,5	—	—	Hagenmaier, 1969	
<i>Амфибии</i>						
34	<i>Triturus alpestris</i>	Определение по поглощению при 260 нм во фракции ДНК, выделяемой по методу Огура и Розена	2,4	—	—	} Chen, 1960
	<i>Triturus cristatus</i>	То же	1,1	$4,5 \cdot 10^{-5}$	—	
	<i>Triturus palmatus</i>	»	1,5	—	—	
	<i>Triturus pyrrhogaster</i>	Определение микробиологическим методом	$2,7 \cdot 10^{-2}$	—	—	Kuriki, Okazaki, 1959
	<i>Bufo vulgaris</i>	То же	$3,2 \cdot 10^{-2}$	$7,3 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^3$	Grant, 1958
	<i>Rana pipiens</i>	»	$2,2 \cdot 10^{-2}$	$15 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^3$	Grant, 1958
<i>Rana pipiens</i>	Определение по дезоксирибозе во фракции ДНК, выделяемой по методу Шмидта и Таннгаузера	$9,6 \cdot 10^{-1}$	$13 \cdot 10^{-6}$	$7 \cdot 10^4$	Sze, 1953	
<i>Rana pipiens</i>	Определение в кислотонерастворимой фракции по дезоксирибозе по сумме нуклеотидов микробиологическим методом по тимину	$2,2 \cdot 10^{-1}$ $7,2 \cdot 10^{-2}$ $4,0 \cdot 10^{-2}$	$9 \cdot 10^{-6}$ $9 \cdot 10^{-6}$ $9 \cdot 10^{-6}$	$2,5 \cdot 10^4$ $8 \cdot 10^3$ $4 \cdot 10^3$	} Bieber et al., 1959	

Таблица 1 (окончание)

Вид	Методы выделения и определения ДНК в яйце	ДНК в яйце, мкг	ДНК в ядре соматической клетки, мкг	ДНК в яйце в диплоидных эквивалентах	Источник
35 <i>Rana pipiens</i> <i>Xenopus laevis</i>	Определение в экстракте из кислото-нерастворимой фракции по поглощению при 260 нм				Bieber et al., 1959
	спиртонерастворимая фракция	$3,5 \cdot 10^{-2}$	$9 \cdot 10^{-6}$	$3,5 \cdot 10^3$	
	спирторастворимая фракция	$2,1 \cdot 10^{-1}$	$9 \cdot 10^{-6}$	$2,1 \cdot 10^4$	Dawid, 1965
	Определение по дезоксирибозе в кислото-нерастворимой фракции	$8,4 \cdot 10^{-3}$	$15 \cdot 10^{-6}$	$5,6 \cdot 10^2$	
	Определение по поглощению при 260 нм во фракции ДНК, выделенной центрифугированием в CsCl	$3,6 \cdot 10^{-3}$	$15 \cdot 10^{-6}$	$2,4 \cdot 10^2$	
	Определение по дезоксирибозе в кислото-нерастворимой фракции	$6,6 \cdot 10^{-3}$	$6,3 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^3$	
	Определение по поглощению при 260 нм во фракции ДНК, выделенной центрифугированием в CsCl	$3,1 \cdot 10^{-3}$	$6,3 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^2$	
<i>Птицы</i>					
Курица	Определение методом изотопного разведения во фракции, выделенной по методу Огура и Розена	360	$2,0 \cdot 10^{-6}$	$1,8 \cdot 10^8$	Solomon, 1957

деншая в яйце, показали, что он гораздо больше объема женского пронуклеуса (Hoff-Jorgensen, Zeuthen, 1952; Sze, 1953). Отсюда Хоф-Иоргенсен и Цейтен пришли к заключению, что по крайней мере часть ДНК сосредоточена в цитоплазме. Это предположение они подтвердили в опытах, в которых ДНК была обнаружена в ооцитах лягушки с удаленными ядрами (Hoff-Jorgensen, Zeuthen, 1952).

«Избыточной» ДНК, которую обнаруживали в цитоплазме яйцеклеток, приписывали чисто вспомогательные функции запаса, «строительного материала», который используется в развитии для построения ядерной ДНК в увеличивающемся числе клеток зародыша. В пользу этого свидетельствовали данные, казалось бы говорившие об отсутствии прироста ДНК в зародыше на ранних стадиях развития, несмотря на интенсивное новообразование ядер в ходе делений дробления (Gregg, Lovtrup, 1955; Steinert, 1951; Hoff-Jorgensen, Zeuthen, 1952; Agrell, Person, 1956; Chen, 1960). Предполагалось даже, что запасы ДНК могут использоваться путем встраивания целых блоков цитоплазматической ДНК в хромосомы ядер (Moore, 1959).

Эти гипотезы в настоящее время имеют лишь исторический интерес, но потребовалось десятилетие на пересмотр этого экспериментального материала, и только развитие новых методов выделения, фракционирования и анализа ДНК позволило решить вопрос о содержании, локализации и функции ДНК яиц совершенно по-иному.

Вместе с тем пионерские исследования, предпринятые в 50-х годах, сыграли существенную роль в возникновении интереса к цитоплазматической ДНК, а также в развитии исследований цитоплазматической наследственности, генетической независимости цитоплазматических структур и т. д.

Содержание ДНК в яйце

Количество ДНК в яйцах разных животных коррелирует с размерами этих яиц. В маленьких яйцах морских ежей оно равно нескольким пг. По данным Пико и др. (Piko et al., 1967), в яйце *Strongylocentrotus lividus* содержится $3,3 \pm 0,3$ пг, в яйце *Lytechinus* — $8,3 \pm 0,3$ пг. Более высокие значения были получены другими авторами, которые использовали различные химические и микрофлуорометрические методы определения (Vendrely, Vendrely, 1949; Elsson, Chargaff, 1952; Sugino et al., 1960; Baltus et al., 1965; Vibring et al., 1965). Измерению содержания ДНК мешают примеси полисахаридов, которые имеются в яйцах иглокожих. В работе Пико и др. (Piko et al., 1967) была разработана специальная процедура очистки ДНК от них, которая заключается в обработке гомогената 4%-ным додецилсульфатом натрия, затем отделении ДНК центрифугированием в CsCl, переваривании полисахаридов в полученных препаратах ДНК α -амилазой и выделении

чистой ДНК центрифугированием в CsCl. При таком методе очистки химический дифениламинный метод и определение количества ДНК по оптической плотности растворов при 260 нм давали сходные значения. В ходе выделения не происходило потерь ДНК. Это контролировали методом изотопного разведения. Для этого меченый тимидин вводили самкам *Lytectinus* и яйца выделяли через 2 месяца после введения изотопа. ДНК из таких яиц была меченой, и если процедуру очистки вели с добавлением определенных количеств такой меченой ДНК, то потери метки не происходило. Полученные значения количества ДНК — 3 и 8 пг на яйцо у двух видов морских ежей авторы считают вполне достоверными.

Столь же небольшое, как у морских ежей, количество ДНК было определено с использованием тех же приемов в яйцеклетках млекопитающих и червей. У мыши, например, оно равно 8 пг (Piko, 1975), т. е. примерно в два-три раза превышает гаплоидный эквивалент в ядре. В зрелом ооците морского эхиуронного червя *Urechis caupo* содержится 10 пг ДНК (Schwartz, 1970).

В яйцах насекомых, которые по размеру значительно больше яиц морских ежей, содержание ДНК также на несколько порядков больше (Schultz, 1956; Tsien, Wattiaux, 1971). У дрозофилы оно составляет 4,9 пг, причем эта величина колеблется в зависимости от возраста самки; у молодых и старых она больше (6 пг), у самок среднего возраста меньше (3—4 пг) (Tsien, Wattiaux, 1971). Еще больше ДНК содержится в крупных яйцах рыб и амфибий (от 0,003 мкг до нескольких микрограммов). Полученные величины в значительной степени зависят от метода определения, и поэтому даже для одного и того же вида они колеблются в довольно широких пределах: например, у лягушки *R. pipiens* — от 0,22 до 0,004 мкг. Как и у морских ежей, большие запасы в яйцах рыб и амфибий белков, полисахаридов, от которых нелегко избавиться при фракционировании материала, существенно влияют на определение в этих объектах ДНК. Вероятно, методы фракционированного выделения ДНК Шмидта и Таннгаузера и Огура и Розена (см. табл. 1) с последующим определением ДНК по оптической плотности при 260 нм или цветной дифениламинной реакцией не могут быть использованы в применении к этим объектам. Необходимо также учитывать возможность бактериального загрязнения. Например, по данным Шмерлинг (1965), обработка яиц осетра трипсином и раствором дедецилсульфата натрия, позволяющая убирать бактерии с поверхности яиц, в пять раз уменьшает определяемое в яйцах количество ДНК.

Более специфическим является микробиологический метод с использованием дефицитного по тимину штамма молочнокислых бактерий *Lactobacillus*. Этим методом можно определять содержание ДНК в нефракционированном материале. Необходимо, однако, вносить поправку на содержание тиминных нуклеотидов, которое в яйце может быть значительным. Количество ДНК в яйце,

определяемое микробиологическим методом, как правило, ниже, чем определяемое химическими методами, и, вероятно, ближе всего к истинным величинам.

Для определения ДНК в яйцах двух видов лягушки — ксенопуса и *Rana ripiens* — Давид (Dawid, 1965) проводил предварительное фракционированное выделение высокополимерных препаратов ДНК и очистку их центрифугированием в градиенте CsCl. Полученные при этом величины были значительно ниже тех, о которых сообщали другие авторы (см. табл. 1). Возможно, что при таком методе определения ДНК в яйце не была учтена часть трудноэкстрагируемого, или низкополимерного материала, например, ДНК желточных пластинок (Nanosq-Quertier et al., 1970). У птиц, яйца которых очень крупные, количество ДНК измеряется в сотнях микрограммов. В куриных яйцах, например, по данным Соломона (Solomon, 1957a, b), содержится 360 мкг ДНК.

Ядерная ДНК

Количество ДНК, обнаруживаемое в яйцах различных животных, во много раз превосходит диплоидный эквивалент, т. е. содержание ДНК в наборе хромосом ядер соматических клеток (см. табл. 1). Соответствующие расчеты показывают, что этот избыток ДНК составляет 0,5—5 диплоидных эквивалентов в яйцах млекопитающих, червей, морских ежей, сотни эквивалентов — у насекомых, тысячи — у амфибий и рыб и миллионы — у птиц (см. табл. 1).

Содержание хромосомной ядерной ДНК в мужских половых клетках — спермиях — равно гаплоидному количеству. В яйцах различных животных содержание ядерной ДНК колеблется от 1с до 4с в соответствии с тем, на какой стадии мейоза находится ядро. В ядрах зрелых яиц морских ежей, закончивших мейотическое деление, содержание ДНК равно гаплоидному (Hinegardner, 1961). В изолированных ядрах зрелых ооцитов лягушки — диплоидное количество ДНК (England, Mayer, 1957). Неоплодотворенная яйцеклетка мыши находится на метафазе второго деления созревания и содержит диплоидное количество ДНК (Alfert, 1950).

В зрелом яйце рыб и амфибий морфологически оформленного ядра нет. После растворения оболочки зародышевого пузырька в процессе овуляции проходят деления мейоза; в зрелом яйце часть ДНК находится в виде конденсированного первого полярного тельца, другая часть — 2с — ядерной ДНК заключена в хромосомы второго деления мейоза.

Таким образом, в мелких яйцах млекопитающих, червей, иглокожих хромосомная ДНК составляет $\frac{1}{3}$ — $\frac{2}{3}$ ДНК яиц, в крупных яйцах рыб, амфибий и птиц это ничтожная часть суммарной ДНК яиц. Остальная часть ДНК яиц находится в цитоплазме. Впервые в работе Хоф-Йоргенсена и Цейтена (Hoff-Jorgensen,

Zeuthen, 1952) на ооцитах лягушки и в работе Бальтуса и др. (Baltus et al., 1965) на яйцах морских ежей была показана локализация ДНК в цитоплазме. В работе Хоф-Иоргенсена и Цейтена это было продемонстрировано на ооцитах лягушки с удаленным ядром. Бальтус и др. разделяли яйцо морских ежей на ядерную и безъядерные половины центрифугированием в ступенчатом градиенте сахарозы и показали, что ДНК содержится и в тех и в других половинах яиц. ДНК, выделенная из безъядерных половин, по седиментационным характеристикам при центрифугировании в CsCl (т. е. по плавучей плотности) не отличалась от ДНК из ядерных половин (Baltus et al., 1965). Как было показано в дальнейших работах, цитоплазматическая ДНК сосредоточена в митохондриях и желточных гранулах.

ДНК митохондрий

Митохондриальная ДНК — один из главных компонентов ДНК ооцитов и зрелых яиц. Функция ее связана с поддержанием наследственной непрерывности митохондрий и через них с обеспечением энергетического обмена клетки. Она играет главную, если не единственную, роль в определении цитоплазматической наследственности.

Количество митохондриальной ДНК (мтДНК) в яйцах различных животных варьирует от одного до многих сотен и даже тысяч гаплоидных эквивалентов (Dawid, 1966; Piko, Matsumoto, 1976), т. е. равно или во много раз больше количества ядерной ДНК. Таким образом, соотношение ядерной и митохондриальной ДНК в яйце резко отличается от соотношения их в соматической клетке, в которой ДНК митохондрий обычно не превышает процента от ДНК ядра (Nass, 1969). Это связано с образованием в оогенезе значительных запасов митохондрий, количество которых рассчитано на многие сотни и тысячи клеток. Если в соматических клетках $2-5 \cdot 10^4$ митохондрий (Nass et al., 1965), то электронномикроскопически было показано, что в ооците вьюна на стадии большого роста имеется $1,2 \cdot 10^7$ митохондрий (Озернюк, Пальмбах, 1975). Даже в мелких яйцах млекопитающих содержится $9,2 \cdot 10^4$ митохондрий (Piko, Matsumoto, 1976), в яйцах морских ежей $2 \cdot 10^5$ митохондрий (Piko et al., 1967).

Структура, нуклеотидный состав. ДНК митохондрий представляет собой циркулярные сверхскрученные молекулы (Nass, 1969; Vorst, 1972; см. Гаузе, 1977). В составе митохондрии она не связана с гистонами и не образует структуры типа хромосом. Исследование митохондриальных ДНК (мтДНК), проводимые с помощью электропной микроскопии, показали, что в препаратах мтДНК, выделенных из яиц, имеются разные формы кольцевых структур: открытые, ковалентно замкнутые (сверхскрученные), мономерные и олигомерные формы. У амфибий каждая молекула мтДНК — лишь одно кольцо (мономер) (Dawid, Wolstenholme,

1967). В мтДНК яиц морских ежей и млекопитающих обнаружены так называемые конкатенаты или олигомерные формы (Piko et al., 1968; Piko, Matsumoto, 1976). Основную часть их составляют димеры (11% у морских ежей и 7,5% у мышей), но имеются также тримеры (2—3%), тетрамеры (0,3—0,4%) и даже пента- и гексамеры (0,2% у мышей). Содержание таких олигомерных (цепочечных, конкатенатных) форм мтДНК в нормальных соматических клетках зависит от состояния клеток: в период активного роста и при некоторых видах рака (Nass, 1969b; Glayton et al., 1970) их количество увеличивается.

По суммарному нуклеотидному составу ДНК митохондрий может существенно отличаться от хромосомной ядерной ДНК или быть к ней очень близкой. Это выявляется с помощью центрифугирования в градиенте CsCl. У морского червя *Urechis caupo* плавучая плотность мтДНК и ДНК ядра одинакова и равна 1,699 (Dawid, Brown, 1970). У аскариды *Ascaris lumbricoides* плавучая плотность ДНК ядер равна 1,697, у мтДНК — 1,685 (Bielka et al., 1968). Большие различия найдены Пико у морских ежей (на 0,01 г/см³). Так, плотность ядерной ДНК *Strongylocentrotus purpurus* равна 1,693, мтДНК — 1,703 (Piko et al., 1967). Однако у другого вида *Lylechinus variegatus* ДНК ядер и митохондрий имеет одинаковую плотность — 1,693 (Hartman et al., 1971). Такие же колебания имеются у амфибий и млекопитающих. Ядерная и мтДНК лягушек ксенопуса и *Rana ripiens* не разделяются при центрифугировании в CsCl. Плотность этих ДНК равна 1,702—1,704 (Dawid, Wolstenholme, 1967, 1968). У двух других представителей амфибий аксолотлей *Siredon mexicanum* и *Necturus maculosus* различия между плотностью мтДНК и ядерной ДНК составляют 0,007 г/см³ (Wolstenholme, Dawid, 1968). У человека и птиц значения плавучей плотности ядерных ДНК значительно отличаются от таковых мтДНК (Bost, 1972).

Из величин плавучей плотности ДНК можно определить ее ГЦ-состав (Schildkraut et al., 1962). Как видно из табл. 2, содержание ГЦ-пар в мтДНК наименьшее у насекомых и аскариды (21—25%). У других организмов содержание ГЦ-пар колеблется от 35 до 45%. В целом же видно, что по нуклеотидному составу мтДНК относится к АТ-типу. В составе мтДНК обнаружено минорное основание 5-метилцитозин. Его содержание, по данным Б. Ф. Ванюшина и М. Д. Кириоса (Vanyushin, Kirnos, 1974) составляет около 2%, что соответствует приблизительно 300 остаткам 5-МеЦ на одну кольцевую молекулу мтДНК.

Различия в суммарном нуклеотидном составе мтДНК разных животных не свидетельствуют о полном различии их по первичной структуре, т. е. нуклеотидной последовательности. Сравнение мтДНК из разных источников методом гибридизации показало, что даже у животных разных классов обнаруживается определенная гомология в последовательности. При совместном отжиге денатурированных мтДНК червя и цыпленка (Dawid, Brown,

Таблица 2

Содержание ГЦ-пар в мтДНК из яиц и зародышей разных животных по данным плавучей плотности

Источник мтДНК	ρ CsCl, г/см ³	ГЦ, %	Источник
<i>Морские ежи</i>			
<i>Strongylocentrotus nudus</i>	1,703	43	Pico et al., 1967
<i>Lytechinus variegatus</i>	1,693	33	Hartman et al., 1971
<i>Насекомые</i>			
Дрозофила	1,681	21	Сэджер, 1975
<i>Черви</i>			
Аскариды	1,685	25	Bielka et al., 1968
Эхиуroidы	1,699	39	Dawid, Brown, 1970
<i>Рыбы</i>			
Вьюн	1,707	47	Гаузе, 1977
<i>Амфибии</i>			
<i>Xenopus laevis</i>	1,704	44	} Wolstenholme, Dawid, 1967, 1968
<i>Rana pipiens</i>	1,702	42	
<i>Siredon mexicanum</i>	1,695	35	
<i>Necturus maculosus</i>	1,695	35	

1970; Dawid, 1972b), ксенопуса и цыпленка (Dawid, Wolstenholme, 1968) и двух видов ксенопуса *X. mulleri* и *X. laevis* (Dawid, 1972b) образуются гибридные молекулы. Это легко тестируется с помощью центрифугирования в градиенте CsCl, так как денатурированные односпиральные ДНК имеют большую плотность, чем двуспиральные ДНК (нативные, ренатураты или гибриды). Степень гомологии, однако, невелика. Даже у близких видов ксенопуса (Dawid, 1972b) она не превышает 20%. Наличие частичной гомологии между мтДНК разных животных отражает, по-видимому, сходство в нуклеотидных последовательностях (консерватизм) рибосомных генов, а также генов транспортных РНК митохондрий. Напротив, различия связаны с дивергенцией последовательностей «спейсеров», т. е. участков мтДНК, лишенных кодирующих функций (Dawid, 1972b). Степень дивергенции структурных генов мтДНК еще остается не исследованной. Сравнение методом гибридизации мтДНК и ядерной ДНК показало, что даже взятые от одного животного эти ДНК практически не образуют гибридов. При совместном отжиге ренатурируют только мтДНК, ядерная же ДНК остается в виде односпиральных молекул (Dawid, Wolstenholme, 1968). Это говорит о том, что гомология в нуклеотидной последовательности между мтДНК и ядерной

ДНК практически очень незначительна или отсутствует. Не обнаружена также гомология между мтДНК животных и дрожжей (Dawid, Wolstenholme, 1968).

Генетическая автономия мтДНК. Измерение контурной длины кольцевых молекул мтДНК на электронномикроскопических фотографиях позволяет определить молекулярный вес. Длина ДНК в 1 мк соответствует $1,96 \cdot 10^6$ дальтон (Wilkins, 1963). Длина молекул мтДНК колеблется у разных видов животных от 4,5 до 5,9 мк, причем внутри одного вида колебания очень малы — 0,5—0,6 мк, а между животными разных видов эти колебания иногда значительны, так что при смешивании мтДНК двух видов частота распределения длин молекул дает два отчетливых максимума, соответствующих длине мтДНК этих видов. Например, у амфибий средняя длина молекул мтДНК лягушек ксенопуса и *Rana pipiens* равна 5,8—5,9 мк, а аксолотлей *Siredon mexicanum* и *Necturus maculosus* — 4,8—4,9 мк (Wolstenholme, Dawid, 1968). У морских ежей *Strongylocentrotus nudus* и *Lytechinus variegatus* длина молекул мтДНК равна соответственно 4,5 и 5,4 мк (Piko et al., 1967; Hartman et al., 1971). Соответствующие различия имеются и в молекулярных весах — от 8,8 до $11 \cdot 10^6$ дальтон. Суммарная длина у олигомерных форм мтДНК кратна длине одной мономерной кольцевой молекулы, что свидетельствует об образовании таких молекул олигомеров или конкатенатов путем множественной репликации без разделения на мономеры.

Генетические потенции каждой молекулы мтДНК с молекулярным весом 10^7 дальтон ($1,5 \cdot 10^4$ нуклеотидных пар) очень невелики. Они равны примерно 10—12 генам размером в $1—1,5 \cdot 10^3$ н. п. каждый, или 40—50 генам меньшего размера. Значащей в мтДНК является преимущественно тяжелая Н-цепь (Dawid, 1970; Attardi et al., 1973).

На ооцитах ксенопуса (Dawid, 1970, 1972a) и клетках HeLa человека (Attardi et al., 1965, 1973) было показано, что мтДНК кодирует синтез РНК белоксинтезирующего аппарата митохондрий. Каждая молекула содержит один ген 16S и один ген 12S РНК митохондриальных рибосом (молекулярный вес этих рРНК равен $0,53 \cdot 10^6$ и $0,36 \cdot 10^6$ дальтон). Гибридизацией в условиях насыщения рРНК установлено, что им соответствует 18—20% мтДНК ксенопуса (Dawid, 1970, 1972a) или 20% мтДНК HeLa (Attardi et al., 1973). 3% всей мтДНК ксенопуса и 4% Н-цепи мтДНК клеток HeLa гибридизуются с фракцией низкомолекулярных РНК митохондрий, в которую входят 5S рРНК и тРНК. Кроме того 3 гена тРНК локализованы в Л-цепи мтДНК (Attardi et al., 1974). Обнаруживаемые тРНК митохондрий действительно являются транскриптами с мтДНК, а не примесью цитоплазматических тРНК, имеющих последовательности, гомологичные мтДНК. Доказательством этому является чувствительность синтеза тРНК к бромистому этидию (Zylber, Penman, 1969), который блокирует транскрипцию мтДНК митохондриальной РНК-полимеразой.

Количество генов тРНК в молекуле мтДНК точно не установлено: возможно, что оно может варьировать у разных организмов. Неизвестно также, какие именно тРНК представлены в митохондриальном геноме. По расчетам Давила (Dawid, 1972a), в одной молекуле мтДНК ксенопуса имеется 15 генов тРНК. Митохондрии обладают специфичным для них набором тРНК. Эти тРНК по акцепторным свойствам и первичной структуре отличаются от тРНК цитоплазмы. Среди тРНК митохондрий обнаружена формилметиониновая тРНК, участвующая в инициации синтеза белка только в митохондриях (см. Гаузе, 1977).

Помимо генов РНК белоксинтезирующего аппарата, в мтДНК имеются последовательности, комплементарные митохондриальным рибосомным РНК. У ксенопуса, например, эти последовательности составляют 16% мтДНК (Dawid, 1970). Природа таких РНК не установлена, по-видимому, они являются мРНК некоторых субъединиц митохондриальных ферментов, синтез которых контролируется собственным геномом митохондрий (Schatz, 1975).

Предполагается, что мтДНК кодирует некоторые субъединицы таких специфичных митохондриальных ферментов, как цитохром-оксидаза и олигомицин-чувствительная аденозинтрифосфатаза.

Анализ с помощью гибридизации полиА-содержащих РНК из митохондрий с мтДНК показал, что восемь разных фракций таких РНК имеют гомологию с мтДНК, т. е. кодируются геномом митохондрий (Ojala, Attardi, 1974).

По данным Аттарди и сопр. (Attardi et al., 1975; Attardi, Attardi, 1971), транскрибируются обе Н- и L-цепи мтДНК, при этом сначала синтезируются высокомолекулярные транскрипты, которые затем подвергаются процессингу с образованием рРНК, тРНК и других функционально значимых РНК митохондрий. Таким образом, показано, что у HeLa происходит симметричная транскрипция мтДНК. В ходе процессинга элиминируется часть последовательностей, соответствующих «спейсерам». По данным Давида (Dawid, 1972a), около трети последовательностей мтДНК не представлено в РНК, функционирующих в митохондриях.

Последовательности мтДНК достаточно консервативны в пределах одного вида, так что ДНК всей популяции митохондрий одной клетки, даже такой большой, как ооцит, или клеток разных тканей и даже разных животных этого вида практически одинаковы (Dawid, 1972b). Это было показано в опытах по ренатурации мтДНК — образующиеся ренатураты не имеют областей неправильного спаривания. Напротив, мтДНК разных видов животных хотя и способны ренатурировать, но ренатурированные молекулы плавятся при низких температурах, и в электронном микроскопе можно видеть, что значительная часть последовательностей ДНК не вовлечена в гибриды. Совместный отжиг мтДНК ооцитов двух близких видов ксенопуса *X. laevis* и *X. mulleri* приводит к ренатурации только 70% последовательностей ДНК.

Из них у 50% молекул не спарена четвертая часть всех оснований, только 20% последовательностей образуют гетеродуплексы с малым числом неспаренных оснований (6%) (Dawid, 1972b). Все это дало основание предположить, что у ксенопуса дивергенция мтДНК в ходе эволюции видов идет быстрее, чем ядерной ДНК (Dawid, 1972b), и это является результатом того, что митохондрии как множественные структуры клетки подвергаются большему, чем ядерная ДНК, числу генераций (циклов репликации), способствующему накоплению мутаций. Все это, однако, не объясняет механизма, с помощью которого поддерживается сходство мтДНК в огромной популяции особей внутри одного вида, и образования видоспецифических различий мтДНК в ходе эволюции видов.

Биогенез мтДНК. На простейших организмах-эукариотах, таких как дрожжи (Bolotin et al., 1971) и нейроспора (Diacumakos et al., 1965; Reich, Luck, 1966), было показано, что многие наследственные свойства митохондрий передаются не через ядро, а через цитоплазму. Для высших организмов строгих доказательств в пользу цитоплазматического пути не получено. С другой стороны, имелись свидетельства относительно участия в биогенезе митохондрий хромосомной ДНК. Гибридизацией мтДНК с ядерной ДНК было обнаружено наличие в ядерной хромосомной ДНК небольшого числа последовательностей гомологичных мтДНК. Исходя из молекулярного веса мтДНК и степени гибридизуемости с нею ядерной ДНК, можно рассчитать число локусов (копий) митохондриального генома, присутствующих в ядерном геноме. По данным Борста и Круна (Borst, Kroon, 1969), например в геноме цыпленка, имеется пять копий мтДНК. Гипотеза участия ядра в наследовании мтДНК привлекательна в том смысле, что она объясняет внутривидовой консерватизм нуклеотидной последовательности мтДНК, поскольку в этом случае вся образующаяся популяция молекул мтДНК является копиями нескольких локусов ядерной ДНК (принцип «хозяин» — «раб»). Однако опыты по гибридизации не очень доказательны, так как практически невозможно получить препараты ядер, совершенно свободные от примеси митохондрий. Поэтому при гибридизации с ядерной ДНК связывание может идти не столько с самими ядерными ДНК, сколько с ДНК митохондриальных примесей.

Новый подход к изучению наследования мтДНК был применен в работе Давида и Блэклера (Dawid, Blackler, 1972). Авторы использовали половые гибриды двух видов ксенопуса — *X. laevis* и *X. mulleri*. Митохондриальные ДНК этих видов в значительной степени различаются по первичной структуре, и методом гибридизации это можно выявить, даже если они находятся в смеси (Dawid, 1972). Прежде всего было показано, что в поколении F_1 у таких гибридов наследуется только мтДНК материнского типа. Затем проводилась гибридизация ядерной ДНК гибрида F_1 с мтДНК (вернее с РНК, полученной транскрипцией мтДНК in

vitro) исходных видов *X. mulleri* или *X. laevis*. В таком варианте, если наследование генома митохондрий идет только через цитоплазму, препараты ядерной ДНК гибрида F_1 *X. mulleri* ♂ и *X. laevis* ♂ должны быть загрязнены только материнскими мтДНК *X. mulleri*. Опыты показали, что гибридуемость ядерных ДНК гибрида F_1 с мтДНК *X. laevis* была не выше, чем гибридуемость в контроле, т. е. с ядерной ДНК исходного вида *X. mulleri*. Таким образом, наличие в ядре гибрида отцовских хромосом *X. laevis* не влияло на величину связывания, т. е. гибридуемости с мтДНК *X. laevis*. В то же время, если гибридизацию мтДНК *X. laevis* проводили с ядерной ДНК *X. laevis*, которая могла быть загрязнена цитоплазматической мтДНК *X. laevis*, связывание было значительным и по расчету соответствовало наличию примерно пяти копий мтДНК в геноме *X. laevis*. Авторы справедливо заключают, что эти результаты свидетельствуют в пользу цитоплазматического пути наследования мтДНК, а также об отсутствии в ДНК хромосом локусов, гомологичных мтДНК.

ДНК желтка

Наличие ДНК в желтке показано для разных животных — лягушек *Rana pipiens*, ксенопуса (Baltus et al., 1968; Hanocq-Quertier et al., 1968), тритонов (Baltus, Brachet, 1962; Ohno et al., 1964; Steinert, Van Gansen, 1971), морских ежей (Piko et al., 1967). По данным Бальтуса и др. (Baltus et al., 1968), у ксенопуса желточная ДНК составляет 65—75% цитоплазматической ДНК, в яйцах морских ежей ее не более $1/3$ ДНК яиц (Piko et al., 1967). Наличие ДНК в желточных пластинках амфибий было показано гистохимически по связыванию меченого актиномицина (Steinert, Van Gansen, 1971). Этот метод впервые использовали Браше и Фик для выявления ДНК в цитоплазме ооцита тритона (Brachet, Ficq, 1965). Кроме того, желточную ДНК определяли биохимически после выделения из яиц амфибий (Hanocq et al., 1972; Baltus et al., 1968). ДНК в желточных пластинках амфибий очень прочно соединена с фосфопротеиновыми компонентами (Baltus et al., 1968) и поэтому ее трудно экстрагировать из этих структур в высокополимерном состоянии. Только использование метода Кирби и Кука (Kirby, Cook, 1967) позволило выделить ДНК и получить ее характеристику (Baltus et al., 1968; Hanocq et al., 1972).

Электронномикроскопически было показано, что ДНК желточных пластинок представляет собой линейные структуры и этим отличается от циркулярных митохондриальных ДНК. Длина молекул колеблется от 0,67 до 22,6 мк, что соответствует молекулярному весу $1,3—43 \cdot 10^6$ дальтон. Суммарный нуклеотидный состав этой ДНК у ксенопуса и морских ежей практически совпадает с нуклеотидным составом ядерной и митохондриальной ДНК. Поэтому их не удастся разделить центрифугированием в градиен-

ге плотности CsCl, так как плавучая плотность (ρ) ДНК митохондрий, ДНК ядер и желточных пластинок одинакова. Вместе с тем ДНК желтка отличается от митохондриальной по сложности состава, что следует из сравнения скорости ренатурации этих ДНК. Так, если проводить отжиг денатурированных препаратов ДНК в условиях низких концентраций ДНК или в течение малого времени, то митохондриальная ДНК ренатурирует полностью, а желточная и ядерная ДНК в этих условиях практически не ренатурируют. Это подтверждено центрифугированием в CsCl, которое позволяет отделить одностратчатые денатурированные ДНК от двунитчатых ренатурированных ДНК (Hanocq et al., 1972). У аксолотля *Ambystoma mexicanum* плавучая плотность желточной ДНК (1,699) меньше, чем ядерной (1,704), и больше митохондриальной ДНК (1,696), следовательно, эти ДНК отличаются по нуклеотидному составу (Hanocq et al., 1972). Это позволяет заключить, что желточная ДНК представляет собой особый тип ДНК.

Происхождение и роль ДНК желтка неизвестны. Исследования в этом направлении ведутся в основном в лаборатории Браше. В этих работах показано, что на стадии вителлогенеза не происходит включения меченого тимидина в ДНК желточных пластинок ооцитов амфибий (Baltus et al., 1968), что позволило высказать предположение о наличии экзогенного источника желточной ДНК. Поскольку вителлогенин, синтезирующийся в печени, затем транспортируется через кровь к яичнику и избирательно ассимилируется ооцитами (см. главу 3), Браше предположил, что в этом процессе может участвовать ДНК. Он описывает (Brachet, 1969) значительные цитологические изменения клеток печени и эритроцитов в области кровяных синусов в печени, в том числе дегенеративные изменения ядер во время активного вителлогенеза у лягушки. Далее Браше считает, что ДНК в комплексе с липопротеидами может играть роль в определении анимально-вегетативной полярности яиц. Как он предполагает, это осуществляется путем сорбции ДНК-вителлогенинового комплекса специфическими рецепторами кортикального слоя ооцита, локализация которых строго определена.

Количество экстрагируемой желточной ДНК для яиц амфибий не всегда воспроизводимо (Hanocq et al., 1972). В некоторых случаях наблюдаются значительные потери. Считается, что это зависит от изменения содержания содержания дивалентных ионов (Mg^{2+} , Ca^{2+}) в яйце в период овуляции и прохождения яиц по яйцеводам. Ханок и др. ссылаются на свои неопубликованные данные о том, что выдерживание овулировавших ооцитов в растворе Рингера с $10^{-2} Mg^{2+}$ приводит к значительному снижению содержания ДНК во фракции желтка (Hanocq et al., 1972). Возможно, что в конце оогенеза происходит гидролиз части желточной ДНК, в результате чего пополняется пул низкомолекулярных предшественников ДНК — дезоксирибонуклеотидов, нужных для интен-

сивного синтеза ДНК после оплодотворения. Вместе с тем Браше не исключает активную роль ДНК как носителя генетической информации в резорбции желтка в ходе эмбриогенеза (Hanosq et al., 1972).

СИНТЕЗ ДНК В ООГЕНЕЗЕ

Ядерная ДНК ооцита

Репликация хромосомной ДНК происходит в самом начале оогенеза, в премейотической S-фазе (Fiscq, 1968; Gall, 1968; MacGregor, 1968). Затем дальнейшее прохождение мейоза блокируется на стадии диплотены профазы первого деления, и в течение всего оогенеза ядро остается диплоидным по числу хромосом, но каждая хромосома содержит удвоенное количество ДНК, так что суммарное ее содержание должно быть равно четырем гаплоидным эквивалентам (4с). Действительно, в ядре ооцита млекопитающих (Van-de-Kerckhove, 1959) и некоторых видов червей (Govaert, 1957) и насекомых (Milnard, 1954) найдено 4с ДНК.

Вместе с тем уже в ранних исследованиях на амфибиях было обнаружено, что ядро ооцита — зародышевый пузырек значительно больше по размеру ядер соматических клеток, и в нем содержится большее количество ДНК. В ооцитах лягушки *Rana pipiens* определяемое количество ядерной ДНК было в 100 раз больше (Haggis, 1966), а у тритона *Triturus viridescence* в 2 раза больше, чем 4с ДНК (Izawa et al., 1963b). Как и при определении суммарного содержания ДНК в яйце, величина этого «избытка» ядерной ДНК в значительной степени зависела от специфичности используемого метода. По наблюдениям Изава и др. (Izawa et al., 1963b), при использовании флуорометрического метода получаются данные примерно в 10 раз выше, чем при дифениламинном методе. Но даже после внесения соответствующих поправок на неспецифическую реакцию полученные цифры оказались слишком высокими. Содержание ДНК в хромосомах ооцита у тритона в расчете на диплоидный набор хромосом было в четыре раза больше, чем в эритроцитах ($0,39 \cdot 10^{-9}$ г в ооците и $0,089 \cdot 10^{-9}$ г в эритроцитах). Кроме того, ДНК была обнаружена в нуклеоплазме, и ее количество было равно содержанию в хромосомах — $0,8 \cdot 10^{-9}$ г. Таким образом, всего в ядре было найдено $1,4 - 1,5 \cdot 10^{-9}$ г ДНК (Izawa et al., 1963b).

Наличие избыточной ДНК в ядре ооцита по сравнению с соматическими ядрами подтверждено и в дальнейших исследованиях, в которых были использованы более современные методы анализа. Браун и Давид (Brown, Dawid, 1968) определяли содержание ДНК после выделения высокополимерных препаратов ДНК из ядер ооцитов и центрифугирования в CsCl. Было обнаружено, что действительное количество ДНК у аксолотлей *Siredon mexicanum* и *Necturus maculosus* в ядре ооцита на 20% больше, чем в ядрах эритроцитов. У лягушки ксенопус избыток в пять раз

больше, но авторы считают, что определенную часть его составляет примесь мтДНК за счет палипация митохондрий на поверхность ядерной мембраны. Главный результат этой работы заключался в том, что в составе ядерной ДНК обнаружена дополнительная фракция, которая при центрифугировании в градиенте CsCl выявлялась как тяжелый сателлит. Абсолютное количество этой сателлитной ДНК у исследуемых видов амфибий примерно одинаково. С помощью гибридизации показано, что в ее состав входят последовательности, комплементарные рРНК (Brown, Dawid, 1968). Это позволило предположить, что избыток ядерной ДНК ооцита представлен многочисленными копиями рибосомальных генов.

ДНК свободных ядрышек ооцита

Еще ранее было обнаружено, что в зародышевом пузырьке ооцитов разных видов амфибий содержатся многочисленные ядрышки (Wilson, 1928; Painter, Taylor, 1942). Такие же наблюдения имелись и на ооцитах рыб (Jamamoto, 1956; Сакун, 1961). Электронномикроскопическое изучение этих ядрышек показало, что они не связаны с хромосомами, а расположены на ядерной мембране (Miller, 1964, 1966). Структура ядрышек напоминает бусы, нить которых состоит из чувствительного к ДНКазе, а гранулы — чувствительного к РНКазе материала. Таким образом, компоненты свободных ядрышек сходны с компонентами хромосомных ядрышек соматических клеток. Кроме того, по включению меченого уридина и действию актиномицина D было показано, что в свободных ядрышках идет активный синтез РНК на матрице ДНК. Так как ядрышки соматических клеток представляют собой место синтеза рибосомных РНК (MacMaster, Taylor, 1958; Woods, Taylor, 1958) и в их структуру входит участок хромосомы — так называемый локус ядрышкового организатора, содержащий рибосомные гены — рДНК (Ritossa, Spiegelman, 1965; Birnstiel et al., 1968a, b), можно было думать, что те же функции выполняют и свободные ядрышки ооцита. Это нашло свое подтверждение в работах Гола, Пардю, Джонса, Бернстила и др. (Gall, Pardue, 1969; John et al., 1969). Методом гибридизации *in situ*, т. е. прямо на фиксированных цитологических препаратах, было показано, что свободные многочисленные ядрышки содержат ДНК, комплементарную рибосомной РНК.

Количество свободных ядрышек и их размеры в зародышевом пузырьке ооцита могут быть разными. Их много, например, у амфибий, у тритона *Triturus viridescens* — 600 (MacGregor, 1965), у аксолотля *S. mexicanum* — 1000 (Callan, 1966), у лягушки ксенопус — 1500 (Miller, 1966; Perkowska et al., 1968). Столь же большое их число в ооцитах рыб (Сакун, 1961; Чмилевский, 1971). Диаметр этих ядрышек колеблется от 0,4 до 1 мк.

У некоторых представителей морских беспозвоночных *Spisula solidissima* и *Urechis caupo* имеется одно, но сильно увеличенное

Таблица 3

Содержание «хромосомной» и «ядрышковой» ДНК в соматических ядрах и зародышевом пузырьке у четырех видов амфибий (в пг) (Brown, Dawid, 1968)

Вид	Хромосомная ДНК		«Ядрышковая» ДНК			
			в хромосомах		в зародышевом пузырьке	
	4с *	в зародышевом пузырьке **	тотальная	рДНК ***	тотальная	рДНК ***
<i>Xenopus laevis</i>	12,6	70	0,02 ****	0,014	25	5,3
<i>Sideron mexicanum</i>	140	170	—	0,16	13	5,5
<i>Necturus maculosus</i>	380	500	—	0,08	30	5,3
<i>Triturus viridescens</i>	178	—	—	0,16	—	8,5

Количество гаплоидного содержания ДНК в ядрах соматических клеток для *N. maculosus* определено дифениламиновым методом в эритроцитах, для *X. laevis* взято из работы Давида (Dawid, 1965), для *X. mexicanum* и *T. viridescens* из работ Эдстрёма (Edström, 1964) и Гола и Кэлана (Gall, Callan, 1962).

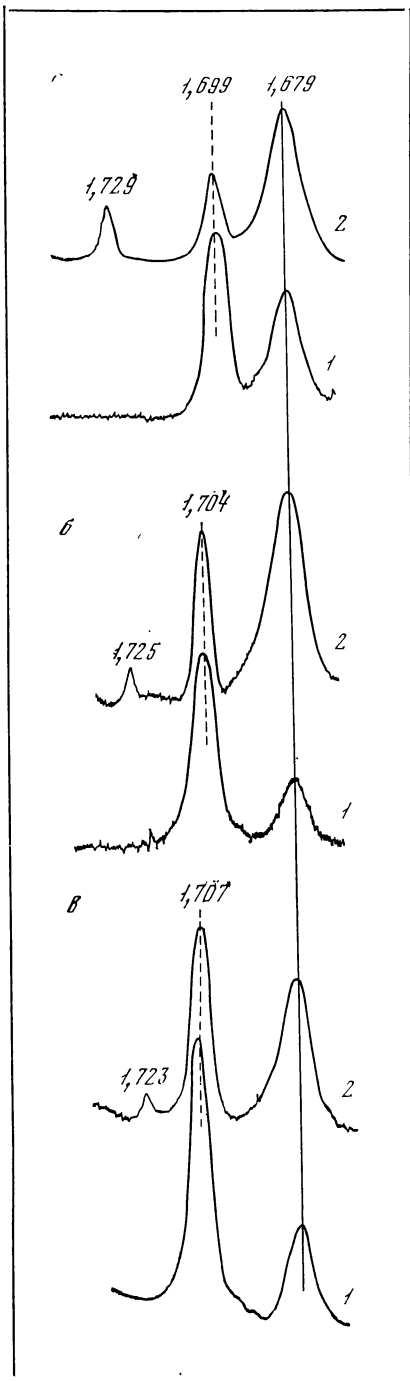
* Рассчитано исходя из поглощения при 260 нм фракции ДНК, полученной при центрифугировании. Внесена поправка на потерю при выделении и центрифугировании.

*** Рассчитано исходя из относительного содержания фракции ДНК, гомологичной рРНК, определенного в опытах по гибридизации.

**** Рассчитано исходя из данных Бернстила и др. (Birnstiel et al., 1968), в которых высокополимерная фракция, содержащая гомологичные рРНК последовательности, отделена центрифугированием в CsCl. Относительное содержание ее равно 0,15–0,2% от тотальной ДНК ядер.

в размере ядрышко (Brown, Dawid, 1968). У насекомых, например у сверчков, в ядрах ооцита имеется одно большое (первичное) ядрышко, окруженное многочисленными маленькими (вторичными) ядрышками (Lima-de-Faria et al., 1969). У амфибий ядрышки содержат одну или несколько (до четырех) кольцевых молекул ДНК, представляющих реплики с участка ядрышкового организатора (MacGregor, 1968), причем в одной молекуле неполная реплика и число ядрышек соответствует, а число кольцевых молекул намного больше количества копий ядрышкового организатора. Так, содержание рДНК в ядрах амфибий (Brown, Dawid, 1968) у трех разных видов *N. maculosus*, *S. mexicanum* и *X. laevis* практически одинаково — 5,3–5,5 пг рДНК (см. табл. 3). Это соответствует $7 \cdot 10^5$ копиям рибосомальных генов. Если в участке ядрышкового организатора хромосомы у ксенопуса имеется 450 генов рРНК (Brown, Weber, 1968), то общее число копий таких участков рано $1,5 \cdot 10^3$. Именно такое количество ядрышек обнаружено у ксенопуса. Однако количество кольцевых рДНК, определяемое в одном ядре ооцита, равно $5 \cdot 10^3$, т. е. значительно больше (Brown, Dawid, 1968). В ядрышке имеется от 8 до 1000 рибосомальных цистронов (см. Hough, Davidson, 1976).

ДНК свободных ядрышек ооцита отличается по плавучей плотности от ДНК ядрышек соматических клеток (Evans, Birn-



stiel, 1968; Birnstiel et al., 1968b; Brown, Dawid, 1968): у обычных соматических ядрышек плотность равна 1,723 г/см³, у ДНК ядрышек ооцитов — 1,729 г/см³ (рис. 1). Однако суммарное содержание ГЦ-пар одинаково у той и другой ДНК — 67%. Оказалось, что различия обусловлены разной степенью метилирования остатка цитозина: у соматических ядрышек метилировано 13% остатков цитозина, в ДНК свободных ядрышек метильные группы отсутствуют (Dawid et al., 1970).

Особенность строения ДНК ядрышек (отсутствие метилированности) и локализация их вне хромосом дали основания Уоллесу выдвинуть гипотезу об эписомном пути наследования ядрышек в ооците (Wallace et al., 1971). Аргументами в пользу этого служили и другие данные. Во-первых, относительное количество возникающих ядрышек в ядре ооцита не зависит от

Рис. 1. Обнаружение амплифицированных рибосомных генов в составе ДНК из ооцитов амфибий

ДНК выделяли из ядер соматических клеток (1) и зародышевых пузырьков ооцитов (2) трех видов амфибий: *X. laevis* (а), *S. mexicanum* (б), *N. maculosus* (в) и центрифугировали в градиенте плотности CsCl. Репером служил сополимер поли dA—dT с плавучей плотностью 1,679. Видно, что в соматических клетках ДНК (1) выявляется только один пик с плавучей плотностью 1,699 (у ксенопуса), у *S. mexicanum* — 1,704, у *N. maculosus* — 1,707. В ДНК зародышевых пузырьков ооцитов (2), кроме этого пика, имеется сателлит с плавучей плотностью 1,729—1,723. Гибридизацией с рРНК показано, что он содержит последовательности, комплементарные рРНК, т. е. соответствует рДНК (Brown, Dawid, 1968)

размера генома и числа ядрышковых организаторов. Например, у амфибий *S. mexicanum*, *N. maculosus* и *X. laevis*, размеры геномов которых отличаются в 10 и более раз (см. табл. 2), количество амплифицированных ядрышек очень близко — 1000—1500 штук. Количество ядрышек одинаково у одноядрышковых и двуядрышковых особей (Perkovska et al., 1968; Brown, Dawid, 1968). Все это предполагает наличие особого механизма регуляции процесса образования ядрышек. Вторым важным фактом явилось обнаружение ядрышек в ядре сперматогоний на начальных этапах сперматогенеза. В ходе дальнейшей дифференцировки во время прохождения

Таблица 4

Исследование природы рДНК свободных ядрышек у гибридов X. laevis и X. mulleri (Brown, Blackler, 1972)

Гибридизацию рДНК, выделенной из хромосом или свободных ядрышек, проводили со смесью ¹⁴C-РНК, транскрибированной с рибосомных генов *X. laevis*, и ³H-РНК, транскрибированной с рибосомных генов *X. mulleri* в присутствии и в отсутствие конкурента — рРНК *X. laevis*. Отношение ³H/¹⁴C отражает степень гомологии между генами *X. mulleri* и *X. laevis* и служит характеристикой рДНК ядрышек, образованных в оогенезе у гибрида F₁

Генетические комбинации двух видов ксенопуса (♀ × ♂)	³ H/ ¹⁴ C				Плавучая плотность рДНК свободных ядрышек, г/см ³
	хромосомная рДНК		рДНК свободных ядрышек		
	без конкурента	в присутствии рРНК <i>X. laevis</i>	без конкурента	в присутствии рРНК <i>X. laevis</i>	
<i>X. laevis</i> и <i>X. laevis</i>	0,22	0,06	0,26	0,04	1,729
<i>X. mulleri</i> и <i>X. mulleri</i>	1,21	1,97	1,6	5,1	1,727
<i>X. laevis</i> и <i>X. mulleri</i>	0,61	0,67	0,34	0,06	1,729
<i>X. mulleri</i> и <i>X. laevis</i>	0,72	0,70	0,28	0,05	1,729

мейоза ядрышки из спермия исчезают, и в ДНК зрелого спермия гибридизацией определяется лишь гаплоидное содержание рДНК (Brown, Blackler, 1972).

Согласно гипотезе Уоллеса, ядрышки в ооците образуются от одной или нескольких эписомоподобных структур, сохранившихся в клетках полового пути. При сперматогенезе ядрышки исчезают полностью, а в оогенезе по завершении созревания одно или несколько ядрышек сохраняются и после оплодотворения попадают в специальный участок яйца — половую плазму и затем в ядра клеток полового пути. Как видно, эписомный путь предполагает наследование ядрышек только через цитоплазму.

Гипотеза об эписомном пути наследования не получила однако подтверждения в работе Брауна и Блэклера (Brown, Blackler,

1972). Как и при изучении наследования мтДНК, авторы использовали два вида ксенопуса — *X. laevis* и *X. mulleri*, которые при скрещивании дают жизнеспособное потомство. Рибосомные гены этих видов различаются по первичной структуре спейсерных участков (последовательности, кодирующие рибосомные РНК, у них одинаковые) (Brown et al., 1972). Это проявляется в небольших различиях плавучей плотности рДНК ($1,729 \text{ г/см}^3$ у *X. laevis* и $1,727 \text{ г/см}^3$ у *X. mulleri*). Кроме того, это можно выявить путем гибридизации рДНК в присутствии немеченых рибосомных РНК, т. е. в условиях, когда тестируется степень гомологии только между спейсерными последовательностями (Wellauer, Reeder, 1975). Было показано, что у гибридов *X. laevis* и *X. mulleri* при любых комбинациях, т. е. даже в том случае, когда цитоплазма была от *X. mulleri*, а в ядре содержалась лишь половина хромосом от *X. laevis* (отцовские гены), а другая половина была от *X. mulleri* (материнские гены), ядрышки в ооцитах содержали только рДНК *X. laevis* (см. табл. 4). Эти опыты убедительно свидетельствуют об участии именно хромосом (в данном случае отцовских хромосом *X. laevis*) в образовании рДНК свободных ядрышек и о наследовании рДНК ядрышек не через цитоплазму, а по хромосомному пути (Brown, Blackler, 1972). Таким образом, образование многочисленных ядрышек в оогенезе отражает умножение рибосомных генов путем экстракопирования участка ядрышкового организатора хромосомы. Это явление получило название амплификации рибосомных генов, а свободные ядрышки называются сверхчисленными или амплифицированными ядрышками.

Амплификация рДНК

Амплификация рДНК происходит в оогенезе, причем чаще всего этот процесс заканчивается на самых ранних этапах оогенеза. У амфибий описано две фазы амплификации: первая — медленная, вторая — фаза активной амплификации. Первая фаза у ксенопуса это амплификация в оогониях и сперматогониях (Gall, Pardue, 1969; Wallace et al., 1971). Методом гибридизации *in situ* показано, что ядра этих клеток связывают больше меченой рРНК, чем ядра, соматических клеток (Gall, Pardue, 1969).

Общая продолжительность этого периода не меньше трех недель (премейотическая фаза — две недели, фаза лептотены — 3—7 дней, фаза зиготны — 5—9 дней; Watson — Coggins, Gall, 1971; Bird, Birnstiel, 1971). Вторая фаза, период активной амплификации, протекает на стадии пахитены первого деления мейоза, и большая часть исследований описывала именно этот процесс (Gall, 1968; Birnstiel et al., 1968a, b; MacGregor, 1968); он занимает 15 дней, после чего некоторое время продолжается амплификация, но с очень низкой скоростью (рис. 2).

Образование экстракопий рДНК (амплификация генов) и образование самих ядрышек может не совпадать по времени (Mac-

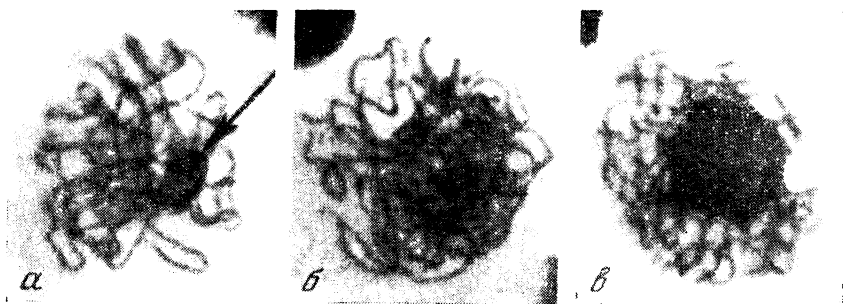


Рис. 2. Электронномикроскопическая микрофотография амплификации ядрышковой ДНК в оогенезе аксолотля

Видны три стадии образования амплифицированных рибосомных генов в виде темного образования. На каждой стадии рДНК тестировали гибридизацией с меченой рРНК *in situ* на цитологическом препарате (Gall, 1968)

Gregor, 1968). У ксенопуса во второй фазе амплификации сначала образуется масса экстракопий рДНК, которая имеет вид шапочки — «сар», интенсивно окрашиваемой по Фэльтгену. Затем происходит отшнуровывание самостоятельных ядрышек и их миграция к ядерной мембране. У жабы *Bufo bufo* экстракопии рДНК в комплексе с белком сразу мигрируют к ядерной мембране и там оформляются в виде ядрышек. У хвостатой лягушки *Ascaphus truei* на ранних этапах амплификации появляются отдельные малочисленные ядрышки, а затем образуются несколько огромных ядрышек диаметром 200 мк, содержащих по несколько сотен кольцевых экстракопий рДНК (MacGregor, 1968). Такие же данные получены и для амплификации ядрышек у рыб (Сакун, 1961; Чмилевский, 1971). У ерша (*Acrina cernua* L.), например, на стадии пахитены сначала появляется крупное ядрышко («первичное»), от которого затем отшнуровываются мелкие ядрышки (диаметром 1—3 мк) и прикрепляются к мембране ядер. В отличие от амфибий у этого объекта количество ядрышек увеличивается в течение всей фазы малого роста ооцита. Возможно, что амплификация рДНК заканчивается раньше, а на последующих стадиях до вителлогенеза идет только формирование самих ядрышек (Чмилевский, 1971).

Накопление рДНК в оогенезе описано и для ряда морских беспозвоночных — моллюсков *Spisula solidissima* (Brown, Dawid, 1968), *Mullinia lateralis* (Kidder, 1976) и червя *Urechis caupo* (Dawid, Brown, 1970).

Эти виды имеют в ооците одно увеличенное в размере ядрышко, но гибридизацией с рРНК было показано, что в ДНК ооцита содержание рДНК выше, чем в ДНК спермы: в пять раз у *Spisula lateralis*, в два раза у *Mullinia lateralis* и в 24 раза у *Urechis caupo*.

У таких беспозвоночных, как морская звезда *Asterias forbesii*, амплификации рДНК не происходит (Vincent et al., 1968), и это связано, по-видимому, с тем, что образование ооцитов идет за счет полиплоидных питающих клеток.

У нематоды *Panagrellus silusiae* (Pasternak, Haight, 1975) в оогенезе также образуется одно большое ядрышко, причем это увеличение ядрышка происходит во время созревания ооцита (по сравнению с ядрышком в клетках-оогониях оно увеличивается в 30 раз). К этой стадии созревания ооцита в зародышевом пузырьке, который также в 20 раз больше по объему, чем ядро оогоний, сперматогоний и соматических клеток, накапливается ДНК, избыточная по отношению к 4с ядерной ДНК обычных клеток. Прямых доказательств, что избыточная ДНК также является экстракопированными рибосомными генами, в работе нет. Авторы использовали только метод цитофотометрического определения размеров ядрышек, ядер и количественного определения ДНК (см. табл. 5). Однако по аналогии с другими беспозвоночными можно было думать, что речь идет об амплификации рДНК, но особенностью является то, что этот процесс резко сдвинут по времени к моменту окончания оогенеза.

В последующей работе это предположение не подтвердилось. Показано, что в ядре ооцита количество рДНК на гаплоидный набор не выше, чем в соматической клетке.

Среди насекомых амплификация рибосомных генов описана для сверчков *Acheta* (Lima-de-Faria et al., 1969; Hansen-Delkeskamp,

Таблица 5

Изменение содержания ДНК, объема ядрышек и ядер в сперматогенезе и оогенезе нематоды *Panagrellus silusiae* (Pasternak, Haight, 1975)

Стадия развития	Количество ДНК		Объем, мкм ³	
	усл. ед.	гапл. экв.	ядер	ядрышек
<i>Оогенез</i>				
Оогонии	1,48 ¹	2,1	5,9	1,95
Премейотическая фаза	3,12 ¹	4,5	7,05	3,76
Незрелые ооциты	3,84 ¹	5,7	10,11	5,96
Зрелые ооциты	9,66	14,3	78,71	13,99
Ооциты в яйцевом	26,76	38,2	96,03	30,35
<i>Сперматогенез</i>				
Сперматогонии	1,96	2,6	6,19	1,95
Премейотическая фаза	2,25	3,0	12,43	1,12
Сперматоцит первого порядка	3,0	4,0	24,66	5,22
Мейоз	—	—	—	13,02
Спермии	0,695	1,0	2,46	нет

1969; Cave, 1973; Lima-de-Faria, 1973). У этих организмов имеется два ядрышковых организатора на 6-й и 11-й хромосомах (Jaworska, Lima-de-Faria, 1973a; Cave, 1973, 1974). Эти участки отличаются по количеству рибосомальных генов (цистронов), самой структуре гена и организации участка хромосомы, подвергающейся амплификации. В 6-й хромосоме имеется три амплификона, организованных в виде хромомеров. В каждом рибосомном гене этой хромосомы последовательность, кодирующая 28S и 18S рРНК, составляет 7%, спейсерный участок — 93%. Такие гены образуют кластеры разных размеров: два кластера (хромомера) по 40 цистронов и один кластер меньшего размера — 18 цистронов. В 11-й хромосоме имеется два подобных амплификона, соответственно содержащих кластеры по 50 и 22 рибосомных цистрона. В каждом гене 10% соответствует рДНК и 90% — спейсерным участкам (Pero et al., 1973; Lima-de-Faria et al., 1973a, b; Lima-de-Faria, 1973). Общее число рибосомальных генов — 171 на гаплоидный набор (Pero et al., 1973). Хромосомы 6-я и 11-я начинают амплификацию в разное время мейотического цикла. При этом происходит образование утолщений типа пуффлов. Содержание ДНК в этих пуффлах в 100 раз выше содержания ДНК в локусе ядрышкового организатора соматических хромосом (Lima-de-Faria et al., 1973a, b) — $1,8 \cdot 10^9$ н.п. в 6-й хромосоме и $1,4 \cdot 10^9$ н.п. — в 11-й хромосоме вместо $2 \cdot 10^7$ н.п. и $1 \cdot 10^7$ н.п. в этих хромосомах в соматических клетках.

Освобождение экстракопий в ядерный сок также происходит в разное время. На стадии пахитены после активной амплификации экстракопии в виде отдельных ядрышек выделяются лишь из 11-й хромосомы. Освобождение ядрышек из 6-й хромосомы задерживается до стадии диплотены. На этой стадии можно различить основное крупное ядрышко (первичное ядрышко) и вторичные мелкие ядрышки как в ядерном соке, так и прикрепленные к ядерной мембране (Lima-de-Faria et al., 1973). Общее число экстракопий в зародышевом пузырьке, исходя из суммарного содержания ДНК в пуффлах обеих хромосом, равно 100 гаплоидным единицам (или около 16 тыс. генов) (Lima-de-Faria et al., 1973a, b). По данным Перо (Pero et al., 1973), методом гибридизации в ооцитах на стадии пахитены обнаружено пятикратное увеличение содержания рДНК (не более 800 генов). Однако с помощью центрифугирования в градиенте CsCl ДНК из ооцитов на стадии ранней пахитены обнаружено в 15 раз больше рДНК, чем в ДНК из спермиев (14% по сравнению с 0,8) (Lima-de-Faria et al., 1969). Эти различия, по-видимому, связаны с тем, что в ходе оогенеза образующиеся вторичные ядрышки выбрасываются в цитоплазму (Lima-de-Faria, 1973).

У сверчка не обнаружено хотя бы временной амплификации рДНК в сперматогенезе: в спермиях и сперматогониях найдено одинаковое относительное содержание рДНК (Pero et al., 1973; Lima-de-Faria et al., 1969).

Как и у моллюсков, у насекомых развитие ооцита которых идет с участием питающих клеток (например, у клопа *Oncopeltus fasciatus*), не происходит амплификации рибосомальных генов (Cave, 1974).

Механизм амплификации рДНК

Молекулярный механизм амплификации рибосомальных генов до конца еще не выяснен. Известно, что этот процесс носит каскадный характер; это выражается в том, что активность включения меченого тимидина в рДНК в единицу времени не постоянна, а сильно возрастает в процессе амплификации. Это означает, что первично образованные копии рибосомного оперона служат затем матрицами для последующего копирования, т. е. число матриц для копирования возрастает в геометрической прогрессии (MacGregor, 1968, 1972). В пользу этого свидетельствует и то, что имеется два периода амплификации, и в первый период скорость накопления рДНК мала, но она значительно усиливается во второй период. Получено много данных, позволяющих предположить, что амплификация рДНК идет по механизму катящегося кольца — «rolling circles» (Gilbert, Dressler, 1968; Bird et al., 1973; Rochaix et al., 1974; Hourcade et al., 1973a, b), т. е. многие копии образуются по одной циркулярной молекуле ДНК. При этом образуются однонитчатые копии вдоль циркулярной молекулы, в процессе синтеза реплика освобождается в виде линейной молекулы, на которой строится комплементарная ее цепь, а 3'-конец реплик служит затравкой для последующей репликации. Такие кольца с длинными присоединенными отрезками ДНК (хвостами) были обнаружены электронномикроскопически в препаратах ДНК из ранних ооцитов ксенопуса, находящихся на стадии амплификации рДНК. Отношение длины хвоста к контурному размеру кольца может меняться от 1 до 15 (Rochaix et al., 1974). Было показано, что размер молекул ДНК, образующих кольца, может быть разным — от $8 \cdot 10^6$ до $140 \cdot 10^6$ дальтон, большее число колец представлено молекулами размером в $40 \cdot 10^6$ дальтон. Так как размер одного рибосомального гена равен $8 \cdot 10^6$ дальтон, то самые маленькие кольца, вероятно, соответствуют 1 цистрону, а большие — от 2 до 15 цистронам (Hourcade et al., 1973a, b; Rochaix et al., 1974).

Видимые в электронный микроскоп кольцевые молекулы и кольца с однонитчатыми хвостами (катящиеся кольца) действительно представляют рДНК. Это было доказано прежде всего центрифугированием в градиенте CsCl: препараты ДНК имели ту же плавучую плотность, что и рДНК. Кроме того, был использован метод электронномикроскопического анализа распределения гетеродуплексов — однонитчатых участков (петель) при мягких воздействиях, которые вызывают денатурацию только АТ-богатых последовательностей (Inman, 1967; Inman, Schnos, 1970; Wolfson et al., 1972). В рибосомном опероне относительно более

богаты АТ-парами участки 28S и 18S генов, спейсеры обогащены ГЦ-парами (Wensink, Brown, 1971). При нагревании до 39° и при высоких концентрациях формамида Хоркаде и сотр. (Hourcade et al., 1973a, b) получили частичную денатурацию кольцевых ДНК и ДНК катящихся колец и показали, что распределение и относительная длина однонитчатых и двунитчатых участков в обоих случаях такие же, как в рДНК хромосом.

В опытах по изучению кинетики включения меченого тимидина в кольцевые и линейные (хвосты) последовательности рДНК на стадии амплификации было продемонстрировано функционирование этой модели «катящегося кольца» (Rochaix et al., 1974). При пульсовых введениях метки обнаруживали меченые кольца, и число их было больше при коротких сроках мечения (одно меченое на шесть колец при двухчасовой метке и на 12 колец — при шестичасовой метке). Но чем продолжительнее было введение метки, тем длиннее была меченая линейная последовательность, примыкающая к кольцу (хвост). Если же после короткой метки проводили долговременный «чейз» в холодном тимидине, то количество меченых кольцевых структур уменьшалось, а в хвостовых последовательностях меченый участок отодвигался от кольца в дистальный конец (Rochaix et al., 1974). Таким образом, опыты демонстрировали, что происходит сначала репликация кольцевой структуры, затем реплика ДНК вытесняется и транспортируется в конец хвоста последующими актами репликации. Многие вопросы в этой модели еще остаются не выясненными. Например, неясно, что определяет число актов репликации и как создаются большие циркулярные молекулы ДНК ядрышек, содержащие от 200 до 500 повторов рибосомных генов. Неизвестно и то, как появляются первые кольца и как происходит их «размножение», определяющее каскадный характер процесса амплификации (MacGregor, 1968). Неясно также, участвуют ли в первоначальном процессе образования кольцевых молекул все локусы ядрышкового организатора. По расчетам Бёрда и сотр. (Bird, 1974; Rochaix et al., 1974), при средней скорости репликации 10 мк/час за 20 дней (время репликации ядрышковой ДНК) весь объем амплификации может быть обеспечен общим числом генов, имеющихся в четырех хромосомах тетраплоидных ядер ооцитов ксенопуса. Кроме того на свертках было показано, что в амплификации участвуют оба ядрышкового организатора, расположенных в разных хромосомах: они образуют структуры, подобные пuffed (Lima-de-Faria, 1974). Одним из самых важных вопросов в выяснении механизма амплификации является то, чем обеспечивается избирательность репликации локуса ядрышкового организатора в момент, когда репликация всей хромосомной ДНК уже закончена (Gall, 1968; MacGregor, 1968).

В этом отношении привлекательной является гипотеза Криппа и Токкини-Валентини об участии в амплификации рДНК специального фермента — обратной транскриптазы, который может

строить молекулы ДНК по матрицам РНК (Tocchini-Valentini, Crippa, 1971; Crippa, Tocchini-Valentini, 1971; Ficq, Brachet, 1971; Brown, Tocchini-Valentini, 1972; Mahdavi, Crippa, 1972; Tocchini-Valentini et al., 1973).

Этот фермент — РНК-зависимая ДНК-полимераза — был выделен из яичников ксенопуса (Brown, Tocchini-Valentini, 1972; Brown, Tocchini-Valentini, 1973). Он проявлял способность в 30 раз более эффективно использовать в качестве матриц полирибонуклеотид, чем полидезоксинуклеотид. В дальнейшем было показано, что фермент из яичников может строить ДНК по матрице 9S глобиновой мРНК (тест на истинную активность обратной транскриптазы, которой обладает фермент из онкогенных вирусов) (Tocchini-Valentini et al., 1973).

Аргументом в пользу того, что обратная транскрипция с матриц РНК происходит в ооцитах, служили данные о выделении из яичников комплексов РНК с ДНК (Tocchini-Valentini, Crippa, 1971; Crippa, Tocchini-Valentini, 1971). РНК из комплексов содержала последовательности, идентичные 28S и 18S зрелых РНК и спейсерным участкам предшественника рибосомных РНК. Размер РНК из комплексов был больше, чем единица транскрипции рибосомных генов ксенопуса (45S вместо 40S) (Tocchini-Valentini et al., 1973). Комплекс содержал в 10 раз больше ДНК, чем РНК, но константа седиментации ДНК в градиенте сахарозы была существенно ниже (27S), чем суммарный молекулярный вес молекул РНК и ДНК, обнаруженных в комплексе. Авторы объясняют это рыхлой структурой комплекса (Tocchini-Valentini et al., 1973). По последней схеме, которую предлагают Токкини-Валентини и Криппа (Tocchini-Valentini et al., 1973), первоначальным событием при амплификации является синтез 45S РНК, считанной со всей последовательности рибосомального гена, включая участки спейсеров, не считывающихся в обычной транскрипции. По 45S РНК с помощью обратной транскрипции синтезируются ДНК. Эти ДНК образуют кольца и далее функционируют как «машины» для амплификации рДНК. Эта схема не находит, однако, подтверждения в работах других авторов. Так, не удалось обнаружить комплексов РНК с ДНК в яичниках метаморфизирующих головастиков ксенопуса (Bird et al., 1973b; Hourcade et al., 1973a, б). Однако, по мнению Токкини-Валентини, эти авторы использовали головастиков на поздних сроках метаморфоза, когда в ядрах ооцитов уже закончен процесс обратной транскрипции.

Схема Токкини-Валентини и Криппа очень привлекательна тем, что может объяснить главную трудность — избирательность репликации рДНК при амплификации рибосомальных генов. Требуются, однако, дальнейшие исследования для окончательного выяснения молекулярного механизма амплификации рДНК.

В морфологических исследованиях было показано, что амплифицированные ядрышки сохраняются в течение всего оогенеза. На стадии малого роста до вителлогенеза в ядрышках ксенопуса имеется только фибриллярный компонент (ДНК), гранулярная структура отсутствует, что, по-видимому, отражает отсутствие синтеза рРНК (Thomas, 1972). На стадии большого роста в период активного синтеза рибосомной РНК ядрышки имеют характерную структуру: они вытянуты, фибрилла ДНК смещена к месту прикрепления ядрышек на ядерной мембране, вдоль нити ДНК располагаются шаровидные рибопуклеопротеидные комплексы (MacGregor, 1972).

У сверчка вторичные мелкие ядрышки мигрируют к ядерной мембране и выбрасываются в цитоплазму (Jaworska, Lima-de-Faria, 1973a, b; Jaworska et al., 1973; Lima-de-Faria et al., 1973a, b), где они продолжают синтезировать рРНК.

По окончании роста ооцита амфибий, когда происходит компактизация хромосом и структура типа ламповых щеток начинает пропадать, ядрышки также становятся более компактными и начинают перемещаться в центр ядра (см. Brown, 1966; MacGregor, 1972). Затем в процессе созревания ооцита, после разрыва зародышевого пузырька, ядрышки исчезают (Brown, 1966).

Очень подробно изучен процесс изменения ядрышкового аппарата у рыб (Сакуп, 1961; Чмилевский, 1971). Процесс миграции и слияние ядрышек происходят в период перемещения ядра из центра ооцита в область микропиле и образования гомогенного желтка из отдельных желточных зерен. Далее, с началом созревания и растворения ядерной мембраны, ядрышки преобразуются в толстые нити, переплетающиеся между собой, формируя клубок с полостью. В дальнейшем клубок распадается на отдельные фрагменты, остатки которых у щуки, сига и корюшки сохраняются почти до появления сформированного веретена первого деления мейоза (Сакуп, 1961). У ерша ядрышки исчезают в цитоплазме после растворения зародышевого пузырька (Чмилевский, 1971).

В ходе развития зародышей у большинства животных новые ядрышки появляются довольно поздно — на стадии бластулы — гастролы. Методом гибридизации было показано, что в ядре ксенопуса на стадии гастролы содержится не более диплоидного количества рибосомных генов (Brown, Dawid, 1968). Таким образом, на стадии гастролы уже отсутствуют экстракопии рДНК. Однако точных представлений относительно времени и самого процесса уничтожения экстракопий рДНК нет. Возможно, что гидролиз их наступает тотчас после разрушения ядрышек и зародышевого пузырька. Но не исключено, что они еще долго сохраняются в яйце. Так, по нашим данным, у выюна на стадии бластулы в

ядерной ДНК имеется быстро ренатурирующая фракция, составляющая 5% от ДНК генома (Тимофеева и др., 1975). Вместе с тем дополнительная фракция не обнаруживается в ДНК печени и спермы. Мы предполагаем, что эта фракция соответствует части сохранившихся экстракопий рДНК. У одного из видов нематод *Panagrellis silusiae* цитофотометрически показано образование значительного избытка ДНК в ядре ко времени созревания ооцита (23 с) и наличие его в 8-клеточном зародыше (7 с). Только на стадии 32 бластомер количество ДНК становится равным 2—4 с. Так как в оогенезе происходит значительное увеличение размеров ядрышек, можно думать, что у *Panagrellis silusiae* также происходит увеличение рДНК и эти копии сохраняются после оплодотворения (Pasternak, Height, 1975). Возможно, что это связано с более поздними сроками синтеза рибосомных РНК в конце оогенеза. Интересно, что увеличение ядрышка происходит не только в ооците, но и к концу созревания спермия. Затем, во время мейоза, ядрышко разрушается, однако возможно, что экстракопии сохраняются и даже функционируют. Например, у другого вида нематод, аскариды, описан активный синтез рРНК в период после оплодотворения и до дробления в мужском пронуклеусе, хотя сформированного ядрышка нет и оно появляется в ядрах на стадии четырех бластомер (Kaulenas, Fairbairn, 1966; Kaulenas et al., 1969).

Как и при создании экстракопий, когда процесс репликации затрагивает только один участок хромосомы, так и при уничтожении экстракопий рДНК необходимо функционирование специальных механизмов, обеспечивающих избирательность, специфичность этих процессов. В отношении гидролиза рДНК можно предполагать, что определенное значение имеет различная степень модификации рДНК: в экстракопиях цитозин не метилирован, в рДНК хромосом метилировано 13% остатков цитозина (Dawid et al., 1970). Вполне вероятно, что гидролиз рДНК экстракопий связан с появлением специфических нуклеаз.

Синтез митохондриальной ДНК в оогенезе

Запасы митохондриальной ДНК, которые имеются в неоплодотворенном яйце, создаются в ооците за счет собственного процесса репликации ДНК в митохондриях. Впервые синтез ДНК в цитоплазматической ДНК продемонстрирован в работах Файнамора и Волькина (Finamore, Volkin, 1958), которые обнаружили по включению меченого фосфата синтез цитоплазматической ДНК в ооцитах амфибий. Мезгер-Фрид (Mezger-Freed, 1963) показала также синтез цитоплазматической ДНК в активированных безъядерных яйцах лягушки. Радиоавтографически далее были получены прямые свидетельства синтеза ДНК в митохондриях насекомых (Muckenthaler, Mahowald, 1966).

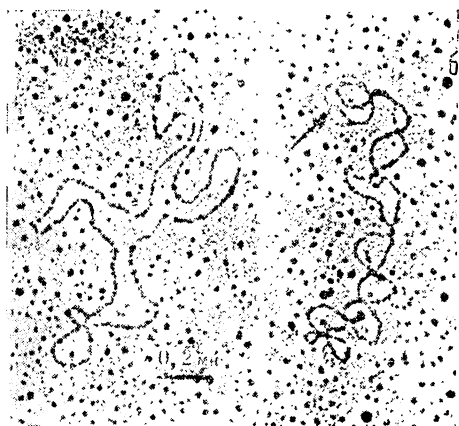
Динамику синтеза мтДНК в оогенезе практически не изучали. Некоторое представление о ней можно получить, исследуя накопление митохондрий в оогенезе. Наиболее подробные данные получены на ооцитах выюна (Озернюк, 1974; Озернюк, Пальмбах, 1975). В этих работах количество митохондрий определяли электронномикроскопически в срезах ооцитов на разных стадиях оогенеза. Было показано, что в ооцитах малого роста количество митохондрий увеличивается в 84 раза, к началу вителлогенеза — в 240 раз. Содержание их становится равным $1,5 \cdot 10^6$. Это в тысячу раз больше, чем в соматической клетке. Затем, в период большого роста, количество митохондрий продолжает расти, так что в зрелом яйце их число увеличивается еще на два порядка. В зрелом яйце образование митохондрий прекращается.

Динамика накопления митохондрий в оогенезе отражает и динамику накопления мтДНК. Однако о скорости синтеза мтДНК известно мало. Удвоение числа митохондрий в ооците происходит за 1,5 месяца. По-видимому, скорость репликации ДНК существенно выше.

Используя систему изолированных митохондрий, Г. Г. Гаузе и В. С. Михайлов (1974) сравнивали скорость синтеза мтДНК у выюна в ооцитах, неоплодотворенных яйцах и зародышах на стадии 35 час. развития по включению ^3H -дТТФ в ДНК митохондрий. Оказалось, что по сравнению с зародышами в ооцитах малого и большого роста активность синтеза мтДНК незначительна. К концу созревания ооцита активность включения метки в мтДНК становится еще меньше.

Процесс репликации мтДНК в оогенезе происходит так же, как и в соматических клетках. Известно, что синтез осуществляется с помощью особой ДНК-полимеразы, которая по ряду свойств отличается от ядерных ДНК-полимераз (см. Шмерлинг, 1970; Weissbach, 1975). Молекулярный вес ее — $2 \cdot 10^5$ дальтон, она обладает эндонуклеазной активностью, способна реплицировать циркулярные двуспиральные молекулы ДНК и проявляет большую чувствительность к бромистому этидию (Weissbach, 1975). Эта ДНК-полимераза «работает» внутри митохондрий, но синтез ее контролируется не митохондриальным геномом, а геномом ядер (Weissbach, 1975).

ДНК-полимеразная активность была обнаружена в митохондриях ооцитов и неоплодотворенных яиц выюна (Gause, Mikhailov, 1973; Mikhailov, Gause, 1974). Пино и сотр. (Pinon et al., 1975) недавно сообщили, что ДНК-полимераза со свойствами митохондриального фермента, т. е. способная реплицировать двуспиральные циркулярные молекулы ДНК, накапливается в ооцитах ксенопуса. Репликация митохондриальной ДНК происходит полуконсервативно (Reich, Luck, 1966; Kirschner et al., 1968). Электронномикроскопически было показано, что в ходе репликации мтДНК появляются циркулярные структуры с петлей разной величины (рис. 3). Петля представляет собой участок одностите-



Электронная микрофотография циркулярной ДНК без Д-петли (а), ДНК с Д-петлей, указанной стрелкой (б), и схема всего процесса;

а — исходная двуспиральная молекула; б, в — образование неспаренной области, начало репликации на одной из комплементарных нитей (см. также электрономикроскопическое изображение); г, д — начало репликации второй комплементарной цепи и продолжение репликации первой; е — молекула циркулярной ДНК с завершённой репликацией; ж — молекула циркулярной ДНК с продолжающимся процессом синтеза комплементарной нити; з — молекула циркулярной ДНК с завершённым процессом репликации (Robberson et al., 1972a; Mikhailov, Gause, 1974)

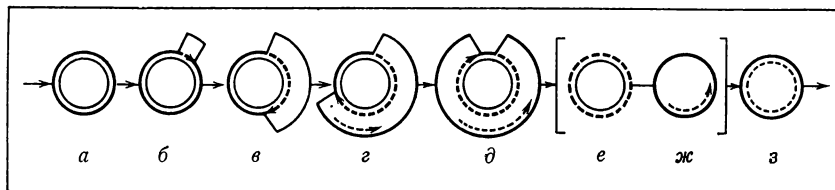


Рис. 3. Репликация митохондриальной ДНК вьюна

вой последовательности ДНК, при этом антипараллельная ей цепь ассоциирована с комплементарным коротким вновь синтезированным фрагментом. Такие структуры были названы Д-петлями (displacement-loop) (Kasamatsu et al., 1971) или петлями смещения. Изучение их позволило построить модель репликации мтДНК (Robberson et al., 1972; Robberson, Clayton, 1972). По этой модели сначала идет местное расплетание циркулярной мтДНК за счет локально возникающих разрывов и затем быстрой сшивки. После этого происходит синтез комплементарной цепи по одной из нитей, другая нить отторгается (структура Д-петель). Репликация этой отторгнутой нити начинается позже. В результате создаются две циркулярные молекулы мтДНК (Robberson et al., 1972; см. Гаузе, 1977). По данным Казаматсу и др. (Kasamatsu et al., 1971), молекулы с Д-петлями составляют значительную часть мтДНК L-клеток в период экспоненциального роста. Д-мтДНК обнаруживаются в препаратах цитоплазматических ДНК ооцитов разных животных.

В неоплодотворенных яйцах, в которых синтез мтДНК практически прекращается, количество Д-мтДНК сильно снижается. Так в препаратах мтДНК из яиц вьюна Д-мтДНК составляет менее 1% (Гаузе, Михайлов, 1974). Низкое содержание Д-петле-

вых молекул найдено в ДНК неоплодотворенных яиц морских ежей (Matsumoto et al., 1973). Возможно, что блокирование синтеза мтДНК к концу оогенеза связано с инактивацией механизма, ответственного за генерацию образования Д-петель. Однако у мыши (Piko, 1975) и лягушки (Hallberg, 1974) 70—80% молекул мтДНК неоплодотворенных яиц имеют структуру Д-петель, хотя синтез мтДНК отсутствует. Таким образом, консервирование синтеза мтДНК у этих объектов происходит на другом этапе, после образования Д-петель.

СИНТЕЗ ДНК В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ

Синтез ядерной ДНК

В течение всего периода формирования яйца в оогенезе, длительность которого измеряется многими часами, днями или месяцами, синтез ядерной хромосомной ДНК отсутствует. Синтез начинается после оплодотворения, что было показано в многочисленных автордиографических и биохимических исследованиях (см. Grant, 1965; Gurdon, 1969; Giudice, 1973). По данным Грэхэма (Graham, 1966), синтез ДНК у лягушки ксенопуса запускается через 20 мин после оплодотворения одновременно в обоих пронуклеусах. До этого момента происходит значительное набухание ядер (Graham, Morgan, 1966; Gurdon, 1967). Факторы, определяющие эти процессы, локализованы в цитоплазме. Так, в классических экспериментах Гёрдена по инъекции ядер в цитоплазму оплодотворенного яйца (см. Gurdon, 1969, 1974) было показано, что любое ядро с заблокированным синтезом ДНК, например ядра нервных клеток, претерпевает все те же изменения, что и мужской пронуклеус, т. е. разбухает и начинает синтезировать ДНК. Позднее Андерсон (Anderson, 1969) продемонстрировал автордиографически, что при полиспермии синтез ДНК начинается одновременно во всех ядрах. Кроме того при партеногенетической активации яиц синтез ДНК включается в женском пронуклеусе.

Синтез ДНК у морских ежей также начинается через несколько минут после оплодотворения и одновременно в обоих пронуклеусах. (Simmel, Karnofsky, 1961; Hinegardner et al., 1964). Эти данные были получены при использовании меченого тимидина. Однако Цайтц и др. нашли, что бромдезоксисуридин и йоддезоксисуридин начинают включаться в ДНК *Strongylocentrotus purpuratus* и *Arbacia punctulata* тотчас после оплодотворения (Zeitze et al., 1969; см. Giudice, 1973), в то время как тимидин и дезоксиуридин — через 20 мин. Авторы считают, что эндогенный тимидин на этой стадии не превращается в тимидинтрифосфат.

В процессе делений дробления скорость синтеза ДНК очень высока. У амфибий скорость увеличивается в течение первых

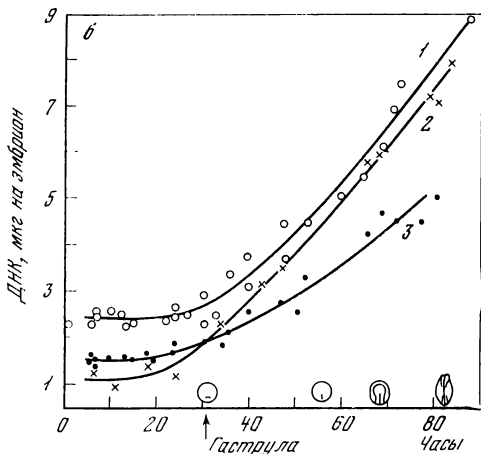
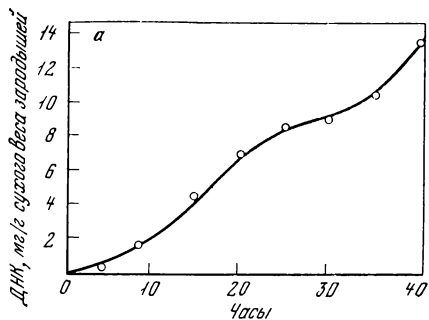
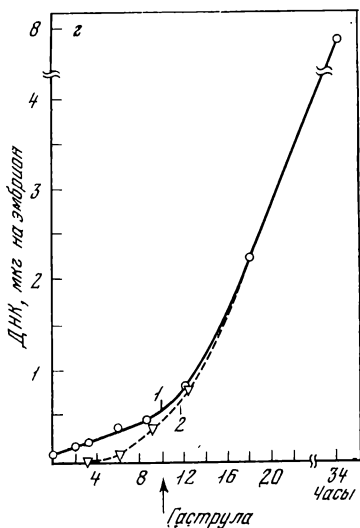
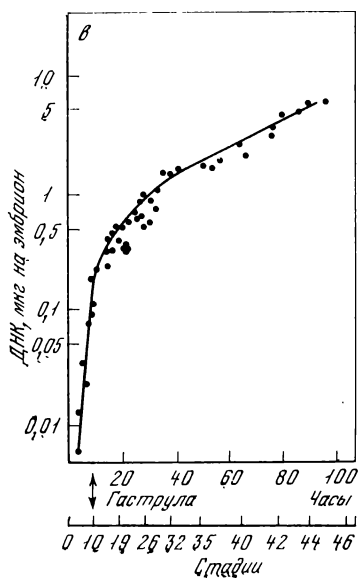


Рис. 4. Изменения содержания ДНК в эмбрионах в ходе развития у разных животных

а — морской еж;
б — тритоны (1 — *T. alpestris*, 2 — *T. cristatus*, 3 — *T. palmaris*);

в — лягушка *Xenopus laevis*;
г — вьюн *Misgurnus fossilis* П. (1 — экспериментальная кривая, 2 — теоретически рассчитанная, исходя из гаплоидного содержания ДНК). ДНК определяли во фракции, выделенной по Огуру, Розену, по поглощению в УФ-свете (а, б), дифениламиновым (в) или микробиологическим методами (г) (а — Mazia, 1949; б — Chen, 1960; в — Dawid, 1965; г — Тимофеева, 1967)



делений, достигая максимума к середине периода синхронных делений (рис. 4). В этот период время синтеза одного гаплоидного эквивалента ДНК — 10 мин. (Graham, Morgan, 1966). После 12-го деления с началом десинхронизации скорость синтеза начинает снижаться и на стадии нейрулы становится равной 6 час. Частота синтеза на стадии дробления также высокая (1 раз в 12 мин.), к стадии гастрюлы она уменьшается в 240 раз (1 раз за 48 час.).

У морских ежей наибольшая скорость синтеза ДНК поддерживается в течение нескольких делений дробления, после чего наступает снижение скорости. Более детальное исследование времени синтеза ДНК в ходе первых делений дробления до 16-й клеточной стадии было проведено Немером (Nemer, 1962). Им показано, что деление в этот период действительно происходит синхронно и половина ДНК уже синтезирована к моменту, когда 50% клеток кончило митоз. При исследовании скорости синтеза ДНК по включению меченого тимидина следует учитывать, что в процессе клеточного цикла может меняться проницаемость тимидина. Поэтому Немер использовал прием прединкубации (пре-лодинг) зародышей с меченым тимидином и вносил поправку на изменение клеточного пула тимидина.

Данные, полученные Немером, находятся в согласии с более ранними исследованиями, в которых методом микроспектрометрии и автордиографии (Lison, Pasteels, 1951; Ficq et al., 1963; Zimmermann, 1963) показано, что синтез ДНК на стадии первых делений синхронизирован и начинается при каждом делении еще до завершения клетками митоза, Хайнегарднер и др. (Hinegardner et al., 1964) на *Strongylocentrotus purpuratus* провели сопоставление синтеза ДНК на первых двух делениях дробления с морфологическими изменениями ядра и хромосом. Они показали, что синтез ДНК начинается в конце телофазы, когда происходит деспирализация хромосом, и продолжается 13 мин. (при 15°). У рыб закономерность изменения скорости синтеза ДНК после оплодотворения такая же, как у амфибий. У вьюна, например, синхронные деления продолжают в течение первых 6 час. (10—11 делений). S-период в этот момент занимает 15 мин. (при 21°). Затем после десинхронизации он становится равным 110 мин. (Ротт, Попов, 1969).

Описание изменения синтеза ДНК в развитии насекомых дается в работе Харриса и Форреста (Harris, Forrest, 1967), проведенной на клопе-ваточнике (*Oncopeltis fasciatus*). Активность синтеза ДНК растет в первые 50 час. после оплодотворения, т. е. до гастрюляции, затем до 90 час. поддерживается на высоком уровне и начинает снижаться только в период органогенеза (дифференцировки нервной ткани).

Синтез ДНК в период дробления осуществляется с использованием самых различных низкомолекулярных предшественников, в том числе рибонуклеотидов, CO₂, глицина и т. д. (см.

Grant, 1965). По-видимому, в ранних зародышах активированы все метаболические системы, приводящие к образованию дезоксирибонуклеотидов, для обеспечения высокой скорости синтеза ДНК в период синхронных делений. Активному синтезу ДНК сопутствует высокий уровень дыхания (см. Rossi et al., 1975), вероятно, отражающий потребность в макроэргических трифосфатах.

Синтез митохондриальной ДНК

Неоплодотворенное яйцо обладает запасами митохондрий и количество их не меняется после оплодотворения в течение длительного срока развития. У амфибий прирост митохондриального белка наблюдается лишь после 38-й стадии, т. е. в период активного органогенеза.

Синтез митохондриальной ДНК на ранних стадиях развития незначителен или полностью отсутствует. По данным Пико (Piko, 1970), даже у мыши, яйцеклетка которой не очень богата запасами митохондрий, синтез мтДНК отсутствует до стадии бластоцисты. У морских ежей синтез мтДНК не обнаруживается в течение всего периода дробления до стадии свободной бластулы (Matsumoto et al., 1973, 1974). В ходе дальнейшего эмбриогенеза от дробления до стадии гастрюлы скорость репликации мтДНК увеличивается в 2—3 раза (Bresch, 1973). Синтез ДНК в митохондриях на разных стадиях развития выюна исследовали Г. Г. Гаузе и А. М. Михайлов (Михайлов, Гаузе, 1974; Mikhailov, Gause, 1974). Опыты ставили на изолированных митохондриях и о скорости синтеза судили по включению ^3H -дТТФ в мтДНК. В митохондриях неоплодотворенных яиц наблюдался очень низкий уровень включения (0,01 пМ ^3H -дТТФ на 1 мг белка в час). Центрифугированием в градиенте плотности CsCl с этидией бромидом показано, что это включение отражает скорее процессы репарации мтДНК. Таким образом, синтез мтДНК в неоплодотворенных яйцах выюна, по-видимому, отсутствует (Mikhailov, Gause, 1974). После оплодотворения скорость включения предшественников в мтДНК начинает экспоненциально расти и удваивается каждые 7 час. развития. К 35 час., т. е. в период активного органогенеза, она равна 0,4 пМ ТТФ на 1 мг белка в час, т. е. увеличивается в 40 раз. Для того, чтобы выяснить, в какой степени увеличение активности включения метки в мтДНК отражает изменение скорости синтеза ДНК и не связано с изменением внутримитохондриального пула предшественников, авторы исследовали содержание в митохондриях дТТФ. Оказалось, что пул дТТФ в митохондриях меняется, снижается в 2,5 раза в течение первых 10 час. развития, затем он стабилизируется и остается на постоянном уровне все последующее развитие. Авторы заключают, что значительный рост синтеза мтДНК происходит после 10 час., т. е. с началом гастрюляции (Mikhailov, Gause, 1974; Гаузе, 1977). Особенностью синтеза мтДНК у выюна является

то, что даже в момент значительной активации не наблюдается увеличения содержания Д-петлевых структур мтДНК (Mikhailov, Gause, 1974). Их количество составляет лишь 4% от мтДНК. По мнению Г. Г. Гаузе, низкое содержание Д-петлевых молекул может быть следствием того, что в зародыше идет репликация лишь небольшой части мтДНК, или же в раннем эмбриогенезе каким-то образом блокирована инициация образования Д-петель. Действительно, на стадии 80 час. развития у свободно плавающего головастика содержание Д-мтДНК становится равным 10—15%.

У шпорцевой лягушки — ксенопуса синтез мтДНК исследовали Чейз и Давид (Chase, Dawid, 1972) по включению меченого тимидина во фракцию мтДНК развивающихся зародышей. Авторы использовали очень удачный прием отделения мтДНК от примеси ядерной ДНК с помощью денатурации ДНК и последующего короткого отжига. Геном митохондрий отличается по размеру от генома ядер более чем на четыре порядка (10^5 н. п. размер генома митохондрий и $2 \cdot 10^9$ — ядерного генома), в связи с этим скорость ренатурации мтДНК в 10^4 раз быстрее. Если же ядерная ДНК присутствует лишь в виде примеси, то в условиях отжига ренатурировать будет только мтДНК, а ядерная ДНК, даже фракция повторяющихся нуклеотидных последовательностей ренатурировать не будет. Двухспиральные мтДНК легко отделить далее центрифугированием в CsCl (Chase, Dawid, 1972). Чейз и Давид показали, что до 11-й стадии (гаструла) включение меченого тимидина в мтДНК не улавливается. Затем синтез начинает обнаруживаться и в течение каждые 10 час. он увеличивается в два-три раза. Таким образом, к 35-й стадии скорость включения тимидина в мтДНК возрастает в 10 раз. Это примерно тот же порядок увеличения скорости, что и у зародышей выюна.

Характерным для синтеза мтДНК в эмбриогенезе животных является то, что в период очень интенсивной репликации ядерной ДНК, на стадии синхронных делений дробления, он фактически отсутствует, и его активация происходит на тех стадиях, когда интенсивность репликации ядерной ДНК снижается в сотни раз. Это свидетельствует о разобщении регуляции активности синтеза мтДНК и ядерной ДНК во времени и независимости этих процессов. Подобная разобщенность во времени и независимость репликации митохондриальной и ядерной ДНК описана и для других систем. Так у физарума и тетрахимены синтез мтДНК не происходит в S-период, когда реплицируется ядерная ДНК (Parsons, Rustad, 1968; Holt, Gurney, 1969).

Изменение содержания ДНК в эмбриогенезе

Количество ДНК в зародышах увеличивается на всем протяжении развития. Это происходит за счет умножения числа ядер, т. е. синтеза ядерной ДНК. Вместе с тем у ряда объектов —

некоторых видов рыб, амфибий — содержание общей ДНК на ранних стадиях развития не увеличивается или оно очень мало, в то время как количество ядер в этот период растет в геометрической прогрессии. Это объясняется тем, что в яйцах подобных видов животных очень велико число митохондрий и, следовательно, запасы цитоплазматической мтДНК, превосходящие на один-три порядка содержание ядерной ДНК. На фоне таких количеств мтДНК суммарный прирост ДНК в яйце можно обнаружить, лишь когда образуются уже сотни ядер, т. е. на стадии бластулы (рис. 4).

В ходе нормального развития отношение содержания ядерной ДНК к цитоплазматической, т. е. к мтДНК, меняется. В яйцеклетке и на стадиях раннего деления это отношение резко сдвинуто в сторону мтДНК. Однако в связи с быстрым увеличением числа ядер и отсутствием синтеза мтДНК отношение это вскоре уравнивается и затем сдвигается в сторону ядерной ДНК. У амфибий на стадии гаструлы количество мтДНК составляет процент и менее от количества ядерной ДНК, т. е. в зародыше и в клетках устанавливается отношение содержания ядерной и мтДНК, характерное для соматических клеток.

В развитии большинства организмов содержание ДНК на ядро варьирует в пределах $2c-4c$, отражая его изменение в ходе митотического цикла, т. е. удвоение во время S-периода. Однако у некоторых животных (двукрылые насекомые) в ядрах определенных специализированных клеток личинки значительно увеличивается количество ДНК за счет политенизации хромосом. У многих животных имеется полиплоидизация ядер, иногда в десятки и сотни раз (например, в питающих клетках яичников). Как и при амплификации рДНК в оогенезе, такой процесс дифференцировки ядер необходим для обеспечения интенсивных процессов транскрипции различных видов РНК.

Для ряда беспозвоночных — червей и членистоногих — описан другой процесс — потеря части, иногда значительной, ДНК в ядрах соматических клеток. В одних случаях это выражается в виде элиминации некоторых хромосом, в других — в виде диминуции частей хромосом. Так, например, у *Wachtliella persiana* в результате трех первых делений образуется восемь ядер, из которых одно мигрирует в зону яйца, содержащую полярную плазму, и сохраняет полный набор (40) хромосом. У остальных семи ядер происходит элиминация большей части (30—32) хромосом (Geyer-Duszynska, 1966). У разных видов циклопов (Beermann, 1966; см. Кикнадзе, 1972) и аскарид (см. Rossi et al., 1975) в соматических клетках зародыша в отличие от клеток полового пути теряется значительная часть хроматина. У *Cyclopus furcifera* это наступает на 6—7-м делении, причем сначала происходит гетерохроматинизация терминальных и центромерных районов хромосом, а затем эти гетерохроматизированные районы подвергаются диминуции с потерей до 75% ядерной ДНК.

Согласно гипотезе Беермана (Beermann, 1966), молекулярный механизм диминуции заключается в «выпетливании» части последовательностей хромосомной ДНК за счет разрывов специфически эндонуклеазами на определенных участках одной из питей ДНК, сближении этих участков, их сшивке с образованием петель, которые затем отделяются от основной последовательности в виде колец, путем разрыва и сшивки второй пители ДНК.

У *Ascaris megalocephal* после первого деления одно из ядер имеет нормальное количество ДНК, а во втором происходит диминуция хроматина. Затем в ряде последующих делений полноценного ядра лишь одно сохраняет исходное количество ДНК, в остальных часть хроматина теряется. В результате пяти делений образуется 31 бластомер, в которых содержание ДНК на 80% меньше, чем в исходном ядре. Из этих бластомеров затем образуются соматические клетки зародыша, а из одного полноценного ядра — клетки полового пути (см. Rossi et al., 1975).

В работе Тоблера и др. (Tobler et al., 1972) было показано, что в ядерной ДНК соматических клеток аскариды повторяющиеся последовательности составляют 10%, в то время как в ДНК сперматид (половых клеток) повторов значительно больше — 23%. Это позволило заключить, что диминуция связана с потерей ДНК, составленной на 50% из повторов и на 50% из уникальных последовательностей. В подтверждение этих данных авторы провели гибридизационный анализ ДНК из сперматид и соматических клеток личинки аскариды с мечеными копиями РНК, полученными транскрипцией *in vitro* этих ДНК. Такие РНК-копии называются «сРНК». При проведении гибридизации в низких концентрациях ДНК характеризуются только повторяющиеся последовательности ДНК. Если гибридизовали ДНК сперматид с сРНК личинки и сперматид отдельно, то было обнаружено, что связывание сРНК личинки в два раза меньше, чем сРНК сперматид. Если же после полного связывания сРНК личинки добавляли сРНК сперматид, происходило дополнительное связывание РНК. Полученные результаты служили доказательством того, что в личиночной сРНК, а следовательно, в личиночной ДНК, отсутствует часть повторяющихся последовательностей, которые имеются в ДНК половых клеток (Tobler et al., 1972).

Проблема диминуции хроматина и элиминации хромосом до сих пор остается открытой — биологический смысл этих явлений неясен и широко обсуждается (см. Sager, Kitchin, 1975). Очевидно, что гены, находящиеся в той части ДНК, которая сохраняется только в клетках полового пути, не участвуют непосредственно в генетическом контроле эмбриогенеза, личиночного развития и регуляции функции взрослого организма. Кажется естественным предположение, что эти гены участвуют в процессах оогенеза и сперматогенеза. Действительно, развитие видов, у которых происходит элиминация или диминуция хромосом, относит-

ся, как правило, к мозаичному типу. Это означает, что дифференцировка цитоплазмы яйца (ооплазматическая сегрегация) должна быть у них значительно выраженной, т. е. эмбриональная дифференциация в большой степени определяется уже в оогенезе и, соответственно, должна требовать участия значительной части генома. Отсюда нетрудно предположить, что элиминации или диминуции подвергаются именно те части генома, которые выполняют свою функцию только в ходе гаметогенеза и были бы «балластом» в соматических клетках.

Особое место в вопросе об изменении количества ДНК в ядрах зародыша занимает проблема амплификации ДНК в соматических клетках. Простая мысль о том, что избирательная репликация отдельных генов могла бы служить механизмом дифференцировки, высказывалась неоднократно. Эта проблема, как часть проблемы дифференциальной активации генов, подробно рассматривается в нашей следующей книге, посвященной вопросам регуляции. Здесь же можно только сказать, что экспериментальный материал, свидетельствующий в пользу амплификации, крайне ненадежен, противоречив и обычно приводится в одиочных сообщениях, не повторяется самими авторами и не подтверждается другими. Кроме того, в ряде достоверных экспериментов доказано, что в некоторых высокоспециализированных клетках, синтезирующих один или несколько видов белка, таких, например, как красные клетки крови, железистые клетки яйцевода и другие, где амплификация генов глобина, овальбумина, казалось бы, должна происходить прежде всего, это явление отсутствует.

Тем не менее данные об изменении состава генома за счет, очевидно, избирательной репликации отдельных его участков являются в литературе. Из недавних работ такого рода можно отметить сообщение, в котором как будто бы показано изменение генома морского ежа, происходящее между стадиями бластулы и гаструлы (Fitzmaurise, Baker, 1972). Совсем недавно появилось сообщение об амплификации некоторых умеренных повторов при дифференцировке клеток хряща зародыша цыпленка (Strom, Dorfman, 1976).

Важность решения проблемы амплификации в соматических клетках трудно переоценить. Но это и заставляет быть особенно осторожным в оценке отдельных работ и сохранять определенную долю скептицизма до тех пор, пока амплификация не будет надежно установлена.

РНК

Синтез и функция РНК в оогенезе, эмбриогенезе и последующих этапах развития имеют как общие, так и специфические черты. Сходство состоит в том, что на протяжении индивидуального развития синтезируются те же основные типы РНК, которые в ооците, эмбриональной клетке и в клетках взрослого организма выполняют одинаковые функции. Более того, некоторые виды мРНК синтезируются на всем протяжении развития. Однако важнее не столько эти общие черты в синтезе и функционировании основных типов РНК, сколько различия и особенности, которые определяют специфичность транскрипции РНК в оогенезе и эмбриональном развитии.

В клетках взрослого организма синтез всех видов РНК координирован таким образом, чтобы поддерживать определенный уровень белкового синтеза. Все виды рРНК (28S, 18S и 5S) синтезируются в эквимоллярных соотношениях, в которых они входят в состав рибосом, создается и поддерживается постоянное отношение тРНК к числу рибосом, большинство вновь образованных мРНК достаточно быстро вовлекается в процесс транскрипции. В противоположность этому в оогенезе и раннем эмбриогенезе такой координации нет. Лишь небольшая часть созданного белок-синтезирующего аппарата, а также мРНК используется в период оогенеза для осуществления синтеза белка в самом ооците. Остальная, большая часть хранится в течение длительных сроков, — иногда месяцев, лет, чтобы быть использованной в первые часы эмбрионального развития. Различие состоит также в том, что весь синтез РНК в оогенезе происходит в одном ядре (или в небольшом числе ядер питающих клеток) и синтезируемая РНК накапливается в одной клетке — яйце. При этом, очевидно, в оогенезе продолжительное время функционирует мало меняющийся набор активных генов. В период эмбрионального развития, напротив, в различных клетках зародыша активны различные паборы генов, смена которых происходит по мере дифференцировки, т. е. относительно быстро. Очевидно, особенности транскрипции РНК на разных этапах развития требуют специфических механизмов регуляции. Все это заставляет рассматривать РНК в оогенезе и в эмбриональном развитии последовательно, но раздельно.

Значение синтеза РНК, происходящего в оогенезе, становится очевидным при рассмотрении тех мутаций, которые приводят к нарушениям развития и к летальности, действуя во время образования яйца. Бóльшая часть искусственно полученных мутаций проявляется в нарушении процессов оогенеза — образования фолликулярных клеток, отложения желтка, образования яйцевых оболочек и т. д. (Bakken, 1973). У аксолотля была обнаружена мутация — «О», приводящая у гомозиготных самок к остановке развития не самих мутантов, а их потомства. Продукт этого гена накапливается в оогенезе в веществе зародышевого пузырька и определяет нормальное прохождение гастрюляции. Инъекция ядерного сока из ооцитов дикого типа в яйца мутантных самок по гену «О» исправляет дефектность их развития и обеспечивает нормальное прохождение гастрюляции (Briggs, Cassens, 1966). Аналогичным образом в период оогенеза определяется право- и левозакрученность раковины у некоторых моллюсков. Эти примеры показывают, что в ходе оогенеза осуществляется функция генов, контролирующих и сам оогенез, и последующее развитие. Функция этих генов выражается прежде всего в синтезе РНК.

Содержание РНК в яйце

В процессе оогенеза происходит увеличение ооцитов, клеток обычного размера диаметром 10–20 мкм до размера зрелых ооцитов и яиц, имеющих диаметр от 50–100 мкм (млекопитающие, иглокожие, некоторые насекомые) до нескольких сантиметров (птицы, акуловые рыбы). Это означает, что за время оогенеза объем ооцита возрастает в 10^2 – 10^{12} раз (у большинства организмов — в 10^3 – 10^6 раз). Увеличение размеров ооцита происходит в основном за счет накопления желтка. Но одновременно возрастают количества и многих РНК-содержащих структур — рибосом, митохондрий и т. д.

Абсолютное содержание РНК в зрелых яйцах у разных видов животных коррелирует с размерами яиц и колеблется от $6 \cdot 10^{-5}$ мкг у аскариды до $2 \cdot 10^3$ мкг у птиц.

Большая часть РНК яиц входит в состав рибосом. У амфибий не менее 95% представлено молекулами 28S и 18S рРНК (Brown, Littna, 1964, 1966). Столь же велико относительное содержание высокополимерных рРНК в яйцах рыб (Тимофеева, Кафиани, 1964; Айтхожин и др., 1964), морских ежей (Nemer, 1963; Slater, Spiegelman, 1966; см. Giudice, 1973), червей (Schwartz, 1970), насекомых (Harris, Forrest, 1967; Lockshin, 1966), ракообразных (McClellan, Warner, 1972), птиц (Lerner et al., 1963) и млекопитающих (Mintz, 1964a) (табл. 6). Абсолютное содержание рРНК в яйце намного превышает содержание рРНК

Таблица 6

Содержание основных типов РНК в неоплодотворенных яйцах животных

Вид	Общее содержание РНК в яйце, мкг	28S+18S рРНК	5S рРНК	тРНК	мРНК
		мкг	мкг	мкг	мкг
Шпорцевая лягушка *					
Xenopus laevis	4,0	3,8	0,06	0,04	0,047
Вьюн **					(1,9%)
Misgurnus fossilis	2,4—2,6	2,3—2,6	0,021— 0,026	0,021— 0,035	—
Эхиуриды, червь ***					
Urechis caupo	$13,5 \cdot 10^{-3}$	$12 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-3}$	—
Морской еж ****					
Strongylocentrotus nudus	$7,8 \cdot 10^{-3}$ $2,0 \cdot 10^{-3}$	—	—	—	(4,3%)

** Brown, Littna, 1964, 1966; Davidson et al., 1968.

** Айтхожин и др., 1964; Тимофеева, Кафизани, 1964; Соловьева и др., 1973а.

** Schwartz, 1970.

**** Тимофеева и др., 1969; Дэвидсон, 1972; Slater, Spiegelman, 1968.

в клетках взрослого организма. Это справедливо не только в отношении крупных яиц, по объему во много раз превосходящих соматические клетки, но и в отношении мелких яиц. Тем не менее концентрации РНК в мелких и в средних яйцах и в соматических клетках различаются незначительно. Так, например, в яйцах млекопитающих содержится $1-2 \cdot 10^{-3}$ мкг рРНК, т. е. $2,5-5 \cdot 10^8$ рибосом, в то время как в клетках печени имеется 10^6-10^7 рибосом. По объему яйца млекопитающих в 10^2-10^3 раз больше соматических клеток, и концентрация РНК в тех и других, следовательно, приблизительно одинакова.

В яйце ксенопуса содержится около 4 мкг рРНК (Brown, Littna, 1964), что соответствует 10^{12} рибосом, т. е. в 10^5-10^6 раз больше, чем в соматических клетках. По объему же эти яйца в $2 \cdot 10^5$ раз больше клеток печени, т. е. и в этом случае концентрации рРНК различаются мало. В крупных яйцах птиц, в основном заполненных желтком, концентрация рРНК на один—два порядка ниже.

Помимо высокомолекулярных рРНК, в яйце имеются низкомолекулярные РНК, к которым относятся рибосомальная 5S рРНК и транспортные 4S рРНК.

В неоплодотворенном яйце амфибий вся 5S рРНК находится в составе рибосом (Brown, Littna, 1966). Молярное отношение 28S и 18S рРНК к 5S рРНК в рибосомах равно 1, и в соот-

в соответствии с молекулярными весами ($1,5-1,7 \cdot 10^6$; $0,65 \cdot 10^6$ и $0,036 \cdot 10^6$) весовое содержание отдельных видов рРНК должно составлять в среднем 67, 31 и 1,6% для 28S, 18S и 5S рРНК. В яйцах ксенопуса содержание 5S рРНК равно 0,060 мкг, или 1,5—2% от суммы всех РНК. Таким образом на одну рибосомную частицу действительно приходится по одной молекуле 5S РНК (Brown, Littna, 1966). У вьюна, однако, оказалось, что содержание 5S рРНК в яйце равно $2,5 \cdot 10^{-2}$ мкг, или 1% от суммы всех РНК. Следовательно только 60% рибосом содержат 5S РНК (Соловьева и др., 1973а). Так же мало относительное содержание 5S рРНК в яйце морского червя *Urechis*: $1,3 \cdot 10^{-4}$ мкг 5S рРНК и $1,2 \cdot 10^{-2}$ мкг высокополимерной рРНК (Schwartz, 1970). Расчеты показывают, что только 65% рибосом *Urechis* имеют в своем составе 5S рРНК. Так как в отсутствие 5S рРНК рибосома неактивна, то недостаток 5S рРНК в яйцах этих видов животных свидетельствует о том, что не все рибосомы яиц являются функционально полноценными.

Относительное содержание тРНК в яйцах большинства видов животных невелико. У лягушки ксенопуса (Brown, Littna, 1966), вьюна (Соловьева и др., 1973а) — 1%, у морского червя *Urechis* (Schwartz, 1970) оно равно 10% от суммы РНК яиц. Хотя подобных определений содержания тРНК в яйцах не было сделано у других животных, некоторые данные, в частности седиментограммы суммарных препаратов РНК из яиц морских ежей (Slater, Spiegelman, 1966, 1968; Gross et al., 1965) и птиц (Lerner et al., 1963), позволяют заключить, что содержание 4S+5S РНК также невелико и в сумме не превышает 5% (рис. 5). Так как молекулярный вес тРНК на два порядка ниже молекулярного веса высокополимерной рРНК, можно считать, что на одну рибосому приходится примерно 1—2 молекулы тРНК. Это по крайней мере в 10 раз ниже, чем в соматических клетках.

По данным Брауна и Литтна (Brown, Littna, 1966), у ксенопуса основная часть тРНК в яйце находится в свободном состоянии в цитоплазме и лишь 10% ее связано с рибосомами. Такое соотношение тРНК и рибосом обеспечивает нормальное функционирование только 10% рибосом яйца. Подобная ситуация наблюдается, по-видимому, не у всех животных. Имеются данные, что в яйцах некоторых беспозвоночных содержание тРНК гораздо выше. В ооцитах *Urechis* тРНК составляет 10% веса всей РНК и на одну рибосому приходится 10 молекул тРНК (Schwartz, 1970).

Не менее существенным является то, в какой степени в яйце представлены все необходимые виды тРНК и может ли такой набор тРНК обеспечить синтез различных белков. Этот вопрос исследован более подробно только у морских ежей и амфибий.

Растворимая фракция, полученная центрифугированием гомогената неоплодотворенных яиц морских ежей при 100 тыс. g, нормально стимулировала включение аминокислот в белки в при-

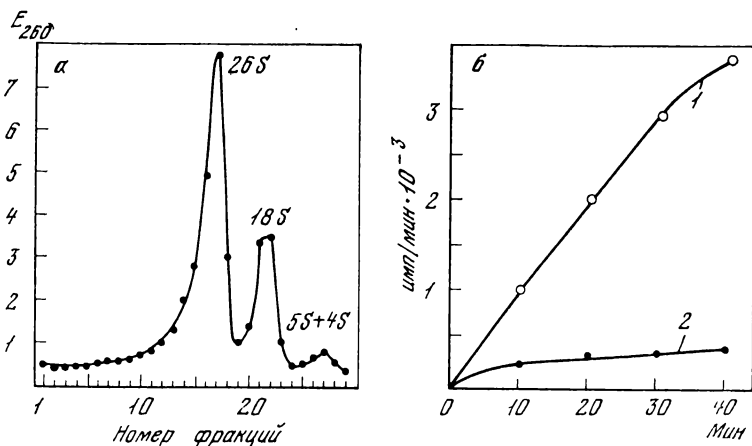


Рис. 5. Тотальная и матричная РНК яиц морского ежа *Lytechinus pictus*. РНК неоплодотворенных яиц *Lytechinus pictus* анализировали в сахарозном градиенте (а) и определяли ее матричную активность в бесклеточной белоксинтезирующей системе (б) по включению ^{14}C -серина; 1 — в систему добавлено 50 мкг РНК яйца, 2 — контроль (без РНК яйца). Видно, что основную массу РНК яйца составляет рРНК (пики 26S, 18S, 5S) и тРНК (4S). Матричная активность РНК составляет 4% (Slater, Spiegelman, 1966)

существовании рибосом зародышей (Timourian, 1967). Это показывает, что в неоплодотворенном яйце имеется весь набор тРНК и соответствующих аминокисляцирующих ферментов.

Еще раньше Немер и Берд (Nemer, Bard, 1963) продемонстрировали синтез белка во фракции гомогената из неоплодотворенных яиц морских ежей. Добавление экзогенной тРНК из дрожжей стимулировало синтез белка в незначительной степени. Таким образом, разные виды тРНК в неоплодотворенном яйце имеются в количествах, достаточных для поддержания синтеза белка, и не относятся к лимитирующим этот процесс факторам.

То, что в яйцах амфибий имеется необходимый набор тРНК доказывается тем, что в них происходит достаточно интенсивный синтез белка (Smith et al., 1966). Еще более показательным в этом отношении является интенсивный синтез самых различных белков на матрицах мРНК, инъецированных в ооцитах и яйца амфибий (Gurdon, 1974).

Важнейшим компонентом РНК неоплодотворенных яиц является информационная РНК. Ее содержание очень мало, и она гетерогенна по молекулярному весу. Поэтому мРНК нельзя выявить в виде отдельных пиков оптической плотности среди других РНК при разделении их седиментацией в градиенте концентрации сахарозы. Есть, однако, ряд оснований утверждать наличие мРНК в неоплодотворенном яйце. Так, РНК, выделенные из неоплодотворенных яиц морского ежа, могут служить матри-

цами для синтеза белка в системах *in vitro* (Maggio et al., 1964; Gross et al., 1973).

Далее было показано, что в безъядерных зародышах вьюна, полученных при слиянии половых клеток, ядра которых предварительно инактивировали действием высоких доз рентгеновского облучения, синтез белка происходит в течение длительного периода «жизни» этих зародышей (Нейфах и др., 1968). У морских ежей включение меченых аминокислот в кислотонерастворимый материал обнаружен в безъядерных половинках зиготы (Brachet et al., 1963; Denny, Tyler, 1964; Baltus et al., 1965). Чувствительность этого включения к пуромицину позволила заключить, что он действительно отражает белковый синтез, происходящий на функционирующих полисомных комплексах (Burny et al., 1965).

У лягушки *Rana pipiens* зрелые ооциты с удаленным зародышевым пузырьком способны к повышенному синтезу белка, если созревание было индуцировано гормоном (Ecker, Smith, 1968).

Небольшой синтез белка обнаруживается и в неоплодотворенных яйцах морского ежа (Timourian, 1967; Mackintosh, Bell, 1969a, b; Timourian, Watshmaker, 1970; Smith et al., 1966).

Данные о наличии информационных РНК в зрелых ооцитах и яйце были получены в работах, в которых определяли матричную активность РНК, выделенных из ооцитов и яиц. Матричную активность измеряли по способности стимулировать включение меченых аминокислот в кислотонерастворимый материал в системе биосинтеза белка *in vitro*. В качестве такой системы в большинстве случаев используются рибосомы и растворимые компоненты белоксинтезирующей системы *E. coli* (фракция S_{30} , получаемая по Ниренбергу и Маттеи центрифугированием при 30 000 g гомогената бактерий, обработанного ДНК-азой. Для элиминации собственных матриц фракцию предынкубировали в присутствии необходимых солей и кофакторов в течение 45 мин.). Для количественного выражения активности параллельно ведутся определения синтеза белка в тех же условиях, но в присутствии РНК, которая рассматривается как 100%-ная матрица. Такой РНК является РНК вируса MS2. Включение аминокислот в кислотонерастворимый материал в присутствии РНК с неизвестным содержанием матриц относят к включению с РНК MS2 и матричную активность выражают в процентах. Ввиду того, что матрица в этих условиях может быть прочитана не один раз, а несколько, Слейтер и Спигельман (Slater, Spiegelman, 1968) предложили использовать вместо термина «матричная активность» термин «относительный титр матриц». На бактериальной белоксинтезирующей системе от 2,5 до 5% всей РНК яйца ксенопуса обнаруживают матричную активность (Davidson et al., 1966; Cape, Decroly, 1969). Число транскриптов с неповторяющихся нуклеотидных последовательностей (РНК уникальных типов) в яйце ксенопуса определено как $7 \cdot 10^{11}$ нуклеотидов, т. е. всего $4 \cdot 10^{-4}$ мкг, или 0,01% всей РНК яйца.

Определенную часть РНК яйца составляют РНК митохондрий. Эта РНК в основном входит в состав митохондриальных рибосом. Она отличается и от рРНК эукариот и от рРНК прокариот и имеет мол. вес $5,3 \cdot 10^5$ и $3,0 \cdot 10^5$. Ее количество не превышает 1—2% всей РНК яйца.

В яйцах морского ежа соотношение видов РНК приблизительно такое же: из 2 пг РНК 95% составляют рРНК и тРНК и 4% — ДНК-подобная (мРНК). Матричной активностью в яйцах морского ежа обладает 4,5% РНК (рис. 5) (Slater, Spiegelman, 1968). Некоторые данные о содержании РНК в яйцах представлены в табл. 6.

Накопление РНК в оогенезе

Скорость накопления РНК в ооците определяется конечным содержанием РНК в яйце и временем оогенеза. Между размерами яиц и продолжительностью оогенеза нет прямой зависимости, хотя у видов, имеющих большие яйца и большое количество в них РНК, оогенез обычно продолжителен. В значительной мере скорость оогенеза определяется биологией размножения, продолжительностью жизни, периодами спячки и т. д.

Самые короткие сроки оогенеза измеряются, по-видимому, несколькими днями — у дрозофилы весь цикл развития составляет 10—15 дней. Относительно короток оогенез у некоторых млекопитающих — у мыши он начинается в середине эмбриогенеза, за 10 дней до рождения, и завершается уже через 2,5—3 месяца после рождения. Это, однако, несвойственно многим другим млекопитающим, где оогенез может продолжаться годы.

Амфибии, у которых оогенез был изучен наиболее полно, можно разделить на две группы: зимующие формы с сезонным размножением и размножающиеся круглогодично, тропические. У амфибий, размножающихся сезонно, развитие ооцитов начинается сразу после метаморфоза, а завершается через 2 или 3 года. У африканской шпорцевой лягушки — ксенопуса (*Xenopus laevis*) он продолжается, по-видимому, не менее 6—8 месяцев, а у тропической южноамериканской лягушки *Engystomops pustulosus* длится 2,5—3 месяца (Davidson, Hough, 1969b).

Аналогичное разнообразие можно видеть и у рыб. Некоторые тропические аквариумные рыбки начинают размножаться уже в 2,5—3-месячном возрасте, но у северных рыб первый нерест наступает только через один или два года. У проходных осетровых рыб первый нерест происходит только через 8—12 лет, что связано, по-видимому, с их продолжительным ростом в море.

У птиц и рептилий оогенез обычно измеряется месяцами и годами.

Различные виды РНК накапливаются неравномерно, и синтез их идет не на всем протяжении оогенеза. У морского ежа значительная часть мРНК синтезируется только в конце оогенеза (Piatigorsky, Tylor, 1967; Giudace et al., 1972a; Sconco et al.,

1972). У червя *Urechis sauro* синтез рРНК идет на всем протяжении оогенеза, но интенсивность синтеза резко (в 4—5 раз) возрастает в последнюю треть оогенеза. Позже было показано, что синтез и накопление РНК на ранних стадиях оогенеза *Urechis* несколько обгоняют увеличение объема ооцитов (Miller, Epel, 1973; Schwartz, 1970; Davis, Wilt, 1972). У ксенопуса вначале синтезируются преимущественно низкомолекулярные

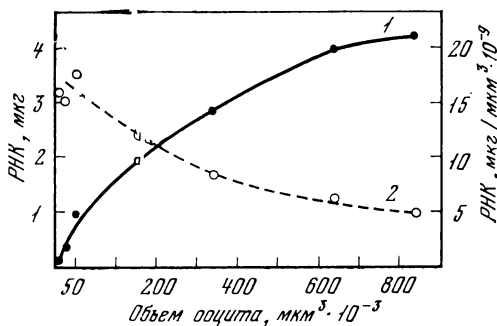


Рис. 6. Накопление РНК в оогенезе ксенопуса

Увеличение абсолютного количества (1), и уменьшение концентрации (2) РНК цитоплазмы в зависимости от объема ооцита (Scheer, 1973)

РНК (5S рРНК и тРНК), а затем в период большого роста активируется синтез 28S и 18S рРНК, а также мРНК. Относительное содержание разных типов РНК в ходе оогенеза ксенопуса показано в табл. 7 и на рис. 6, 7, 8. Предполагалось, что в зрелых ооцитах синтез всех видов РНК прекращается и лишь во время созревания происходит кратковременная вспышка синтеза ДНК-подобной РНК (Brown, Littna, 1964). Однако более поздние работы показывают, что синтез РНК продолжается и в ооцитах, достигших полного размера (морской еж — Leveger, 1974; ксенопус — Colman, 1974, La Marke et al., 1975). Предполагается, что этот синтез компенсирует распад РНК, который происходит и в оогенезе.

Таблица 7

Изменение относительного содержания разных типов РНК в оогенезе ксенопуса (Rosbach, Ford, 1974)

Стадия	РНК в ооците, мкг	РНК, %			
		28S	18S	5S	4S
Ранний превителлогенез	0,04	5	3	45	47
Поздний превителлогенез	0,07	32	17	31	20
Ранний вителлогенез (d = 200—300 мкм)	1,2	56	24	11	9
Средний вителлогенез (d = 500—600 мкм)	3,5	63	29	5	3
Зрелый ооцит (d = 1000—1200 мкм)	4,3	65	29	3	2,9

Скорость всех синтезов скоординирована так, что в ходе оогенеза создается белоксинтезирующий аппарат, не только обеспечивающий синтез белков в ооците, но и значительный период эмбрионального развития.

Источники накопления РНК

Типы оогенеза можно разделить на две группы — те, в которых РНК синтезируется собственным ядром ооцита, и те, в которых РНК синтезируется вспомогательными (питающими) клетками. Возможно, что существуют такие виды, у которых сочетаются оба способа накопления РНК.

У многих насекомых (двукрылые, жуки), червей функционируют питающие клетки, которые отличаются от фолликулярных тем, что образуются вместе с ооцитом из одной оогонии и остаются связанными с ним особыми каналами. Так, у дрозофилы в результате четырех делений создается 16 клеток, из которых одна становится ооцитом, а остальные 15 — питающими клетками. У других насекомых аналогичным образом возникают комплексы после трех делений оогонии — семь питающих и ооцит.

Авторадиографические исследования, проведенные пока на не очень многих объектах, показывают, что синтез РНК происходит исключительно или почти исключительно в ядрах питающих клеток и практически отсутствует в собственном ядре ооцита. Это было найдено у некоторых насекомых (Bonhag, 1955; Bier, 1963; Koch et al., 1967). Прослеживание метки показывает ее выход в цитоплазму и переход по каналам в цитоплазму ооцита. В яичниках павлиноглазки показано, что в питающих клетках синтезируются тРНК, рРНК, полиА-содержащая мРНК, которая составляет 0,2—0,3% всей новосинтезированной РНК. Актиномициповый чейз позволил наблюдать транспорт мРНК и тРНК в ооцит, который завершается уже через 2—4 часа после синтеза. Транспорт рРНК осуществляется медленнее (Paglia et al., 1976a). У других насекомых, однако, синтез РНК идет в ядрах самих ооцитов (Kunz, 1967). Короткий период синтеза РНК в ядре ооцита обнаружен и у дрозофилы (Mahowald, Tiefert, 1970).

Давидсон, основываясь на данных электронной микроскопии (Zamboni, Gordon, 1968), предполагает, что у кроликов ооциты связаны такими же каналами друг с другом, и в результате атрезии содержимое одних ооцитов попадает в другие.

Фолликулярные клетки образуются из стромы яичника, т. е. в отличие от питающих клеток не принадлежат к клеткам зародышевого пути. Может быть, это отличие не имеет глубокого биологического смысла и объясняется лишь тем, что между дочерними клетками проще образуются синцитиальные связи, соединяющие их каналы. Но, может быть, эти отличия и принци-

альны, т. е. определяются какими-то генетическими особенностями клеток зародышевого пути. Так, очень вероятно, что у животных с элиминацией хромосом или диминуцией хроматина в соматических клетках исключаемый в этих процессах генетический материал служит именно для оогенеза (Geyer-Duszynska, 1966). Для фолликулярных клеток, выполняющих, по-видимому, лишь вспомогательные функции, наличие этих «генов оогенеза» и принадлежность к клеткам зародышевого пути, очевидно, не обязательны. Напротив, сохранение полного генотипа в питающих клетках, синтезирующих РНК для ооцита, не только оправдано, но и совершенно необходимо. Этому предположению, казалось бы, противоречит описанный Вильсоном и обсужденный в интересующем нас аспекте Давидсоном (1972) пример с оогенезом у жука-плавунца *Ditiscus*.

Элиминация (или диминуция) хроматина у этого объекта происходит не в раннем эмбриональном развитии, как обычно, а только перед оогенезом в ходе четырех делений оогония. В результате возникает ооцит с полным хромосомным набором и 15 питающих клеток, у которых значительная часть хроматина отсутствует. Хотелось бы объяснить, каким образом клетки, синтезирующие РНК для ооцита, могут делать это без хроматина, казалось бы, специально для оогенеза предназначенного. По мнению Давидсона, свою генетическую функцию эти ядра осуществляют до делений. (Аналогичная ситуация наблюдается в спермиогенезе, где специфическая функция ядер осуществляется до мейоза.) Нам кажется, однако, что в данном случае возможно и другое объяснение — далеко зашедшая специализация ядер питающих клеток выражается в инактивации хроматина, не участвующего в оогенезе. В пользу этого предположения говорит и то, что «диминуция» происходит у *Ditiscus* только в ходе делений оогоний и не затрагивает соматических клеток. Поэтому ее нельзя считать процессом, в генетическом смысле полностью аналогичным диминуции и элиминации в ходе делений дробления. Исследование этого объекта через много десятилетий после Вильсона с применением современных методов было бы крайне интересным.

Вторая важная особенность питающих клеток — их полиплоидия (см. Puckett, Snyder, 1974). Действительно, быстрый оогенез, очевидно, не может осуществляться только за счет того, что РНК синтезируется не одним, а 7-ю или 15-ю ядрами. Увеличение количества матриц ДНК для синтеза РНК достигается путем полиплоидизации ядер, генетический аппарат которых в дальнейшем развитии зародыша не участвует и потомству не передается. Полиплоидия, очевидно, успешно заменяет такую форму активизации хромосом, как «ламповые щетки», потому что эти структуры в питающих клетках никогда не наблюдаются. Специализация и активная функция этих ядер выражается также в их форме, напоминающей ядра по-особому дифференцированных шелкоотделительных желез.

Синтез РНК происходит также и в фолликулярных клетках, но он не рассматривается как синтез РНК для ооцита (см. Webb, 1976). В этих случаях активно функционирует собственное ядро ооцита, и клеточные мембраны, разделяющие яйцо и фолликулярные клетки, обычно не нарушаются. Однако исключить роль фолликулярных клеток как источников РНК для оогенеза полностью и во всех случаях все же нельзя. В эмбриологической литературе имеются десятки вполне достоверных морфологических описаний того, как у разных объектов фолликулярные клетки инъецируют в ооцит свое содержимое или захватываются им целиком. В какой степени это является способом роста ооцита и попадают ли при этом в ооцит также и функционально полноценные РНК, судить сейчас трудно.

Вторым и, по-видимому, основным способом накопления РНК в оогенезе является ее синтез собственным ядром ооцита. В предыдущей главе уже описаны те преобразования ДНК, которые при этом происходят. Очевидно, петли ламповых щеток должны считаться местом синтеза для разных типов РНК (Gall, Callan, 1962; Davidson et al., 1964; Дэвидсон, 1972). Только высокомолекулярные рРНК (28S и 18S) синтезируются на амплифицированных рДНК в ядрышках, причем интенсивность синтеза РНК в ядрышках намного выше, чем на петлях ламповых щеток (Davidson, Mirsky, 1965). Это показано не только для амфибий, но также для рыб, птиц и даже некоторых насекомых (Kunz, 1967), которым чаще свойственно использование питающих клеток. В значительной степени ДНК-подобные РНК скапливаются в самом зародышевом пузырьке, оставаясь, в частности, в составе петель ламповых щеток. Так, если в хроматине соматических клеток (печень) отношение РНК : ДНК близко к 1 : 15, то в хромосомном наборе зародышевого пузырька тритона содержится 0,8 мкг ДНК и 70 мкг РНК, т. е. отношение РНК : ДНК составляет около 100 : 1. Нуклеотидный состав этой РНК — ДНК-подобный (Gall, Edstrom, 1963), что позволило рассматривать петли ламповых щеток как место хранения мРНК (Hess, 1968; Дэвидсон, 1972).

В настоящей главе мы будем в основном рассматривать РНК, синтезированную в зародышевом пузырьке ооцита, так как исследования в этой области были проведены преимущественно на ооцитах ксенопуса.

Синтез транспортных РНК

Синтез тРНК в оогенезе был исследован на ооцитах ксенопуса. Первые работы по синтезу тРНК были проведены Брауном и Литтла в 1964—1966 гг. Более подробные и новые данные на этом же объекте получены Дени и сотр. в последующие годы (Mairy-von-Frenckell, 1970; Denis, 1974; Mairy, Denis, 1970, 1971, 1972; Wegnez, Denis, 1972).

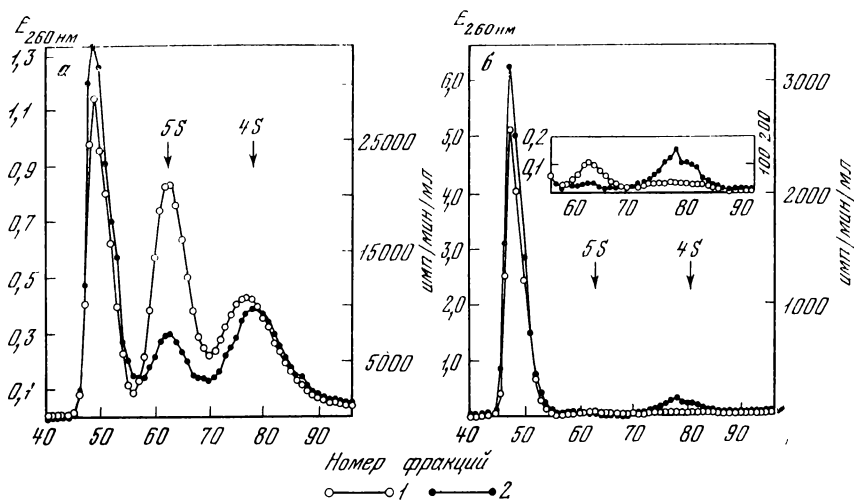


Рис. 7. Относительное содержание и синтез 4S (тРНК) и 5S РНК в оогенезе ксенопуса

Ооциты в раннем (а — 90 мкм в диаметре) и позднем (б — 600 мкм) оогенезе инкубировали 4 час. с ^3H -гуанозином. РНК выделяли, фракционировали на сефадексе G-100. Определяли количество РНК (1) и радиоактивность (2). Относительное количество 4S и 5S РНК и скорость их синтеза на ранней стадии значительно выше, чем на поздней (Mairy-von-Frenckell, 1970)

Дени разделял ооциты по размерам: наиболее мелкие со средним диаметром 50, 90 и 150 мкм были получены путем мягкого переваривания проназой и обработкой ЭДТА яичников из молодых лягушат размером 1,5, 2,5 и 4,0 см соответственно. Эти ооциты находились в периоде малого роста, и структуры ламповых щеток еще не достигли у них полного развития. Ооциты ббльших размеров были получены из взрослых самок; их изолировали от фолликулярных клеток проназой и сортировали путем просеивания через сито на четыре класса со средними диаметрами 375, 600, 850 и 1100 мкм. Последний класс это уже ооциты, закончившие рост и готовые к овуляции. Начало большого роста, отложение желтка и пигмента соответствуют четвертому классу, т. е. самым маленьким ооцитам (375 мкм), выделенным из взрослых самок. На этой стадии наибольшего развития достигают структуры ламповых щеток, и она может быть отнесена к четвертой стадии оогенеза (по Дьюри). Из работы Дени видно, что если объем ооцитов при переходе от стадии к стадии возрастает в 3—4 раза, то при переходе от ооцитов третьего класса (ооциты из лягушат длиной 4 см) к четвертому классу («мелкие» ооциты взрослой лягушки) объем увеличивается почти в 16 раз. По времени разрыв между этими стадиями также наибольший и составляет много месяцев.

Дени разделял РНК, выделенные из ооцитов, на колонке сефадекса G-100. Высокомолекулярные РНК — 28S, 18S и мРНК — движутся в этой колонке вместе с фронтом и выходят в виде одного острого пика (рис. 7), а 5S и 4S РНК отделяются друг от друга и образуют второй (5S) и третий (4S) пики. Природа РНК этих пиков была установлена и подтверждена по их нуклеотидному составу и методом гибридизации.

За 4 часа до получения ооцитов лягушкам вводили ^3H -гуанозин, и по радиоактивности РНК можно было судить о ее синтезе. Однако оценить изменения скорости синтеза разных видов РНК в ходе оогенеза, как обычно, по удельной активности не просто. Дело в том, что по мере оогенеза происходит накопление данного вида РНК, и, следовательно, измеренную радиоактивность приходится относить ко все большему количеству РНК. Правильнее, очевидно, рассчитывать ее на ДНК, на один геном или просто на один ооцит.

Абсолютное количество тРНК в ооците увеличивается на всем протяжении оогенеза, но происходит это неравномерно. Рост количества тРНК начинается уже в мельчайших ооцитах (первый класс) вскоре после метаморфоза. Мы не знаем, какое количество тРНК содержится в исходных клетках — оогониях, но оно не должно быть намного больше, чем в обычных клетках, т. е. составлять не более 5—10% от всей РНК. Между тем уже в ооцитах первого класса (диаметр ооцитов от 20 до 80 мкм, средний 50 мкм) тРНК составляет около 40% — больше, чем на этой стадии в ооците содержатся рРНК. Эта чрезвычайно высокая концентрация тРНК поддерживается и на последующих стадиях раннего оогенеза, хотя размер ооцита за это время возрастает в 27 раз. Следовательно, количество тРНК также значительно возрастает.

О высокой скорости синтеза тРНК на этих стадиях оогенеза можно судить и по радиоактивности соответствующих пиков (рис. 7) (Mairu, Denis, 1971). В период большого роста (классы 4—6) доля тРНК в ооците постепенно уменьшается до 2% (в зрелом яйце содержится около 1% тРНК), но это не означает, что ее синтез и накопление вовсе прекращаются. Как показывают прямые измерения, за время большого роста абсолютное количество тРНК увеличивается в три раза. Синтез тРНК, если судить о нем по радиоактивности третьего пика (Mairu, Denis, 1971), продолжается вплоть до конца оогенеза, хотя скорость синтеза в конце большого роста несколько замедляется. В целом же скорость накопления тРНК отстает от скорости роста ооцита. Это выражается и в отношении числа молекул тРНК к числу рибосом, и в отношении скоростей увеличения количества тРНК и массы ооцита.

На ранних стадиях оогенеза синтез тРНК составляет значительную часть всего синтеза РНК — на долю тРНК приходится около 36% всей метки. Часть синтезируемой тРНК сохраняется на протяжении многих месяцев последующего оогенеза. Отноше-

ние числа молекул тРНК к числу рибосом в ходе оогенеза меняется характерным образом. Сначала оно возрастает от 10 (отношение, характерное для соматических клеток) до 100 и более. Но затем, по мере накопления рибосом, это отношение уменьшается до очень низких значений (1—2). Однако у дрозофилы, например, такого уменьшения относительного содержания тРНК не происходит (Puckett, Snyder, 1974).

Не вся синтезированная в оогенезе тРНК сохраняется на протяжении всего периода роста и созревания ооцита. Значительная часть ее распадается, и происходящий в оогенезе синтез тРНК должен компенсировать и этот распад и обеспечивать накопление тРНК.

Преимущественный синтез и накопление тРНК были обнаружены также в ранних ооцитах у девяти видов рыб разных семейств (Mazabraud et al., 1975). Содержание тРНК в преривительных ооцитах у этих видов составляет от 20 до 70%.

Как показал Дени (Denis, Mairy, 1972), 90% всей тРНК находится в малых ооцитах амфибий в виде РНП-частиц, седиментирующих при 42S. Эти частицы содержат также 5S рРНК, но в меньших количествах. В период большого роста частицы (42S) исчезают и накопленная тРНК, очевидно, освобождается.

Состав видов тРНК в зрелых ооцитах ксенопуса оказался близким составу тРНК в тканях взрослых животных. Однако в малых ооцитах синтезируются тРНК, отличающиеся от тРНК поздних стадий оогенеза. Авторы полагают, что в ходе оогенеза происходит или модификация ранее синтезированных тРНК или появление новых видов (Denis et al., 1975). В специальном исследовании было показано, что синтез тРНК происходит без предполагавшейся ранее амплификации генов (Wegnez, Denis, 1972).

Синтез 5S рРНК

Синтез 5S рРНК был исследован Дени и сотр. в оогенезе на том же материале, на котором они исследовали синтез тРНК (Mairy, Denis, 1971, 1972). 5S рРНК входит в состав рибосомы вместе с 28S и 18S рРНК и составляет лишь 1,6% общей массы рибосомных РНК. В конце оогенеза, когда в рибосомах заключено 96—98% всей РНК яйца ксенопуса, количество 5S РНК не превышает 1,5—2%. Однако исследование синтеза и включение в состав рибосом этого компонента позволяют обнаружить новые механизмы хранения и использования РНК в оогенезе.

На ранних стадиях оогенеза, которые по времени, однако, составляют несколько недель, в ооцитах первого — третьего классов относительное содержание 5S рРНК составляет 30%—40%, т. е. во много раз выше, чем в соматических клетках. Содержание 28S и 18S рРНК на этих стадиях в весовом отношении также равно 30%. Это означает, что в молекулярном отношении у ранних ооцитов на одну молекулу 28S или 18S РНК приходится

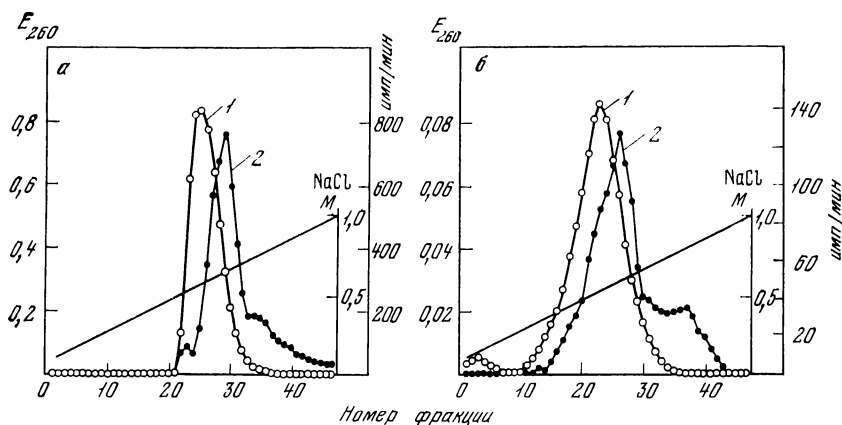


Рис. 8. Сравнение 5S рРНК, синтезирующихся в оогенезе и в эмбриогенезе
 а — меченую РНК из эмбрионов смешивали с немеченой РНК из ранних ооцитов;
 б — зародышей до стадии нейрулы выращивали с ^{32}P -фосфатом, введенным в яйцо.
 Выделяли 5S РНК и фракционировали на колонке МАК; 1 — РНК, запасенная
 в оогенезе (оптическая плотность), 2 — РНК, синтезируемая в зародышах (радио-
 активность). Видны различия в 5S РНК, синтезируемых в ооцитах и в зародышах
 (Denis, 1974)

60—100 молекул 5S РНК (рис. 7). На последующих стадиях оогенеза это отношение быстро уменьшается за счет синтеза 28S и 18S рРНК, но и после начала вителлогенеза у ооцитов четвертого класса (средний диаметр 375 мкм) молярное отношение 28S : 5S еще близко к 1 : 8. К этой стадии в ооците, масса которого пока еще составляет только 4% от массы зрелого ооцита, содержится не менее половины всей 5S рРНК яйца (Mairy, Denis, 1971, 1972). Синтез ее в раннем оогенезе идет с такой же скоростью, что и тРНК, но потом замедляется, хотя и продолжается до конца оогенеза. Дени показал, что синтезируемые в оогенезе молекулы 5S рРНК несколько различаются по нуклеотидной последовательности от 5S рРНК, синтезирующихся в клетках зародыша и взрослого организма (Denis et al., 1972) (рис. 8). Эти различия (шесть замен) позволяют разделить 5S рРНК яйца и зародыша на колонке МАК (Wegnez et al., 1972; Ford, Southern, 1973). Функциональное значение этих различий неизвестно (Denis et al., 1972).

Как уже говорилось выше, интенсивный синтез 5S рРНК в оогенезе обеспечен особым составом генома. В хромосомах ксенонупса *X. laevis* содержится около 24 000 генов для 5S РНК, из которых около 90% составляют гены для 5S РНК ооцитного типа и лишь около 10% — гены для 5S рРНК, функционирующие на всех остальных стадиях развития (Denis, 1974).

5S рРНК, синтезированная в раннем оогенезе, в значительной степени сохраняется вплоть до поздних стадий. Через 10 месяцев после синтеза не менее 50% метки остается в 5S рРНК (Denis et al., 1972).

Как и тРНК, 5S рРНК, синтезированные в период малого роста, включаются в состав 42S РНП частиц (Thomas, 1970; Denis, Mairu, 1972). В составе этих РНП частиц обнаруживается 30% 5S РНК, и поэтому молярное отношение 4S : 5S РНК в частицах 42S равно 3 : 1 (Ford, 1971; Denis, Mairu, 1972). В начале вителлогенеза, когда в ооците начинается интенсивный синтез 28S и 18S РНК, происходит распад частиц 42S, освобождение 5S РНК и формирование рибосом. В их состав включаются 5S РНК, как те, которые были запасены заранее, так и синтезирующиеся в период большого роста. По мере оогенеза все или почти все синтезированные 5S рРНК входят в состав рибосом (Mairu, Denis, 1972). Значительное содержание 5S РНК (от 20 до 30% всей РНК) было обнаружено также в превителлогенных малых ооцитах различных видов рыб (Mazabraud et al., 1975). У одного из видов (*Tinca vulgaris*) были найдены также отличия 5S РНК, накапливающихся в ооцитах, от 5S РНК соматических клеток. Как и гены тРНК, гены, кодирующие 5S РНК, в оогенезе не амплифицируются (Mairu, Denis, 1972).

Синтез 28S и 18S рРНК

Судить о синтезе 28S и 18S рРНК труднее, чем о низкополимерных компонентах, так как одновременно синтезируются мРНК с близкими седиментационными константами. Правильные представления о соотношении рРНК и ДНК-подобной РНК дает определение нуклеотидного состава синтезируемых молекул. У ксенопуса в рРНК содержание Г+Ц равно 61—62%, а в ДНК содержится 44% ГЦ-пар. Отсюда легко рассчитать доли рРНК и D-РНК в исследуемой высокополимерной РНК. Так, по данным Дени, в высокополимерной РНК у ооцитов в период малого роста содержится 49—50% Г+Ц. Это означает, что только 40% этой РНК является рибосомной, а остальные 60% — ДНК-подобной. В начале вителлогенеза ситуация меняется и доля рРНК во фракции высокополимерной РНК повышается до 80%, а затем достигает почти 95% (Mairu, Denis, 1971).

Для того чтобы судить о нуклеотидном составе не запасенной, а синтезируемой РНК, был использован в качестве предшественника ^{32}P -фосфат, равномерно включающийся во все нуклеотиды. В этом случае после четырехчасовой инкубации на всех стадиях оогенеза радиоактивность Г+Ц-нуклеотидов колебалась от 45 до 51% при среднем значении 48%. Это соответствует только содержанию 30% рРНК и может говорить о том, что 28S и 18S рРНК составляют меньшую, но долго живущую часть синтезируемой высокополимерной РНК. Об этом свидетельствуют седиментограммы полученных препаратов РНК (Mairu, Denis, 1971). По оптической плотности, т. е. по массе, почти все РНК представлены 28S и 18S РНК (на этой поздней стадии высокополимерная РНК составляет 94%). Однако профиль радиоактивности в

градиенте сахарозы образует в области 28S и 18S едва заметные пики — меченая высокополимерная рРНК распределена в широком диапазоне констант седиментации с максимумом около 37—40S. Эти большие рРНК могут быть предшественниками рРНК. В этих опытах инкубация в присутствии меченого фосфата продолжалась в течение четырех часов. Обычно за такое время высокомолекулярный предшественник рРНК успевает пройти процессинг, т. е. превратиться в зрелые формы — 28S и 18S рРНК. В яичниках мухи, например, весь процессинг рРНК от исходного предшественника 38S до зрелых форм — 28S и 18S продолжается около 40 мин. (Hall, Cummings, 1975). На седиментограммах под оптическими пиками 28S и 18S рРНК должна была бы тогда обнаруживаться значительная часть метки.

Тем не менее данные других авторов говорят о преимущественном синтезе на стадиях вителлогенеза высокополимерной рРНК. Так, Дэвидсон полагает, что синтез рРНК составляет 90—98% всей транскрипции на стадии ламповых щеток (Davidson et al., 1964, 1966). В более поздних работах, в которых меченую ГТФ инъецировали в средние и большие ооциты (четвертая и шестая стадии) и инкубировали 12 час., показано, что основная часть метки включается в 28S и 18S рРНК (La Marca et al., 1973), а включение в области 37—40S составляет лишь небольшую часть. Возможно, что процессинг рРНК в ооцитах амфибий происходит медленнее, чем у других объектов.

По последним данным на ксенопусе синтез рРНК в ранних ооцитах (100 мкм в диаметре) составляет 5% от всего синтеза и в конце этого превителлогенетического периода накапливается всего 0,3% всей рРНК яйца. Во время вителлогенеза (диаметр 400 мкм) синтез рРНК возрастает до 40% общего синтеза рРНК (Van Gansen et al., 1976). На тритоне более точные измерения, проведенные с учетом пула УТФ и скорости потребления ³H-уридина ооцитом, показали, что если синтез 28S и 18S рРНК в середине вителлогенеза принять за 100%, то во время превителлогенеза он составляет всего 0,01%, а в зрелых ооцитах снова уменьшается до 13% (Scheer et al., 1976). Эти различия в скорости синтеза рРНК коррелируют с числом транскрибируемых нитей рРНК, видимых в ядрышках в электронный микроскоп. Авторы заключают, что различия в скорости синтеза рРНК во время оогенеза действительно достигаются регуляцией транскрипции и даже, точнее, числом мест инициации (Scheer et al., 1976).

В период большого роста накопление рРНК благодаря ее стабильности происходит довольно быстро. Так, к началу вителлогенеза (класс 4) ооциты накапливают лишь около 9% всей рРНК будущего яйца. К этой стадии ооциты уже содержат более 30% тРНК и около 50% 5S рРНК яйца. Следовательно, за период большого роста ооцита происходит накопление остальных 90% рРНК, 70% тРНК и 50% 5S рРНК (Denis, Mairy, 1972; Denis, 1974). Это означает, что если в периоде малого роста 28S и 18S рРНК

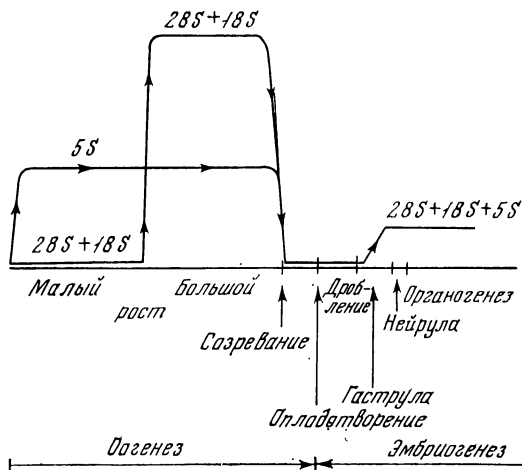


Схема 1. Изменение интенсивности синтеза рибосомальных РНК в оогенезе и эмбриогенезе ксенопуса

Видна некоординированность синтеза 5S рРНК и 28S+18S рРНК в оогенезе и координированность в эмбриогенезе (Denis 1974)

накапливались в несколько раз медленнее низкополимерных РНК, то в период большого роста высокополимерные рРНК накапливаются быстрее их (схема 1). В этом отношении особенно активны ооциты классов 4 и 5. Как мы знаем по данным Кэлана, Мак Грегора и Тома (Callan, 1966; MacGregor, 1972; Thomas, 1972), именно на этих стадиях структура дополнительных ядрышек в зародышевом пузырьке ооцита приобретает форму, наиболее приспособленную к активной функции. Но и на шестой стадии скорость синтеза рРНК не снижается (La Marca et al., 1973). Этот синтез длительное время (до 10 дней) может происходить и в простой солевой среде (Colman, 1974).

Некоторые параметры синтеза рРНК и выхода из ядра в цитоплазму в оогенезе ксенопуса были определены в работе Шеера (Sheer, 1973). По его расчетам, транскрипция цепи про-рРНК (элонгация) происходит со скоростью 34 нуклеотида за 1 сек. Эта медленнее, чем элонгация рРНК в клетках HeLa (37°) — 90 нуклеотидов за 1 сек., но быстрее, чем в клетках одноклеточных водорослей — 12,5 нуклеотидов за 1 сек. (см. Sheer, 1973). При такой скорости транскрипции и числе функционирующих молекул РНК-полимеразы $67 \cdot 10^6$ (Miller, Beatty, 1969) в ядре ооцита в секунду образуется рРНК для 313 000 рибосом. В растущих соматических клетках эукариот в секунду образуется 10—100 рибосом (Loening, 1970). Эти различия хорошо согласуются с тем, что в ооцитах ксенопуса рДНК амплифицирована в 2000 раз.

По мере роста ооцита растет и его ядро, увеличивается поверхность ядра и число ядерных пор. За период большого роста ооцита количество ядерных пор возрастает от 10 до 37 млн. Это позволяет оценить скорость потока рРНК через ядерные поры. Она возрастает от 0,7 до 2,6 молекул в 1 мин. на одну пору к середине большого роста, уменьшается в конце роста ооцита и падает до нуля на стадии зрелого яйца (Sheer, 1973).

В пачале большого роста (ооциты четвертого-пятого класса) в период, когда размер ооцита увеличивается всего в 10—12 раз, количество рРНК нарастает с той же скоростью и создается ее наивысшая за весь период оогенеза концентрация. Высокополимерная рРНК, по-видимому, не образует длительно существующих промежуточных РНП-комплексов, а сразу же включается в состав формирующихся в это время рибосом. Преимущественный синтез рРНК был обнаружен также в ооцитах у морского ежа (см. Giudice, 1973) и морского червя *Urechis*, Davis, Wilt, 1972).

Синтез информационнои РНК

Трудности исследования синтеза и функции информационных РНК начинаются с самого определения этого типа РНК. Как уже говорилось во введении, в строгом смысле мРНК это РНК, транскрибированные в ядрах па структурных генах, вышедшие в цитоплазму и транслируемые на полирибосомах. Однако определение РНК по такому строгому критерию проводится только в отдельных случаях. Большое распространение получило понятие гетерогенной РНК, т. е. РНК с различными константами седиментации, в массе не совпадающими с 4—5S РНК и с рРНК (28S и 18S). Если гетерогенная РНК выделена из цитоплазмы, есть много оснований рассматривать ее как действительную мРНК. Но если она получена, как обычно, из целых клеток или из ядер, то значительная ее часть представлена предшественниками собственно мРНК, а часть же является ядерными РНК, функция которых до сих пор не выяснена. В литературе чаще используется понятие Д-РНК, т. е. РНК с нуклеотидным составом, близким к нуклеотидному составу тотальной ДНК. Это означает, что она транскрибирована не на генах, кодирующих рРНК и тРНК, имеющих иной нуклеотидный состав и представленных в геноме менее чем 1% ДНК. В качестве показателя нуклеотидного состава чаще используется не отношение А+У/Г+Ц, близкое у животных к 1,5 для Д-РНК и 0,7 — для рРНК, а эквивалентная величина — содержание Г+Ц-пуклеотидов, которое у Д-РНК составляет 40—45%, а у рРНК 60—65%. Так, например, содержание Г+Ц в РНК хромосом типа ламповых щеток, как и в ДНК, составляет около 45%, в то время как РНК ядрышек имеет 60% Г+Ц (Edstrom, Gall, 1963).

Наконец, о мРНК можно судить по ее матричной активности, т. е. по способности активировать включение меченых аминокис-

лот в системе Ниренберга (искусственно составленной системе белкового сипетеза из *E. coli*). Такая оценка количества мРНК, казалось бы, наиболее точная, так как прямо характеризует исследуемую величину. Однако в действительности такой способ оценки несет ошибки, тем более неприятные, что их трудно оценить. Количество мРНК, определенное таким способом, может быть занижено вследствие того, что бактериальные рибосомы и другие факторы синтеза белка хуже адаптированы к матрице животного происхождения. С другой стороны, известно, что ряд видов РНК в условиях *in vivo* не транслируется, а в исследуемой системе может служить матрицами или, во всяком случае, активировать включение аминокислот. Их участие будет завышать определяемую величину. Для оценки количества мРНК этим способом ее сравнивают со стандартом — матричной активностью вирусных РНК. Однако нет уверенности в том, что все мРНК животных и вирусные РНК транслируются с одинаковой эффективностью и равное число раз (Slater, Spiegelman, 1968). В последнее время критерием для мРНК считают РНК, содержащие полиА-фрагменты, выделенные сорбцией на олигоТ-колонке.

Для определения содержания мРНК в ооците использовали все эти оценки, и, очевидно, не следует настаивать на правильности того или иного термина (мРНК, гетерогенные РНК, Д-РНК), а каждый раз указывать метод определения.

Синтез мРНК в оогенезе амфибий справедливо связывают со структурами ламповых щеток — действительно активный синтез на тысячах петель ДНК не может быть ничем иным (Izawa et al., 1963a; Edstrom, Gall, 1963). Петли ламповых щеток удлиняются постепенно и достигают максимальных размеров уже в начале вителлогенеза (четвертая стадия по Дьюри и, вероятно, класс 4 по Дени). Авторадиографические данные показывают, что на всех этих стадиях происходит интенсивный синтез РНК (Gall, Callan, 1962).

В отношении синтеза мРНК на более ранних стадиях мы располагаем лишь данными Дени о нуклеотидном составе синтезирующихся высокополимерных РНК. Эти данные показывают, что Д-РНК составляют значительную часть транскрибируемых молекул. На более поздних стадиях оогенеза, исходя из нуклеотидного состава синтезирующихся РНК, образуется не менее 60% ДНК-подобных РНК. Даже в конце оогенеза в больших ооцитах, когда интенсивность всех синтезов резко уменьшается, профиль меченой РНК на градиенте и ее нуклеотидный состав свидетельствуют о синтезе значительной части Д-РНК. Итак, можно заключить, что те или иные количества Д-РНК синтезируются на всех стадиях оогенеза амфибий, но особенно интенсивно это происходит в середине оогенеза, в период наибольшего развития ламповых щеток.

В оогенезе морских ежей синтез мРНК также обнаружен на различных стадиях, но удивительным оказалось то, что значи-

тельный синтез мРНК происходит у них в последние месяцы и даже недели оогенеза. При введении ^3H -уридина за 3 месяца до нереста в зрелых яйцах морского ежа оказывается не менее 10—20% меченой перирибосомной РНК (Piatigorsky, Tyler, 1967). Далее, при введении метки за неделю до нереста значительная часть метки оказывается в Д-РНК (Gross et al., 1965). Этот синтез продолжается и в зрелом яйце (Lcvner, 1974).

Синтез Д-РНК в самом конце оогенеза ксенопуса во время созревания был обнаружен Брауном и Литтна (Brown, Littna, 1966). Они исследовали синтез РНК после введения самкам ^{32}P -фосфата. В период созревания происходит значительная кратковременная активация синтеза, в ходе которой в яйце образуется от 1 до 6 нг новой РНК. В сахарозном градиенте меченая РНК не образует заметных пиков в области 28S и 18S, хотя процент Г+Ц-нуклеотидов в ней выше, чем в тотальной ДНК. У РНК с константой седиментации ниже 28S он равен 44%, а в области более тяжелых РНК — 55%. Можно предполагать, что не менее половины РНК, синтезируемых во время созревания, не являются рРНК и имеют ДНК-подобный нуклеотидный состав. Аналогичный синтез РНК был обнаружен также при созревании ооцита мыши после его извлечения из фолликула (Bloom, Mukherjee, 1972). Синтез РНК во время созревания яиц ксенопуса был подтвержден в последнее время (La Marca et al., 1973) (рис. 9). Авторы полагают, что синтез РНК должен происходить на всех стадиях оогенеза, в том числе и самых поздних, для того, чтобы компенсировать естественный распад РНК, накопленных ранее. Согласно их данным, период полураспада рРНК в ооците равен 9—30 дням, и, следовательно, поддержание постоянного количества РНК требует постоянного пополнения (La Marca et al., 1973; Leonard, La Marca, 1975).

Количество Д-РНК, накопленное в яйце за время оогенеза, нельзя со сколько-нибудь приемлемой точностью определить по нуклеотидному составу из-за большого избытка рРНК. Содержание мРНК в яйцах ксенопуса было определено по матричной активности.

По данным Дэвидсона (Davidson et al., 1966), в ооците ксенопуса на четвертой стадии около 2% РНК обладают матричной активностью, что составляет около 42 нг РНК. На шестой стадии в ооците это количество несколько выше (47 нг). В последующей работе тем же методом было найдено, что матричной активностью в ооците обладает около 7%, в зрелом яйце ксенопуса около 6% всей РНК (Cape, Decroly, 1969). В яйцах морского ежа обладают матричной активностью 4,5% РНК (Slater, Spigelman, 1966). К этим цифрам следует, однако, относиться достаточно критично, так как количество мРНК, обнаруживаемое на полирибосомах яиц морского ежа после оплодотворения и активации синтеза белка, оценивается в 10 раз меньше (Humphreys, 1971).

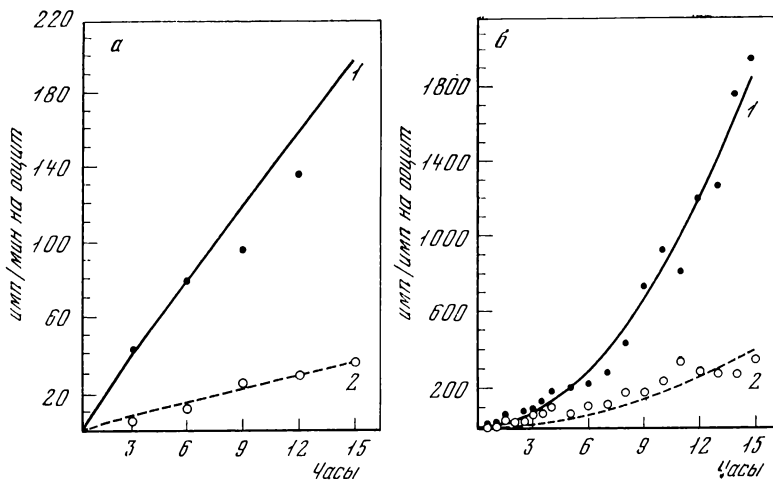


Рис. 9. Одинаковая скорость синтеза РНК в ооцитах ксенопуса на стадиях 4 («ламповые щетки», диаметр 500—600 мкм) и 6 (рост окончен, 1000—1200 мкм)

а — радиоактивность пула ГТФ в ооците; б — включение ^3H -ГТФ в РНК; 1 — стадия 6; 2 — стадия 4. Пул ^3H -ГТФ в малых ооцитах значительно меньше и, соответственно, меньше включение метки в РНК. Следовательно, скорость синтеза РНК на обеих стадиях приблизительно одинаковая (La Marca et al., 1973)

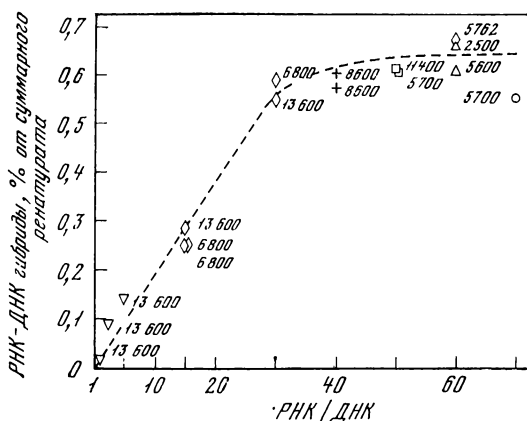


Рис. 10. Содержание в зрелом ооците ксенопуса РНК, транскрибированных с уникальных последовательностей ДНК

Фракцию уникальных ^{14}C -ДНК гибридизовали с ^3H -РНК ооцита в разных количественных соотношениях при значениях C_{ot} (ДНК), указанных на рисунке. Максимальная гибридизация составляла около 0,62%. Таким образом, доля уникальных ДНК («генов»), на которой транскрибировалась РНК в оогенезе, равна 1,2%. Выраженная числом пар нуклеотидов ($2 \cdot 10^7$), она отражает «сложность» совокупности уникальных транскриптов (Davidson, Hough, 1971)

Возможно, конечно, что не все мРНК транслируются в первые часы развития.

Оценка запасов мРНК в яйце была произведена также методом гибридизации РНК с ДНК. Важной характеристикой мРНК служит ее разнообразие или, иначе, количество генов, на которых она была синтезирована в течение оогенеза. Грубую оценку числа функционирующих генов дает подсчет числа петель в ламповых щетках. В гаплоидном наборе тритона насчитывается около 5 тыс. петель (см. Gall, Callan, 1962). При гибридизации в условиях насыщения оказалось, что у ксенопуса запасенная РНК комплементарна около 3% ДНК. По расчету Дэвидсона, это соответствует $8 \cdot 10^5$ генов. Можно отметить хорошее совпадение цифры 3% с 5% ДНК, которая обнаружена в петлях ламповых щеток.

Однако больший интерес представляет оценка мРНК, полученных гибридизацией с фракцией уникальных последовательностей, поскольку все структурные гены уникальны.

По данным Дэвидсона (Davidson, Hough, 1971), РНК ооцита комплементарна 1,2% уникальных последовательностей ДНК (рис. 10). Простой расчет показывает, что это количество ДНК эквивалентно $2 \cdot 10^7$ пар нуклеотидов или $4 \cdot 10^4$ генов, имеющих в среднем размер, необходимый для кодирования бета-цепей глобиновой молекулы. И эти цифры тем не менее кажутся завышенными, хотя они ближе к числу петель ламповых щеток.

Для того, чтобы достигнуть насыщения при гибридизации уникальных генов с РНК ооцитов, в этих опытах было достаточно избытка РНК над ДНК в 6—10 раз. Это означает, что каждый вид мРНК представлен в ооците относительно большим числом копий. Предполагая, что в ооците содержится не более 1% Д-РНК, а из них только $1/10$ — $1/100$ составляют неповторяющиеся последовательности, нетрудно рассчитать, что всего в ооците содержится $7 \cdot 10^{11}$ нуклеотидов мРНК. Если эти РНК синтезируются на ДНК, общая сложность которой составляет $2 \cdot 10^7$ пар нуклеотидов (1,2% всей уникальной ДНК), то каждый вид мРНК-транскриптов с уникальных ДНК представлен в ооците в количестве порядка 10^4 копий. Эти данные и расчеты Дэвидсона вряд ли следует принимать как очень надежные, так как они основаны на ряде допущений. Однако при этом возникает и некоторая неясность. Если допустить, что все эти РНК синтезируются в период ламповых щеток и что он продолжается 4 месяца, то синтез каждой из молекул РНК должен занимать время порядка 10^3 сек. ($10^7/10^4$ сек). Это явно медленнее, чем принято считать. Остается думать, что или число копий больше на порядок, или что в действительности в ооците остается не вся синтезированная РНК, а большая ее часть (как это происходит в соматических клетках) распадается вскоре после синтеза. Если даже принимать во внимание только синтез долгоживущих мРНК, то и в этом случае следует учесть, что в ооците синтезируются белки, и часть мРНК должна быть использована для этого процесса.

Чтобы оценить долю используемых мРНК, Давидсон произвел конкурентную гибридизацию на ДНК между РНК, синтезирующейся на стадии ламповых щеток, и РНК, имеющейся в зрелом яйце. Эти опыты показали (речь идет только о повторяющихся последовательностях), что конкуренция составляет 65%, т. е. РНК ооцитов на стадиях четвертой (ламповые щетки) и шестой (зрелый ооцит) имеет 65% общих последовательностей. Отсюда Давидсон делает вывод, что в ходе оогенеза между исследуемыми стадиями расходуется мРНК, синтезированная на 35% генов, активных на стадии ламповых щеток. Это рассуждение справедливо, если принять, что действительно между четвертой и шестой стадиями новых мРНК не образуется. При этом не учитывается также, что часть мРНК синтезируется до четвертой стадии и может расходоваться в ходе оогенеза. Наконец имеет значение и такой факт, как продолжительность включения ^{32}P в ооцит на стадии ламповых щеток. Если оно кратковременно (не более десятков минут), то в составе РНК будут все РНК, синтезируемые на этой стадии оогенеза. Если же мечение продолжается часы (как в опытах Давидсона), то заметно мечеными окажутся лишь долгоживущие РНК, в то время как короткоживущие за этот срок могут распадаться в ядре или выйти в цитоплазму, участвовать в трансляции и распасться после этого.

Важной характеристикой мРНК ооцита является степень ее полиаденилирования, которая позволяет оценить количество мРНК как молекул, несущих фрагменты полиА, хотя и не все мРНК содержат полиА-фрагменты.

В ооцитах ксенопуса количество фрагментов полиА, связанных с РНК, определялось путем гибридизации с полиУ. Было показано, что максимальное количество полиА-содержащих РНК образуется уже к началу вителлогенеза и далее остается постоянным, хотя общее количество РНК в ооците продолжает возрастать (рис. 11). В зрелом ооците доля полиА-РНК составляет 0,7–1% всей РНК (Rosbash, Ford, 1974). Эти цифры несколько меньше значений для мРНК ксенопуса, полученных другими методами, но они относятся только к полиА-содержащим мРНК.

На яйцах морского ежа было показано, что значительное полиаденилирование мРНК, уже ранее синтезированных в оогенезе, происходит в цитоплазме яйца после оплодотворения (рис. 12) (Wilt, 1973; Slater et al., 1973, 1974; Slater, Slater, 1974). Количество полиА-содержащих РНК возрастает при этом в 2–2,5 раза. Это может означать, что в оогенезе морского ежа аденилируются не все запасенные мРНК, и, следовательно, их количество, определенное этим методом в ооците, занижено по меньшей мере вдвое. Действительная ошибка в сторону занижения будет еще больше, если учесть, что гистоновые мРНК, составляющие значительную часть запасенных мРНК, не содержат полиА-фрагментов. ПолиА-фрагментов не содержат также некоторые другие мРНК (Nemer et al., 1975; Nemer, 1975).

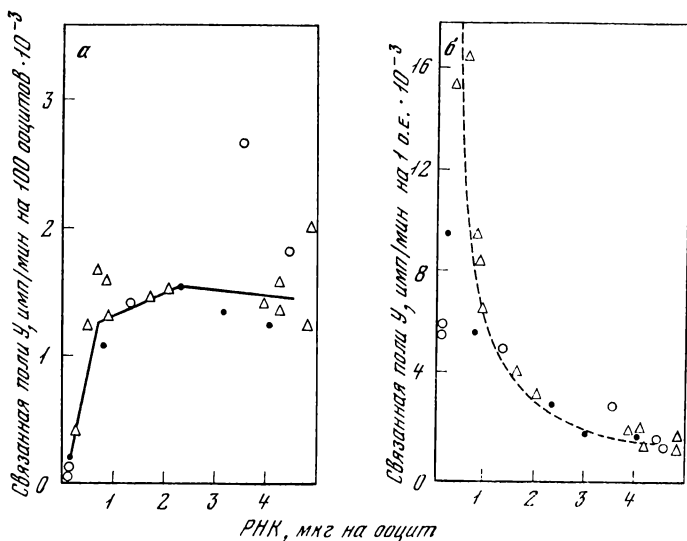


Рис. 11. Накопление полиА, содержащих РНК в оогенезе ксенопуса

Количество полиА-последовательностей в РНК ооцитов разного размера определяли по гибридизации с меченой полиУ и выражали в расчете на ооцит (а) или на РНК (б). Накопление полиА, содержащих РНК, происходит до начала вителлогенеза, а затем эти РНК разводят за счет синтеза РНК, не содержащей полиА (пунктирная кривая на рис. 6 — теоретическая кривая разведения) (Roshash, Ford, 1974)

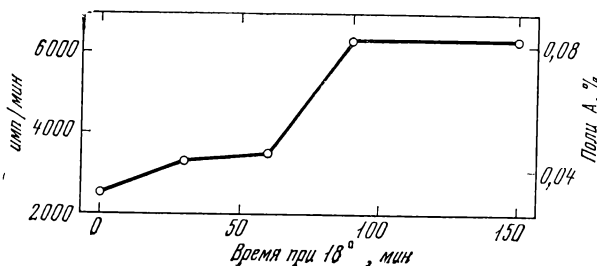


Рис. 12. Полиаденилирование РНК в яйцах морского ежа после оплодотворения

РНК выделяли из неоплодотворенных яиц на разных стадиях раннего развития зародышей *Lytechinus pictus* и для определения количества полиА гибридизовали с ³H-полиУ. Количество полиА, содержащих РНК, значительно возрастает перед первым делением дробления (Slater et al., 1972)

У амфибий измерений не производилось, и пока нельзя определить, насколько точно полученные для них данные о содержании фрагментов полиА отражают количество запасенной мРНК.

У млекопитающих сравнение количества полиА-содержащих РНК в неоплодотворенных яйцах кролика и после 10 час. развития (первое деление дробления) показало одинаковые значения

(0,25%) (Schiltz, 1975), хотя за это время несколько ббльшая часть полиА-содержащих РНК связывается с рибосомами. Следовательно, у млекопитающих дополнительного полиаденилирования после оплодотворения не происходит. В ооцитах шелкового мотылька (сатурния, павлиноглазка) полиА-содержащие мРНК составляют 0,2—0,3% всех РНК (Paglia et al., 1976a).

Образование рибонуклеопротеидных комплексов

Образование РНП-комплексов в оогенезе представляет особый интерес в связи с тем, что с ними связывают способность различных РНК храниться в течение многих месяцев. Различные формы РНП были найдены в ядрах соматических клеток (Георгиев, 1975), в цитоплазме эмбриональных клеток (Spirin, 1966), а затем определенные формы РНП найдены в ооцитах амфибий. При исследовании в сахарозном градиенте гомогената молодых ооцитов были обнаружены частицы, седиментирующие с константами 58S и 42S. На более поздних стадиях оогенеза эти частицы исчезают. Их исследование показало, что в состав частиц 42S входят два вида РНК — 4S и 5S с соотношением компонентов в молярном отношении 3:1 (Ford, 1971; Denis, Mairy, 1972) (рис. 13). Частицы 42S содержат 90% всей тРНК и около 50% всех 5S рРНК, что составляет половину всей РНК и определенную часть белка ооцита. Нельзя установить, входят ли оба вида РНК в одни и те же частицы или существует два вида РНП-частиц с одинаковой константой седиментации. Соотношение РНК и белка в этих частицах равно 1:2,7. Можно приблизительно подсчитать, что каждая такая частица должна содержать около 40 молекул тРНК или около 30 молекул 5S рРНК. Сравнение рибосомальных белков и белков 42S частиц показало, что 42S частицы образованы тремя видами белков, отличающимися от белков рибосом. Очевидно, что это особый вид РНП с собственными специфическими белками (Delaunay et al., 1972). Подобные же 42S РНП-частицы были обнаружены и в оогенезе рыб (Mazabraud et al., 1975).

Назначение 42S РНП-частиц как будто бы не вызывает сомнения, — это сохранение низкополимерных РНК до момента их использования, т. е. образование готовых рибосом в оогенезе. Нет ясности в отношении 58S частиц. Они в основном состоят из высокополимерной РНК. В сахарозном градиенте РНК из 58S РНП образует два пика, очень похожих на рибосомные, с той, однако, четкой разницей, что если рРНК образуют пики 28S и 18S, то РНК из частиц 58S образует пики 28S и 19S, причем масса 19S РНК в 1,5—2 раза больше, чем масса 28S (в рибосомах соотношение обратное). Дени предполагает, что 28S РНК является результатом загрязнения частиц 58S рибосомами и что в чистом виде они образованы только белком и 19S РНК. Ее пуклео-

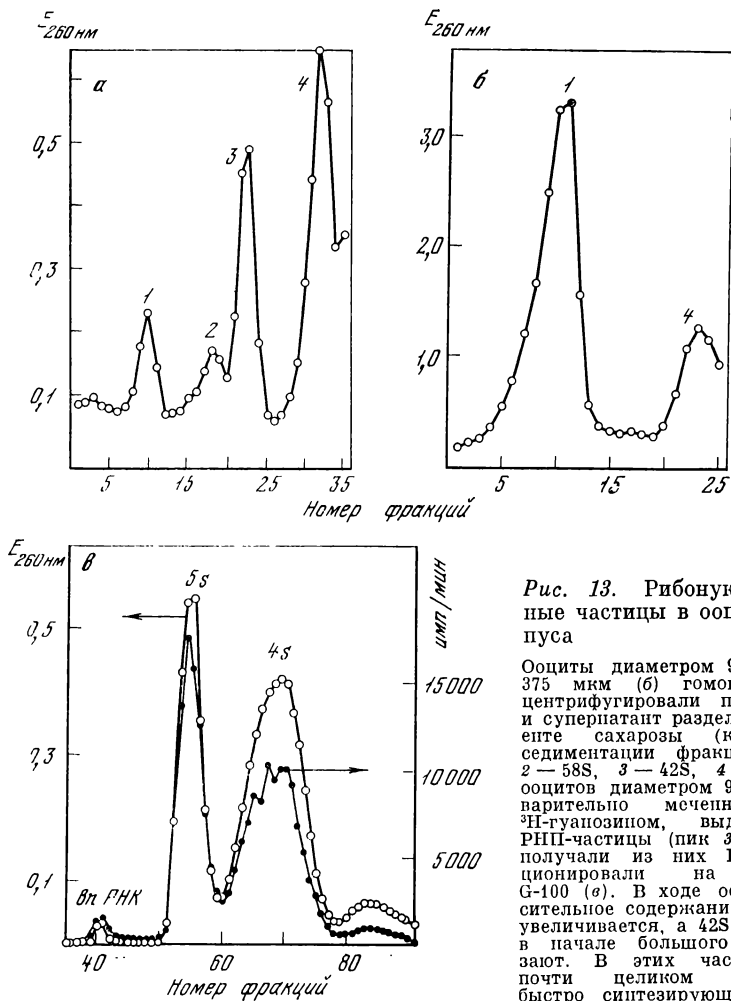


Рис. 13. Рибонуклеопротеидные частицы в ооцитах ксенопуса

Ооциты диаметром 90 мкм (а) и 375 мкм (б) гомогенизировали, центрифугировали при 10 000 г и супернатант разделяли в градиенте сахарозы (коэффициенты седиментации фракций: 1—87S, 2—58S, 3—42S, 4—4—5S). Из ооцитов диаметром 90 мкм, предварительно меченных 8 час. ^3H -гуанозиним, выделяли 42S РНК-частицы (пик 3 на рис. а), получали из них РНК и фракционировали на сефадексе G-100 (в). В ходе оогенеза относительное содержание рибосом (1) увеличивается, а 42S частицы (3) в начале большого роста исчезают. В этих частицах РНК почти целиком представлена быстро синтезирующимися 4S и 5S РНК (в) (Denis, Mairy, 1972)

тидный состав ниже 60% Г+Ц, и, следовательно, это не рРНК или продукт ее деградации. Частицы 58S включают около одной десятой РНК и белка ооцита, и весовое отношение РНК : белок у них равно 1 : 4, как и в информосомах. Нетрудно подсчитать, что в состав 58S РНК-частиц может входить одна или максимум две молекулы 19S РНК. О роли этой РНК и этих частиц пока ничего не известно.

Общее для обеих частиц (42S и 58S) то, что они распадаются к тому времени, когда в ооците образуются рибосомы. Тома, по-видимому, наблюдал 42S и 58S частицы в электроонный микро-

скоп, так как в ранних ооцитах автор описывает фибриллярные частицы, которые на более поздних стадиях исчезают и заменяются рибосомами (Thomas, 1967, 1969, 1970). Рибосомные субъединицы на тех стадиях оогенеза, когда происходит интенсивный синтез рРНК, образуются прямо в ядрышках. Иными словами, формой хранения рРНК в оогенезе являются сами рибосомы.

Сейчас нет надежных данных о существовании в ооцитах РНП-частиц, содержащих мРНК. Однако в ядрах ооцитов амфибий были обнаружены РНП-частицы, седиментирующие при 50—55S (Rogers, 1968). Гесс и вслед за ним Давидсон считают, что местом хранения могут быть сами петли ламповых щеток (Hess, 1966; Давидсон, 1972). В пользу подобных представлений говорит необычно большое количество РНК и белка в петлях хромосом типа ламповых щеток. Если в хроматине обычной клетки печени, по данным Изавы, отношение ДНК : РНК : белок равно 1 : 0,06 : 2,8, то для хроматина зародышевого пузырька тритона это отношение равно 1 : 9 : 500 (Izawa et al., 1963b). Интересно, что в ооците более чем в 100 раз увеличивается содержание РНК и белка на единицу ДНК, но не меняется отношение РНК : белок (1 : 47 в печени и 1 : 50 в ооцитах). Отношение РНК : ДНК оказывается еще больше, если брать не хроматин целиком, а только петли ламповых щеток — в них РНК в 780 раз больше, чем ДНК (Давидсон, 1972). В хроматине ооцитов *Triturus* содержится 0,007 мкг РНК (Izawa et al., 1963b) с ДНК-подобным нуклеотидным составом, в то время как все яйцо содержит 4 мкг РНК, из которой не более 1% является Д-РНК. Иными словами, значительная часть (около 20%) Д-РНК содержится в петлях ламповых щеток зародышевого пузырька и связана там с белком. Саммервилем описаны специальные РНП-частицы в хромосомах типа ламповых щеток, содержащие белок и около 3% Д-РНК. Вероятно, эти частицы и соответствуют предполагаемым формам хранения мРНК в период вителлогенеза (Sommerville, 1973). Было показано, что в зародышевом пузырьке ооцита амфибий содержится в 3000 раз больше РНК, чем в ядре печени (Finamore et al., 1960).

В конце четвертой стадии оогенеза, когда петли хромосом вытягиваются, частицы, содержащие Д-РНК, остаются, по-видимому, в зародышевом пузырьке и выходят оттуда при его разрыве во время созревания.

В ооцитах шелкового мотылька было показано, что полиА-содержащая мРНК почти не обнаруживается в полисомах, т. е. не транслируется (Paglia et al., 1976a, б), а находится в РНП-комплексах с плотностью 1,42—1,48, что соответствует отношению РНК/белок = 1 : 3—4. В электронном микроскопе эти частицы имеют диаметр 180—250 Å.

РНП-комплексы, вероятно, являются не только формой хранения, но и способом регуляции функционирования данного типа РНК. Во всяком случае, эти комплексы оказываются достаточно прочными, чтобы не изменяться в течение многих месяцев, по

потом они способны распадаться в течение часов или минут, как это, вероятно, происходит при оплодотворении у морского ежа. Их существование в самом оогенезе, как это видно на примере частиц 42S, может зависеть от других процессов, например от образования рибосом. Можно предполагать, что распад РНП-частиц для мРНК имеет некоторую специфичность, т. е. на одних стадиях раннего развития освобождаются одни мРНК, а на других стадиях — другие.

Синтез РНК в оогенезе служит двум целям — обеспечению синтеза белка в самом оогенезе и созданию белоксинтезирующей системы (БСС) для синтеза белка в эмбриогенезе. Однако значительная часть белков, синтезированных также в ооците, прямо или косвенно, служит созданию БСС (белки РНП-комплексов, рибосомные белки и т. д.). БСС не создается равномерно в ходе оогенеза, т. е. путем пропорционального синтеза всех видов РНК. Там, где этот процесс изучен лучше, например у амфибий, а также у рыб, установлен сложный временной план синтеза различных видов РНК. Синтезу РНК подчинены сложные преобразования ядрышковой ДНК, структура ламповых щеток, — также протекающие по определенной временной программе.

На ранних стадиях оогенеза, когда рДНК уже амплифицированы, но ядрышковые ДНК еще не развернулись в кольца, а петли ламповых щеток также не образовались, происходит преимущественный синтез низкополимерных 4S и 5S РНК, которые в это время еще не могут быть использованы и консервируются в виде 42S частиц. Судя по тому, что в одну частицу входят десятки одинаковых молекул РНК, 42S частицы являются не функционирующими образованиями, а служат только для хранения. Хотя в раннем оогенезе определенно имеется синтез рРНК и, вероятно, мРНК, основную массу — 75% всей РНК — составляют низкомолекулярные виды. В течение этого прерителогенетического этапа оогенеза синтезируется свыше трети всей тРНК яйца и почти половина всей 5S рРНК. На следующем этапе оогенеза в период быстрого роста кольцевая рДНК в ядрышках приобретает развернутую структуру, связанную с наибольшей активностью, и в них начинается интенсивный синтез рРНК. Скорость этого синтеза во много раз превосходит скорость синтеза на таких специализированных структурах, как петли ламповых щеток. В это время синтезируется основная масса рРНК, которая до этой стадии составляла менее одной десятой всей массы рРНК зрелого ооцита. Синтез тРНК и 5S РНК также продолжается, по-видимому, с не меньшей, чем ранее, скоростью. В оставшееся время должно накопиться вдвое большее количество тРНК и такое же, как и раньше, количество 5S рРНК.

5S рРНК по мере синтеза, а также 5S рРНК, освобождающаяся из 42S частиц, включается в состав новообразующихся рибосом, формирующихся, очевидно, сразу после синтеза 28S и 18S рРНК. Интенсивный синтез 5S РНК в оогенезе обеспечен специальным набором повторяющихся генов для 5S РНК, отличающихся от генов, функционирующих в эмбриональных и соматических клетках. В сборке рибосом должно принимать участие и значительное количество рибосомальных белков. Эти белки, очевидно, синтезируются в то же время (Hallberg, 1974).

Наибольшего развития достигают к середине оогенеза и петли ламповых щеток, и на них происходит интенсивный синтез мРНК, которые, по-видимому, образуют РНП, оставаясь здесь же на петлях ламповых щеток. Часть мРНК безусловно расходуется в ходе самого оогенеза. По расчетам, основанным на данных о повторяющихся последовательностях, в оогенезе функционирует третья часть матриц, созданных на стадии ламповых щеток, а две третьих остаются в яйце и используются в ходе эмбрионального развития.

По мере завершения роста ооцита интенсивность синтеза РНК в нем уменьшается, хотя синтез РНК не прекращается совсем. В таком состоянии большой ооцит может находиться довольно долго (у зимующих лягушек — всю зиму), до тех пор, пока гормоны гипофиза не стимулируют начало созревания. У амфибий гонадотропные гормоны действуют на фолликулярные клетки, а те уже синтезируют прогестероноподобный гормон, непосредственно влияющий на яйцо. В зрелом ооците прогестерон прежде всего вызывает активацию генома и временную активацию синтеза РНК. Природа этой РНК до конца не определена, но очевидно, что она содержит и Д-РНК.

Небольшую часть общего синтеза РНК во время оогенеза (около 2%) составляет синтез митохондриальной РНК. Однако после прекращения синтеза РНК в ядре ооцита синтез митохондриальной РНК продолжается и составляет в зрелых ооцитах заметную долю. Поэтому часть РНК, синтезируемой в ооците во время созревания, должна быть отнесена за счет митохондриального синтеза. За час в митохондриях ооцита ксенопуса синтезируется 20—45 пг РНК, из которой рРНК составляет 6—13 пг (Webb et al., 1975).

Кратковременный синтез РНК во время созревания прекращается, зародышевый пузырек разрывается и его содержимое смешивается с цитоплазмой. Может быть, только на этой стадии оогенеза запасенные мРНК попадают в цитоплазму. Мы не знаем точно, равномерно ли они распределяются по яйцу и попадает ли в будущие бластомеры одинаковое количество одних и тех же видов мРНК. Однако некоторые данные делают предположение о равномерном распределении более вероятным. Так, у амфибий глобиновая мРНК кролика, инъецируемая в яйцо, транслируется затем равномерно во всех частях зародыша, т. е. распределяется

по яйцу также равномерно (Woodland et al., 1974; Gurdon, 1975a, b). На яйцах морского ежа было показано, что состав мРНК в микромерах и во фракции суммы макро- и мезомеров одинаков до стадии 16 клеток, т. е. распределен по яйцу равномерно (Mizuno et al., 1974; Rossi et al., 1975).

Так подробно процесс оогенеза исследован только у амфибий, и маловероятно, чтобы у всех видов повторялась подобная схема. Она может быть иной у тех видов, у которых синтез РНК происходит в питающих полиплоидных клетках. Она явно иная у млекопитающих и у тех видов, где яйцо очень мало и почти не содержит запаса РНК. Однако отрывочные данные, имеющиеся для иглокожих, червей и моллюсков, показывают, что и у них в оогенезе существуют периоды более и менее интенсивного синтеза и в итоге образуется яйцо, имеющее свои БСС.

РНК В ЭМБРИОНАЛЬНОМ РАЗВИТИИ

Начало ядерного синтеза РНК

Синтез РНК может быть определен биохимически и автордиографически. Применительно к самым ранним стадиям развития у автордиографического метода есть важное преимущество, состоящее в том, что он позволяет отличить ядерный синтез от цитоплазматического. На ранних стадиях, когда суммарный синтез в зародыше очень мал, но и количество ядер также очень невелико, даже слабый ядерный синтез РНК должен был бы проявляться автордиографически, так как вся активность сосредоточена в немногих ядрах. Наоборот, если окажется, что количество зерен серебра над ядрами не превышает фон, это является гарантией того, что включение радиоактивной метки в зародыш не отражает синтез высокополимерной РНК в ядрах. В этих случаях, однако, может быть не обнаружен очень слабый синтез или синтез низкомолекулярных РНК, которые могли бы вымываться при стандартных процедурах гистологической обработки. Биохимическое определение очень слабого синтеза РНК на ранних стадиях развития требует использования целого ряда приемов для того, чтобы убедительно доказать ядерное (или митохондриальное) происхождение образуемой РНК, отсутствие бактериального загрязнения и т. д.

Скорость синтеза РНК обычно выражают в единицах удельной активности, т. е. в имп/мин на единицу количества РНК. Так как исследуется синтез новой, чаще Д-РНК, а относят ее при расчетах к количеству рибосомной РНК, ранее запасенной в яйце, никакого биохимического смысла эта величина не имеет. Но так как количество РНК в зародыше многих видов животных в ходе раннего развития практически не меняется, то эта величина экви-

валентна включению предшественника в РНК в расчете на зародыш.

Включение метки в РНК зародыша, отнесенное к количеству ДНК (желательно ядерной) или к количеству клеток на каждой стадии, дает представление о скорости синтеза РНК в расчете на ядро. Казалось бы, что эта вторая величина более прямо указывает на изменение интенсивности синтеза в ходе развития. Действительно, если исследователя интересует активность генома, то величина синтеза РНК в расчете на ядро наиболее точно отражает этот процесс. Однако если речь идет о том, в какой мере ядра обеспечивают зародыш новыми матрицами, то правильнее относить включение предшественника в РНК ко всему зародышу или, что одно и то же, к единице массы цитоплазмы (на 1 мг белка или на 1 мг тотальной РНК).

Браун и Литтл вводили меченый ортофосфат лягушке перед началом овуляции и исследовали РНК на различных стадиях развития. Относительно синтеза РНК во время дробления данные этих авторов довольно неопределенны. Однако предполагается, что небольшой синтез на стадиях дробления имеется. На приведенных авторами графиках этот «ранний» синтез не показан, и четкое включение в РНК они обнаружили только со стадии 9 (поздняя бластула) (8 час. при 22°). В последующие часы включение в РНК резко возрастает вплоть до стадии ранней гаструлы (стадии 10—11), после чего медленно снижается. Аналогичное увеличение синтеза со стадии поздней бластулы — гаструлы обнаруживали и другие авторы (Decroly et al., 1964).

После этих стадий начинается также постепенное увеличение количества РНК в зародыше амфибий, которое удваивается только к стадии питающегося головастика (Bristow, Deuchar, 1964).

На зародышах ксенопуса (Bachvarova et al., 1966) синтез РНК исследовали автораддиографически и биохимически, и его активация была обнаружена начиная со стадии 8—8,5. На стадии 7 (ранняя бластула) включение в РНК показать не удалось. Однако другими авторами биохимически небольшое включение в РНК на этой стадии было обнаружено (Woodland, Gurdon, 1969). Это включение составляет около $1/10$ от включения на стадии 9. Вместе с тем, так как количество клеток на стадии 7 намного меньше, чем на стадии 9, над ядрами должны были быть обнаружены зерна серебра. Поскольку автораддиографически этот синтез в ядрах ранней бластулы (стадия 7) не обнаруживается, остается полагать, что ядерный синтез РНК до стадии 8—8,5 незначителен. На зародышах аксолотля были получены аналогичные данные (Стрелков, Игнатьева, 1976).

Активация синтеза РНК, по данным Бачваровой и др., происходит в разных частях зародыша не одновременно. Раньше всех (на стадии 8,5) она отмечена в экваториальной зоне и в зачатке энтодермы, позже (на стадии 9) — в зачатке эктодермы. Наибольших величин эта активность достигает на стадии 10 в зачатке

прехордальной мезодермы и в энтодерме, меньше всего — в эктодерме (Bachvarova et al., 1966).

Сравнение интенсивности синтеза РНК в дорзальной и вентральной частях эктодермы гастролы не позволило обнаружить различий между ними (в расчете на ДНК) (Flickinger, 1972).

Итак, приведенные данные показывают, что у безхвостых амфибий, возможно, существует очень слабый ядерный синтез на стадиях дробления, но его наличие не может считаться доказанным. Начало синтеза РНК следует отнести к стадии 8,5, т. е. средней — поздней бластулы. Эта стадия довольно хорошо совпадает с началом морфогенетической функции ядер, определенной по их радиационной инактивации (Нейфах, 1960а, 1961б).

У зародыша выюпа синтез РНК исследовали биохимически (Айтхожин и др., 1964; Кафиани, Тимофеева, 1964; Тимофеева и др., 1967; Kafiani et al., 1969) и автордиографически (Костомарова, Коробцова, 1970). Если в качестве предшественника применяли меченые нуклеозиды, то использовали изолированные бластодермы, которые инкубировали в солевой среде. Неспецифический предшественник $^{14}\text{CO}_2$ свободно проникает в целые икринки, но его использование неприемлемо для автордиографии, а в биохимических исследованиях требуется более тщательная очистка РНК от меченых высокомолекулярных примесей (белок, ДНК, полисахариды).

Опыты показали, что небольшой синтез РНК обнаруживается даже на самых ранних стадиях развития (рис. 14). Однако вплоть до 6 час. (средняя бластула) он увеличивается очень незначительно (хотя количество ядер за это время достигает 1000). В расчете на одну клетку активность включения метки в РНК в ходе делений дробления уменьшается, достигая минимума на стадии 6 час. Это снижение объясняется тем, что на этих стадиях небольшие величины включения метки в РНК делятся на быстро возрастающее число клеток. Подобный расчет дает основание предполагать отсутствие ядерного синтеза РНК в ходе делений дробления. Тем не менее в биохимических исследованиях раннее включение предшественников в РНК подавляется актиномицином, но малочувствительно к действию бромистого этидия, что свидетельствует о ядерной локализации синтеза РНК (Тимофеева и др., 1977). Активация синтеза высокомолекулярных РНК начинается на стадии 6 час. Автордиографические исследования показали, что при инкубации изолированных бластодерм с ^3H -уридином зерна серебра над ядрами в количестве, превышающем фон, появляются только на 6—6,5 час. (Костомарова, Коробцова, 1970). В этих исследованиях не применялось, однако, специальных предосторожностей, гарантирующих сохранение таких низкомолекулярных РНК, как тРНК и другие, и их ранний синтез может быть автордиографически и не учтен.

Стадия, на которой происходит активация ядерного синтеза у выюпа (6 час. развития), хорошо совпадает с началом морфо-

Рис. 14. Составляющие суммарной активности синтеза РНК в раннем развитии вьюна

Суммарная активность синтеза РНК (1) определяется числом клеток (2), долей синтезирующих клеток (3) и интенсивностью синтеза в каждой клетке (4) (Neufakh, 1971)

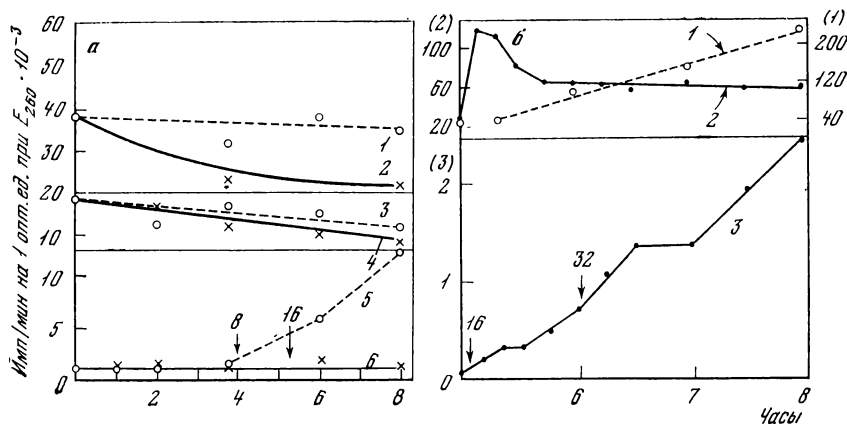
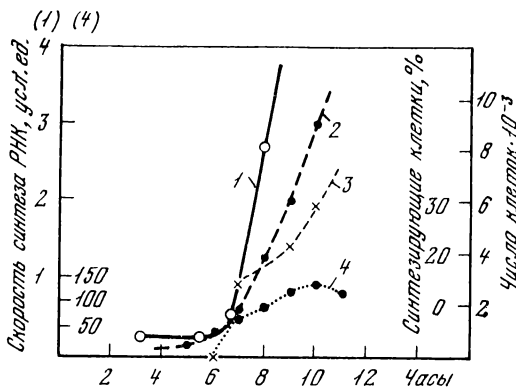


Рис. 15. Синтез РНК в раннем развитии морского ежа

Яйца *Strongylocentrotus purpuratus* (а) и зародыши через 5 час. после оплодотворения (б) инкубировали с ^3H -гуанозинем и через разное время в них определяли радиоактивность кислоторастворимой фракции, ГТФ и включение метки в ГМФ РНК. а: радиоактивность ГТФ (1, 2); кислоторастворимой фракции (3, 4); РНК (5, 6) оплодотворенных (1, 3, 5) яиц и неоплодотворенных (2, 4, 6); б: 1 — радиоактивность ГТФ; 2 — кислоторастворимой фракции; 3 — РНК (Wilt, 1970).

генетической функции ядер, определенной по способности «безъядерных» зародышей к развитию (Нейфах, 1959).

Как и у амфибий, синтез РНК в ядрах бластодермы вьюна начинается не одновременно во всех клетках. Раньше всего он начинается в базальном слое клеток и затем медленно распространяется в направлении от желтка к анимальному полюсу бластодермы (Костомарова, Ротт, 1970). Могло возникнуть предположение, что преимущественный синтез в базальных клетках связан с тем, что в изолированных бластодермах предшественник посту-

пает неравномерно, только со стороны базального слоя. Однако при разрезании бластодермы на две половины преимущественный синтез в базальной части сохраняется.

Подтверждение этому было получено на диссоциированных клетках бластодермы вьюна. Активация синтеза РНК начинается в них тогда же, когда и в целой бластодерме. Авторадиографически было показано, что РНК синтезируется не во всех диссоциированных клетках и что доля синтезирующих клеток по мере развития возрастает (Костомарова, Коробцова, 1970). Общая схема изменений всех составляющих скорости синтеза РНК представлена на рис. 14 (Neufakh, 1971).

Из костистых рыб начало синтеза РНК было исследовано также у зародышей форели — рыб с большим количеством желтка, чем у вьюна. Синтез РНК, исследуемый биохимически и авторадиографически начинается на стадии бластулы (17 τ₀), до начала морфогенетической функции ядер, определенной путем их радиационной инактивации (Донцова и др., 1970; Мельникова и др., 1972). Основную долю этого синтеза составляет рибосомальная РНК.

Вероятно, наиболее тщательно синтез РНК исследовали в развитии морского ежа. Глишин (Glišin, Glišin, 1964) нашел, что во время первых делений дробления происходит только концевой обмен тРНК, в то время как истинный синтез РНК начинается только со стадии 32 бластомеров. Аналогичные данные были получены и в других ранних работах (Comb et al., 1965). Однако Немер (Nemer, 1963, 1967), Слейтер и Спигелман (Slater, Spiegelman, 1970) нашли синтез РНК на стадии 4 бластомеров, Кидес и Гросс (Kedes, Gross, 1969) — на стадии 2 бластомеров и, наконец, Уилт (Wilt, 1964), Ринальди и Монрой (Rinaldi, Monroy, 1969) и другие (Siekevitz et al., 1966) — до первого деления. Ранний синтез РНК обнаруживается и в изолированных ядрах (Løvtrup — Rein, 1972).

Однако Чемберлен (Chamberlain, 1970) обнаружил, что синтез РНК происходит и в безъядерных фрагментах яиц. По своим гибридационным свойствам РНК ранних стадий оказалась комплементарной к митохондриальной, но не к ядерной ДНК (Craig, 1970). На более поздних стадиях, когда ядерный синтез РНК уже определенно происходит, доля митохондриального синтеза РНК все еще составляет значительную часть общего синтеза (Hartman, Comb, 1969). Позже Уилт (Wilt, 1970) повторил свою работу на более высоком методическом уровне, с учетом удельной радиоактивности непосредственного предшественника (ГТФ), и показал, что скорость ее включения в ГМФ РНК остается очень низкой до стадии 8 бластомеров и начинает возрастать со стадии 16 бластомеров (рис. 15). Наши данные показывают, что значительное усиление синтеза РНК в зародыше морского ежа происходит в начале пятого деления (32—64 бластомеров) (Тимофеева и др., 1968). Это лишь немногим раньше начала морфогенетической

функции ядер, определенной с помощью актиномициновой или радиационной инактивации.

Можно, очевидно, заключить, что у морского ежа слабый ядерный синтез действительно начинается очень рано, но существенная активация синтеза (в том числе и в расчете на ядро) происходит со стадии 16—32 бластомеров. Эти стадии могут несколько различаться у разных видов морских ежей. Одновременно с ядерным синтезом РНК происходит и в цитоплазме (в митохондриях) (Hartman, Comb, 1969; Selvig et al., 1970, 1972; Hartman et al., 1971; Craig, Piatigorsky, 1971; Chamberlain, Metz, 1972). Недавно в лаборатории Уилта был использован новый прием определения скорости ядерного синтеза РНК. Бластулы морского ежа инкубировали в присутствии больших концентраций смеси нуклеозидов, меченных тяжелыми стабильными изотопами ^{13}C и ^{15}N . Это позволило в градиенте отделить синтезированные вновь более тяжелые РНК от присутствующих ранее. Определение пула предшественников и точного количества синтезируемых РНК позволило авторам вычислить скорость синтеза — $9,3 \cdot 10^{-15}$ М нуклеотидов на эмбрион за 1 мин. (Grainger, Wilt, 1976).

У насекомых синтез РНК начинается, по-видимому, относительно поздно — после завершения деления ядер в центральной цитоплазме и их выхода в поверхностный слой цитоплазмы, образующий затем бластодерму (Lockshin, 1966). Недавно это было достоверно показано на яйцах дрозофилы (Zalokar, 1976). У клопов *Oncopeltus* (Harris, Forrest, 1967) начало синтеза РНК обнаруживается перед гастрюляцией. Интенсивность синтеза быстро повышается, а затем также резко падает.

Из яиц с мозаичным типом развития лучше других исследованы яйца моллюска *Puanassa*. Синтез РНК у этого вида начинается, очевидно, еще во время дробления (Davidson et al., 1965; Collier, 1975), хотя в ранней работе Коллье (Collier, 1966) он обнаруживался много позже.

У другого моллюска, прудовика *Limnaea stagnalis*, по автордиографическим данным (Van den Biggelaar, 1971) синтез РНК отсутствует до 8 бластомеров. На стадиях 8—12 бластомеров синтез начинается во всех ядрах, но с разной интенсивностью. Немного позже, на стадии 12—16 бластомеров, синтез усиливается в два-три раза, особенно в производных тех бластомеров, где он был слабее других. Позже (16—24 бластомеров) синтез еще несколько усиливается и практически уравнивается во всех ядрах. Ранний синтез РНК у прудовика показан и биохимически (Bramachary et al., 1971; Bramachary, 1974). Начало синтеза РНК у прудовика совпадает с началом морфогенетической функции ядер (Нейфах, 1976) или несколько опережает его. У других моллюсков синтез новой РНК обнаруживается уже на самых ранних стадиях (Firtel, Monroy, 1970; McLean, Whitely, 1974), но и при подавлении этого синтеза актиномицином раннее развитие проходит у них нормально.

Наиболее рано РНК синтезируется в яйцах аскариды. Достоверный синтез обнаружен у них еще в пронуклеусах, до их слияния. Характерно, что на этих стадиях преобладает синтез рРНК, который лишь на последующих стадиях сменяется преобладанием синтеза Д-РНК (Kaulenas, Fairbairn, 1966, 1968; Kaulenas et al., 1969). Очевидно, этот синтез (до мейоза) правильное отнеси не к началу эмбриогенеза, а к концу оогенеза, что, впрочем, имеет чисто формальное значение. У других червей, однако (Urechis), синтез РНК начинается на более поздних стадиях (Das et al., 1965).

У млекопитающих синтез начинается также очень рано — он обнаруживается еще до стадии 2 бластомеров (Woodland, Graham, 1969; Knowland, Graham, 1972; см. обзоры Graham, 1973; Piko, 1975). До стадии 8 бластомеров он возрастает в расчете на ядро по меньшей мере в 10 раз, а затем до стадии бластоцисты (30 клеток) — еще в несколько раз (Mintz, 1964a; Piko, 1970, 1975). В расчете на зародыш (масса его на этих стадиях не увеличивается) это означает, что количество РНК, синтезированной в единицу времени, увеличивается более чем на два порядка. Однако в этих работах обычно не учитывается проницаемость яйца к уридину и активность уридинкиназы, ответственной за его фосфорилирование до УТФ, что не позволяет рассматривать эти цифры как окончательные (Daentl, Epstein, 1971). Тем не менее даже ранняя РНК играет существенную роль в самом раннем развитии, так как обычные дозы актиномина на стадии 2 бластомеров останавливают развитие тут же или на стадии 4 бластомеров.

Подводя итоги раздела, можно, очевидно, сказать, что синтез РНК в яйцах мозаичного типа начинается существенно раньше, чем в яйцах регуляционного типа (исключение составляют яйца млекопитающих), а в крупных яйцах синтез РНК начинается позже, чем в мелких. Во многих случаях синтез РНК в ядрах сначала очень мал и его определение требует специальных усилий. На определенной стадии он резко интенсифицируется, достигает некоторого максимума (в расчете на ядро) и затем медленно снижается, хотя в расчете на зародыш продолжает возрастать. Количественные данные о синтезе РНК в период раннего развития еще недостаточны и имеются лишь для ограниченного числа видов. Вместе с тем даже для изученных видов они иногда противоречат друг другу. Поэтому еще рано делать какие-либо обобщения.

Порядок синтеза различных типов РНК

Хотя для определения типа синтезируемых РНК (Д-РНК, рРНК, тРНК) имеется большой арсенал методов (фракционирование в сахарозном градиенте, на сефадексе G-100, определение нуклеотидного состава после мечения по фосфору), исполь-

зование их применительно к началу развития не всегда дает достоверные результаты. Это связано с низкой активностью самого синтеза и иными, не свойственными соматическим клеткам, соотношениями интенсивности синтеза разных типов РНК.

Для выявления синтеза рРНК и тРНК в качестве предшественника используется метионин, меченный по метильной группе. Известно, что тРНК и про-рРНК в отличие от большинства Д-РНК содержат метилированные нуклеотиды. Поэтому включение метильной метки в РНК является хорошим показателем синтеза рРНК и тРНК.

Примером трудностей, стоящих на пути такого типа исследований, может служить история изучения порядка синтеза различных видов РНК у морского ежа. Казалось твердо установленным, что синтез гетерогенной РНК (Д-РНК, мРНК) начинается на очень ранних стадиях, а начало синтеза рРНК отодвинуто до стадий гастрюлы и призмы (рис. 16) (Nemer, 1963; Giudice, Muto, 1967, 1969; Sconzo et al., 1970; Sconzo, Giudice, 1971a; подробнее см. обзор Giudice, 1973). Однако Эмерсон и Хемфри (Emerson, Humphry, 1970, 1971) показали, что на ранних стадиях на фоне очень интенсивного и в расчете на ядро постепенно замедляющегося синтеза Д-РНК синтез рРНК, происходящий с постоянной скоростью, может оказаться незамеченным. Полученные ими экспериментальные данные как будто бы показывают, что синтез рРНК начинается на очень ранних стадиях, но на фоне интенсивного синтеза Д-РНК его почти невозможно обнаружить. Ранний синтез рРНК наблюдали и в ранних изолированных ядрах (Løvtrup-Rein, 1972).

На более поздних стадиях синтез Д-РНК (на ядро) уменьшается, а синтез рРНК остается на прежнем уровне. Увеличение числа ядер по мере развития приводит к увеличению суммарного синтеза рРНК на зародыш, и это увеличение принимается большинством исследователей за позднее на стадии гастрюлы начало синтеза рРНК. Однако история исследования на этом не кончилась. Сконцо и Гвидиче (Sconzo, Giudice, 1971a) определяли синтез рРНК по их метилированию при добавлении ^3H -метионина на двух стадиях — плавающей бластулы и гастрюлы. По количеству клеток (и ядер) эти стадии различаются всего в два раза. В то же время радиоактивность пиков 26S и 18S оказалась на стадии гастрюлы в 14 раз выше, чем на стадии бластулы. Однако при этом трудно согласиться с произведенными Гвидичи расчетами интенсивности синтеза рРНК по отношению к количеству ДНК (Sconzo et al., 1970; Giudice, 1973). В этих расчетах учитывается тотальная ДНК зародыша, в то время как на ранних стадиях значительная ее часть является митохондриальной и не отражает количества ядер в зародыше. В связи с этим вопрос о начале синтеза рРНК у зародышей морского ежа нельзя считать решенным, хотя очевидно, что синтез реальных количеств рРНК происходит только со стадии гастрюляции.

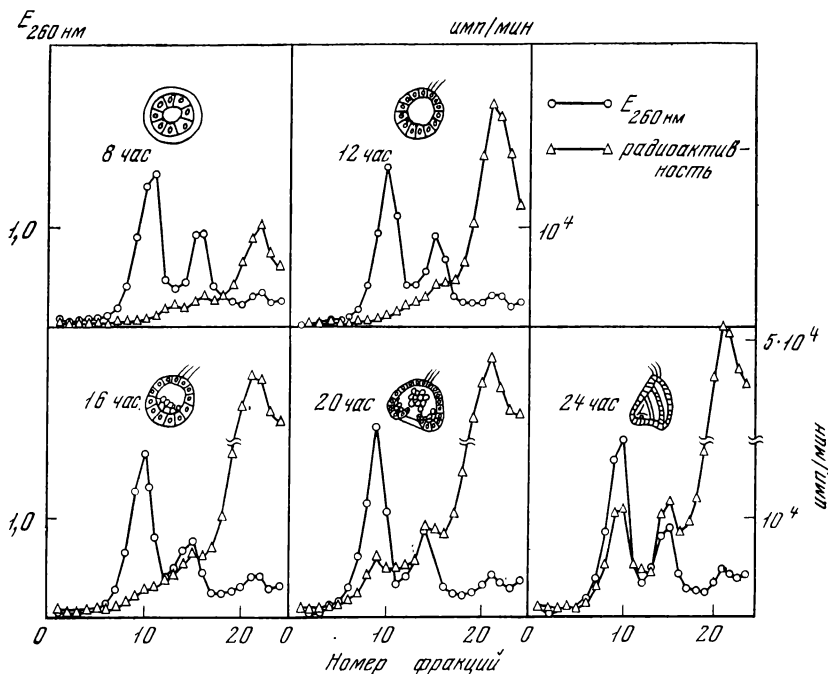
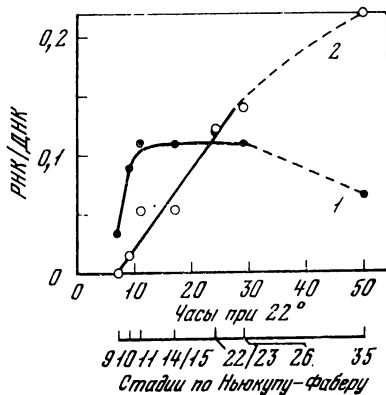


Рис. 16. Синтез рРНК у зародышей морского ежа

Зародышей инкубировали с ^3P -фосфатом и РНК анализировали на сахарозном градиенте. Пики (слева направо) — 26S, 18S и низкомолекулярные РНК. На каждом графике схематично изображены стадии развития — ранняя, плавающая, мезенхимная бластулы, средняя гастрולה и призма. Заметная радиоактивность в пике 26S появляется после стадии 12 час. (плавающая бластула) (Sconzo et al., 1970)

Рис. 17. Начало синтеза Д-РНК и рРНК в раннем развитии ксенопуса

Относительный синтез Д-РНК (1) и рРНК (2) после инкубации с ^{32}P -фосфатом рассчитывали по содержанию Г+Ц оснований (в %) и для оценки интенсивности синтеза выражали в расчете на ДНК. Синтез Д-РНК резко активируется со стадии 9 (поздняя бластула), а рРНК достигает измеримых величин во время гастрюляции (Brown, Litna, 1966)



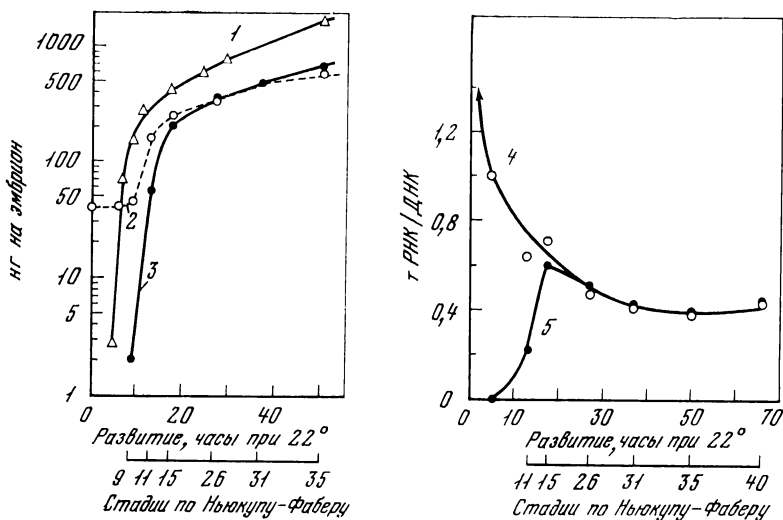


Рис. 18. Содержание и синтез тРНК у зародышей ксенопуса

Самкам вводили ^{32}P -фосфат во время овуляции. У зародышей разных стадий выделяли тРНК, определяли ее общее содержание (2) и по радиоактивности рассчитывали количество вновь синтезированной тРНК (3). 1 — количество ДНК; 4 — отношение общей тРНК к ДНК; 5 — отношение синтезированной тРНК к ДНК. Синтез тРНК начинается на ранней гастрале и к ранней нейруле вся тРНК представлена вновь синтезированными молекулами; позже увеличение количества тРНК и ДНК происходит параллельно и между ними поддерживается постоянное соотношение (Brown, Littna, 1966)

Во время дробления у зародышей морского ежа обнаруживается синтез тРНК и 5S РНК (O'Melia, Vilee, 1972). Однако Глишин и Немер в своих обзорах относят начало синтеза тРНК у морского ежа к более поздним стадиям (Glišin et al., 1972; Nemer, 1967).

Классическим объектом для исследования порядка синтеза различных типов РНК является лягушка (обычно ксенопус). Работами Брауна и Литтна (Brown, Littna, 1964, 1966) было показано, что раньше всего начинается синтез Д-РНК, затем тРНК на стадии поздней бластулы — ранней гастралы и значительно позже, в конце гастралации, — синтез рРНК (рис. 17, 18). На этом объекте синтез про-рРНК (у амфибий он имеет 40S) и его процессинг в эмбриогенезе был исследован с использованием SN^3 -метионина. На стадии 20 (поздняя нейрула) время полураспада про-рРНК составляет 15—20 мин. (Landesman, Gross, 1969). Этим же методом было показано отсутствие синтеза рРНК у ксенопуса до стадии гастралы и наличие синтеза рРНК на постгастралационных стадиях (Landesman, 1972).

Порядок синтеза типов РНК ксенопуса был подробно исследован также Ноулендом (Knowland, 1970), который показал, что синтез тРНК начинается на стадии 9 (поздняя бластула), т. е.

позже, чем синтез Д-РНК (активация на стадии 8—8,5, но очень слабый синтез обнаруживался и на стадии 7). Начало синтеза рРНК происходит на стадии гастрюлы (стадия 12). Активность рРНК составляет на этой стадии всего лишь 8% от общей активности. Доля синтеза рРНК постепенно возрастает и на стадии хвостовой почки достигает уровня синтеза рРНК у головастика.

Иным оказался порядок синтеза РНК у костистых рыб. На вьюне было показано, что на ранних стадиях синтезируется Д-РНК, а синтез рРНК начинается на стадии средней — поздней гастрюлы (Айтхожин и др., 1964; Белицина и др., 1964; Тимофеева, Кафиани, 1965) (рис. 19). Казалось, что у рыб повторяется порядок синтеза, установленный для амфибий. Однако исследование типов РНК, синтезирующихся в бластодерме форели (Мельникова и др., 1972), показало, что активация здесь начинается с синтеза рРНК (на этом фоне, возможно, синтезируется и Д-РНК) (рис. 20).

Необычным оказался и порядок синтеза тРНК (рис. 21). У вьюна синтез тРНК начинается до активации синтеза Д-РНК, уже на стадии ранней бластулы (4,5—5 час. при 21°). Сначала можно обнаружить только предшественники тРНК с константами седиментации от 4,5 до 5 (Соловьева и др., 1973б, 1976), так как на этих стадиях процессинг и образование «зрелых» тРНК (4S) происходит медленно (Соловьева и др., 1973б).

У птиц, где, казалось бы, есть условия для большого запаса рибосом в желтке, синтез рРНК начинается очень рано, во время дробления (Lerner et al., 1963; Raveh et al., 1976).

У клопов *Oncopeltus*, синтез РНК начинается на стадии бластодермы, но сразу синтезируются все типы РНК (Д-РНК, рРНК и тРНК) (Harris, Forrest, 1967). У двустворчатых моллюсков *Mulinia* (Kidder, 1972) синтез Д-РНК начинается во время дробления, синтез тРНК начинается несколько позже — на среднем — позднем дроблении. Синтез рРНК у *Mulinia*, как у амфибий, начинается только во время гастрюляции. У зародышей с мозаичным типом развития (моллюсков, червей и других) гастрюляция происходит при значительно меньшем количестве клеток, чем у зародышей регуляционного типа. У червей *Urechis* синтез всех видов РНК начинается одновременно, но относительные темпы синтеза у них различны. Так, скорость синтеза тРНК в расчете на одно ядро остается постоянной на всем протяжении развития, т. е. в расчете на зародыш увеличивается вместе с ростом числа клеток. Синтез же рРНК в каждом ядре до стадии гастрюлы быстро увеличивается и становится в 13 раз активнее, чем во время дробления (Schwartz, 1970).

У аскариды синтез рРНК (как и Д-РНК) начинается еще в пропуклеусах, т. е., по-видимому, не прерывается в конце оогенеза. Это можно объяснить очень малым запасом всех видов РНК (и в первую очередь рибосом) в яйце аскариды (0,06 пг на яйцо) (Kaulenes et al., 1969).

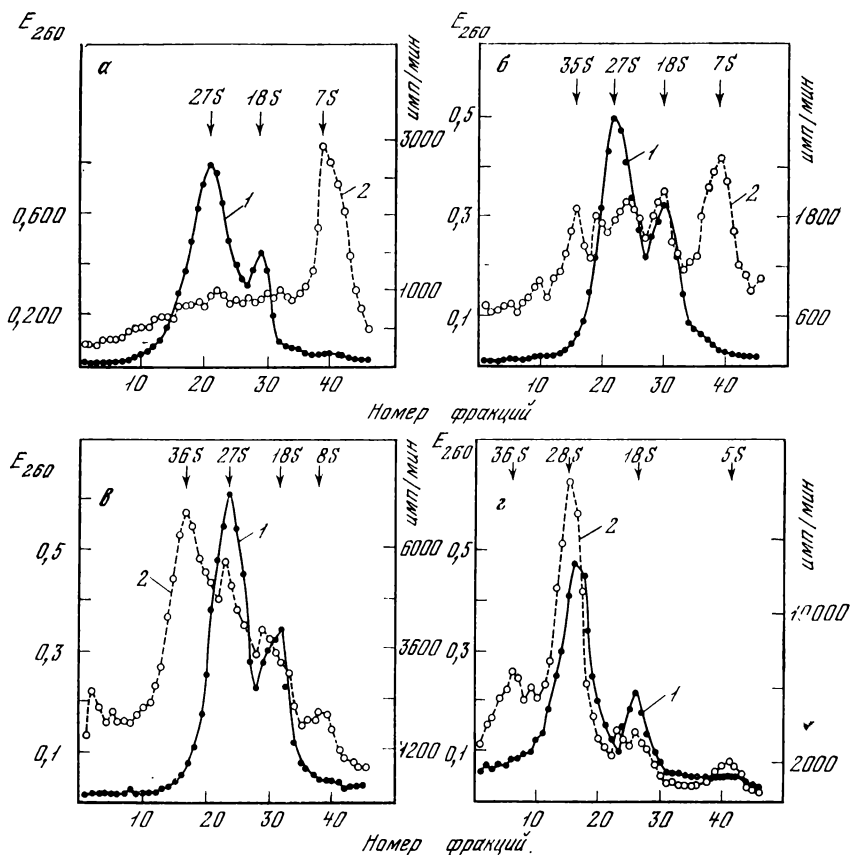


Рис. 19. Синтез различных РНК в раннем развитии вьюна

Зародышей вьюна инкубировали с $\text{Na}_2^{14}\text{CO}$ в течение 2 час. на стадиях поздней бластулы от 8 до 10 час. (а), гаструлы от 11 до 13 час. (б), раннего органогенеза — от 18 до 20 час. (в) и позднего органогенеза — от 31 до 33 час. (г). Соленерастворимую (без 4S и 5S) РНК выделяли и фракционировали в градиенте сахарозы; 1 — количество РНК (E_{260} нм); 2 — радиоактивность. Вверху приведены коэффициенты седиментации. В начале гаструляции синтезируется в основном гетерогенная РНК, позже начинается синтез рРНК и их предшественников, которые преобладают на стадиях органогенеза (Рачкус и др., 1971)

Наконец, у млекопитающих, у которых слабый синтез РНК начинается рано (Mintz, 1964a; Ellem, Gwatkin, 1968), синтез рРНК обнаруживается на стадии 4 и определенно 8 бластомеров (Piko, 1970, 1975; Knowland, Graham, 1972). На этих же стадиях происходит синтез и всех других типов РНК (Ellem, Gwatkin, 1968) у зародышей мышей.

У кролика на ранних стадиях (2—16 бластомер) преобладает синтез низкомолекулярных РНК (тРНК), увеличиваясь за это время в 12 раз, а к стадии 64—128 клеток — еще в 13 раз

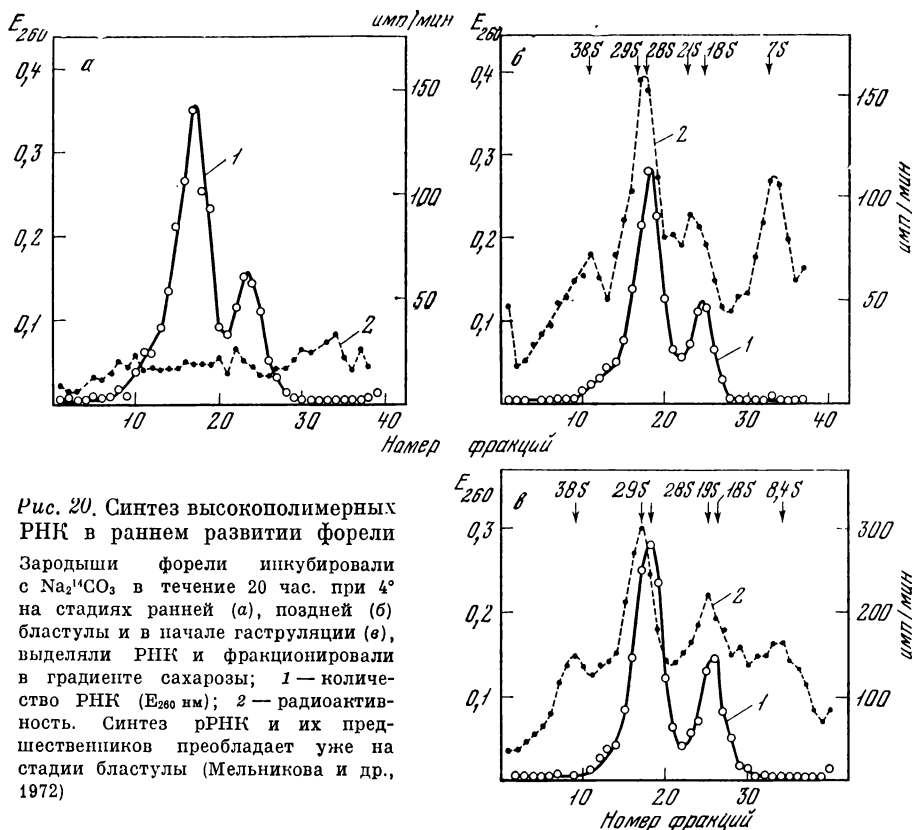


Рис. 20. Синтез высокополимерных РНК в раннем развитии форели. Зародыши форели инкубировали с $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ в течение 20 час. при 4° на стадиях ранней (а), поздней (б) бластулы и в начале гаструляции (в), выделяли РНК и фракционировали в градиенте сахарозы; 1 — количество РНК (E_{260} нм); 2 — радиоактивность. Синтез рРНК и их предшественников преобладает уже на стадии бластулы (Мельникова и др., 1972)

(рис. 22). Синтез рРНК и гетерогенной РНК до стадии 16 бластомеров незначителен, но к 64—128 клеткам активируется в сотни раз (Manes, 1975).

Рассматривая приведенные в этом разделе данные, можно отметить, что чаще синтез начинается с Д-РНК. Однако у рыб, вероятно, не так — у выюна это может быть тРНК, у форели — рРНК. Одновременно с Д-РНК или (у амфибий) немногим позже начинается синтез тРНК. Начало синтеза рРНК у многих видов обычно происходит намного позже, но, по-видимому, это должно быть каждый раз очень тщательно доказано, так как синтез рРНК, слабый относительно других типов РНК, может быть не замечен. В ряде случаев, особенно у животных с мозаичным типом развития и ранним началом синтеза, синтез рРНК осуществляется с самого начала развития.

Причины, определяющие порядок включения синтеза типов РНК у развитых видов, неизвестны. По-видимому, этот порядок определяется соотношением потребностей зародыша и возможностями ядерного аппарата клеток. Потребности зародыша в синтезе

новых рНҚ должны находиться в соответствии с состоянием белоксинтезирующего аппарата, который создается в оогенезе и достается зародышу от материнского организма. Так, например, зародыши амфибий, гомозиготные по пехватке ядрышкового организатора (рДНҚ), не синтезируют рНҚ, не образуют новых рибосом и тем не менее достигают стадии плавающего головастика (Brown, Gurdon, 1964). Это означает, что запас рибосом, созданный в оогенезе, у них достаточен и, естественно, что интенсивный синтез новых рНҚ начинается поздно, в конце гаструляции.

Наоборот, соотношения тРНҚ : рибосомы в зрелом ооците амфибий таково, что может обеспечить использование в синтезе белка только $\frac{1}{10}$ всех рибосом. Это в 10—15 раз меньше, чем необходимо для интенсивного белкового синтеза и того количества тРНҚ, что создается в норме к стадии хвостовой почки. Поэтому кажется естественным, что синтез тРНҚ начинается у амфибий довольно рано, на стадии, почти тотчас вслед за началом синтеза Д-РНҚ. Но, может быть, решающую роль в том, что в оогенезе

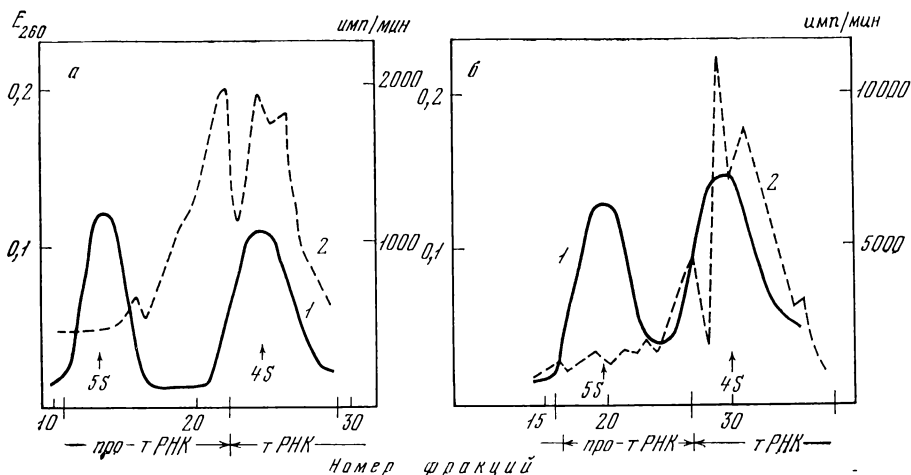
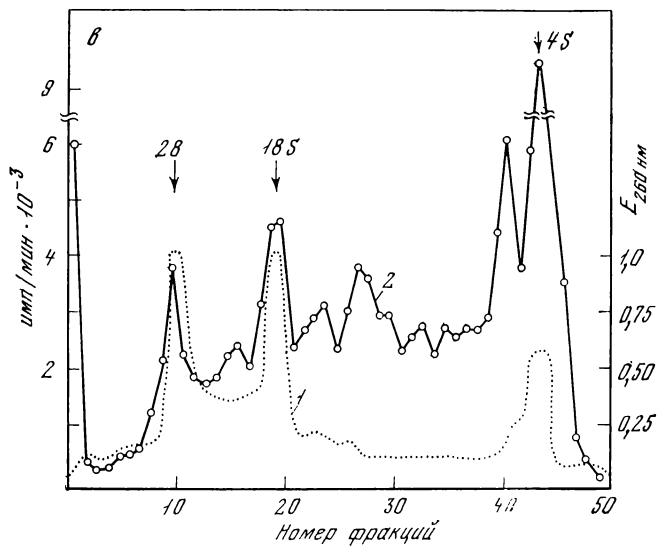
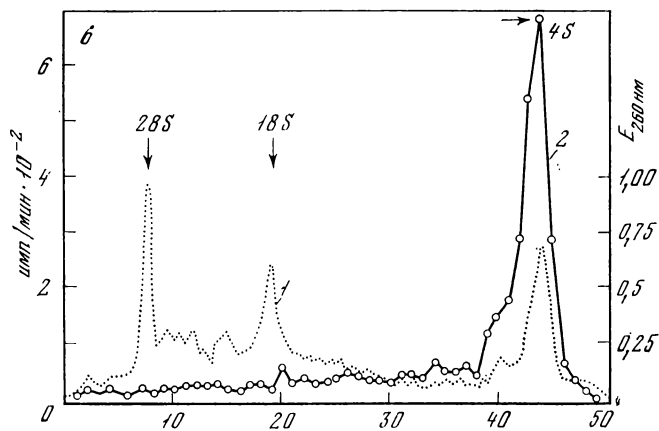
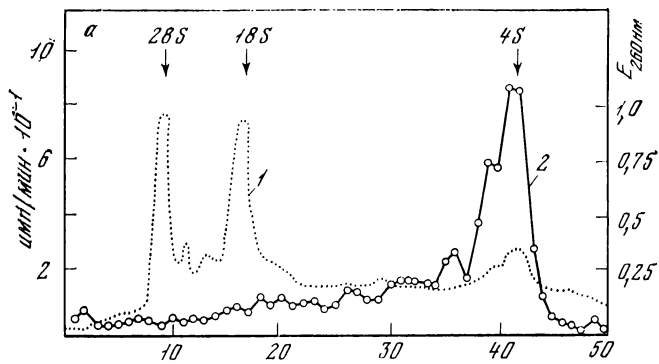


Рис. 21. Синтез и процессинг тРНҚ в раннем развитии мыши

Бластомеры мыши на стадиях 5 час. (а) и 6,5 час. (б) инкубировали один час с ^{14}C -уридином, выделяли солерастворимые (в основном низкомолекулярные) РНҚ и фракционировали на сефадексе G-100. 1 — количество РНҚ (E_{260} нм); 2 — радиоактивность. На стадии 5 час. синтезируется предшественник тРНҚ, его процессинг замедлен, половина меченого продукта в области 4,5—4,3S, а на стадии 6,5 час. меченые РНҚ локализованы в области 4S, т. е. синтез и процессинг происходят быстрее (Timofeeva, Solovjeva, 1973)

Рис. 22. Синтез РНҚ в раннем развитии кролика

Зародышей на стадиях 2 бластомеров (а), 16 клеток (б) и 64—128 клеток (в) инкубировали с ^3H -уридином *in vitro*, выделяли РНҚ и подвергали электрофорезу. 1 — оптическая плотность (E_{260} нм); 2 — радиоактивность. Синтез тРНҚ преобладает на ранних стадиях, синтез рРНҚ и гетерогенной РНҚ активируется и к стадии 64—128 клеток возрастает в сотни раз (Manes, 1975)



создается мало тРНК и их количество возрастает в начале дифференцировки, играет состав синтезируемых тРНК. Возможно, что для синтеза белков в зачатках разных органов необходимы разные наборы тРНК и их синтез происходит в разных клетках неодинаково. Браун и Литтна обращают внимание на обнаруженное ими постоянство соотношений тРНК : ДНК (рис. 18) и придают этой величине регулирующее значение (Brown, Littna, 1966).

В еще большей мере эти соображения относятся к запасам и началу синтеза мРНК. В оогенезе, очевидно, создаются запасы тех мРНК, для которых не требуется специфическое распределение по зачаткам органов. Синтез новых мРНК в зародыше, по-видимому, с самого начала должен быть дифференциальным, т. е. различаться в разных зачатках органов. Понятно, что дифференциальная активация генов в клетках зародыша может наступать только тогда, когда судьба этих клеток уже определена. Дифференциальная активация генов, необходимая для морфогенеза, не обнаруживается, тем не менее на самых ранних стадиях развития яиц морского ежа, где сразу после оплодотворения происходит транскрипция гистоновых мРНК, в равной степени необходимых всем типам клеток. Этот синтез мРНК, однако, слаб и его активация со стадии 16 бластомеров уже происходит неодинаково в разных типах клеток (см. ниже) и, очевидно, обеспечивает последующий морфогенез.

Влияние ядерного аппарата на процессы развития на ранних стадиях невелико, так как объем цитоплазмы вокруг каждого ядра очень велик и концентрация новых РНК оказывается соответственно небольшой. Значительную часть времени в период дробления занимают процессы митоза, которые плохо совместимы с транскрипцией. Однако существуют виды, например, аскариды и млекопитающие, у которых даже первые деления дробления длятся не минуты, а часы и продолжительность интерфазы после каждого митоза очень велика. В этом случае при небольших размерах яиц ранняя функция ядер и даже пронуклеусов способна создать вполне реальные количества вновь синтезированных РНК.

Митохондриальные РНК

Синтез митохондриальной РНК был обнаружен и определялся в эмбриональном развитии морских ежей, амфибий, млекопитающих. В яйцах морского ежа синтез РНК начинается на самых ранних стадиях развития, и в первых биохимических исследованиях основная проблема состояла в том, чтобы различить синтез в ядрах и в митохондриях. Митохондриальный синтез РНК был надежно доказан опытами с разделением яиц морского ежа на ядерную и безъядерную половины (Baltus et al., 1965; Chamberlain, 1970; Craig, 1970). Одновременный ядерный и митохондриальный синтез РНК на ранних стадиях развития был показан и

автордиографически (Selvig et al., 1970, 1972). Путем гибридизации вновь синтезированной РНК с ДНК из ядер и из митохондрий было показано также, что на стадиях бластулы и гастролы транскрипция идет с обоих геномов (Hartmann, Comb, 1969; Hartmann et al., 1971).

Однако количественно сравнить синтез РНК в ядрах и в митохондриях невозможно, так как не определен внутриядерный и внутримитохондриальный пул предшественников. Предполагается, что у морского ежа во время первых делений дробления значительная доля транскрипции осуществляется в митохондриях, а начиная со стадий 8—16 бластомеров — в ядрах (Selvig et al., 1970, 1972) (рис. 23). Судя по характеру седиментации, синтезируемые в митохондриях зародышей морского ежа РНК являются гетерогенными, но содержат также РНК митохондриальных рибосом (Selvig et al., 1972; Chamberlain, Metz, 1972).

Митохондриальные РНК в ооцитах амфибий представлены в основном РНК митохондриальных рибосом и транспортными РНК, отличающимися от соответствующих РНК цитоплазмы (Dawid, 1970, 1972a; Swanson, Dawid, 1970). Синтез РНК в митохондриях во время оогенеза амфибий составляет всего 2% от синтеза РНК в ядрах, но в конце созревания яйца, когда ядерный синтез РНК прекращается, синтез митохондриальной РНК продолжается в прежнем темпе — 21—45 пг/час в расчете на один ооцит и из них 6—13 пг/час — рРНК (Webb et al., 1975). На диссоциированных клетках зародышей ксенопуса было показано, что синтез всех видов РНК в митохондриях начинается на стадии бластулы и постепенно увеличивается (Young, Zimmerman, 1973). По данным Чейза и Давида (Chase, Dawid, 1972), активация синтеза митохондриальных РНК происходит на стадии гастролы. Основную часть синтеза в это время составляет рибосомная РНК митохондрий (рис. 24). Количество рРНК митохондрий в ходе эмбриогенеза ксенопуса удваивается (Chase, Dawid, 1972).

Если подтвердится то, что в конце оогенеза доля рРНК в синтезируемой РНК митохондрий составляет не более 25—30% (Webb et al., 1975), а в эмбриогенезе синтез рРНК — основную часть синтеза, можно будет говорить о дифференциальной активности митохондриальных генов.

У млекопитающих в раннем развитии со стадии 2 бластомеров до стадии бластоцисты в митохондриях происходит ряд морфологических преобразований (увеличение размеров, а затем и числа крист). Между стадиями морулы (3 сут) и бластоцисты (4 сут) у мыши значительно увеличивается число митохондриальных рибосом (Pikó, Chase, 1973). Ингибиторы репликации и транскрипции митохондриальной ДНК, такие как бромистый этидий, подавляют этот процесс. На этих же стадиях происходит синтез митохондриальных РНК, в основном рРНК (16S и 12S) и тРНК (4S) (Pikó, Chase, 1973; Pikó, 1975).

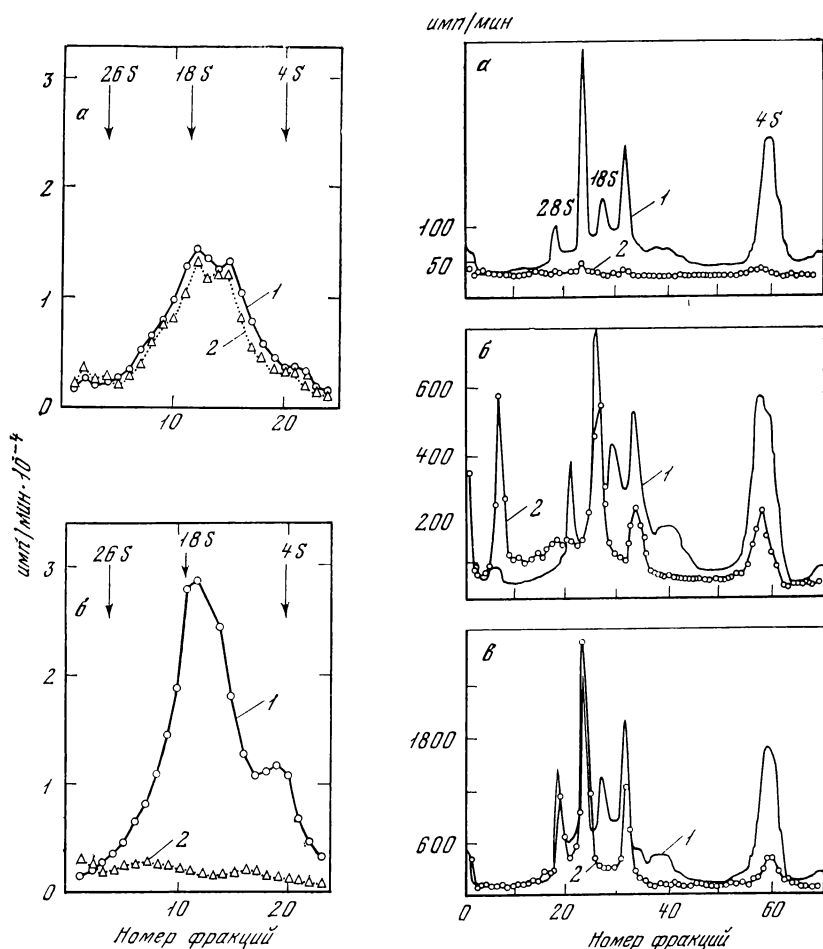


Рис. 23. Синтез митохондриальной РНК у зародышей морского ежа

Зародышей *Lyttechinus pictus* на стадии 8 бластомеров инкубировали с ³H-уридином в присутствии колхицина (10^{-3} M) (а) или бромистого этидия (5 мкг/мл) (б). РНК выделяли из митохондрий и фракционировали на градиенте сахарозы. 1 — контроль; 2 — действие ингибитора. Синтез РНК остается не чувствительным к колхицину (а), который останавливает деление клеток на метафазе и подавляет транскрипцию в ядрах, но подавляется бромистым этидием (б), специфическим ингибитором митохондриальной транскрипции (Selvig et al., 1971)

Рис. 24. Синтез митохондриальной РНК в развитии ксенопуса

Зародышей мегили ¹⁴CO₂ на стадиях 3—8 час. (дробление) (а), 8—12 час. (бластула — гаструла) (б) и 25—27 час. (нейрула) (в), из митохондрий выделяли РНК и анализировали электрофоретически. 1 — количество РНК (E₂₆₀ нм); 2 — радиоактивность. Препарат содержит митохондриальные рРНК (большую, малую), 4S РНК и примесь цитоплазматических рРНК (28S и 18S). Значительный синтез митохондриальных рРНК происходит на стадиях гаструлы и нейрулы и почти отсутствует во время дробления (Chase, Dawid, 1972)

Низкомолекулярные РНК. В последние годы обнаружены различные типы низкомолекулярных РНК, состоящие из 100—300 нуклеотидов и седиментирующие при 4,5—8S. Они отличаются от тРНК (4S) и 5S рРНК. В эту категорию входят 5,5—5,8S РНК клеток HeLa, прикрепляющиеся к 28S в ядрышках (Weinberg, Penman, 1968; Rubin, 1973). Аналогичные РНК, связанные с 28S рРНК и участвующие в процессинге, обнаруживаются в ядрышках других клеток. Показано, что эти РНК кодируются в геноме вместе с 28S и 18S рРНК (Speirs, Birnstiel, 1974; Maden, Robertson, 1974) и их действительные размеры соответствуют 5,8S. Такие же РНК были найдены и в эмбрионах морских ежей (Sy, McCarty, 1970).

Кроме того, в клетках животных обнаруживаются другие сильно метилирующиеся низкомолекулярные РНК, также локализованные в ядре (Larsen et al., 1969, 1970; Enger, Walters, 1970). Эти РНК также транскрибируются с повторяющихся последовательностей (Рачкус и др., 1974; Marzluff et al., 1975).

Низкомолекулярные РНК были обнаружены в неоплодотворенных яйцах морского ежа (Frederiksen, Hellung-Larsen, 1972). Зародыши морского ежа содержат пять фракций низкомолекулярных РНК, различающихся по размерам. Каждая из этих фракций составляет лишь малую долю общего количества РНК зародыша (Frederiksen, Hallung-Larsen, 1972, 1973, 1974). У эмбрионов цыпленка обнаруживается семь фракций этих РНК (Marzluff et al., 1975), в яйцах вьюна их насчитывают четыре Тимофеева и др., 1977).

Синтез низкомолекулярных РНК у морского ежа обнаруживается в начале развития, одновременно с синтезом мРНК и тРНК. На поздних стадиях, когда начинается синтез рРНК, относительная доля синтеза низкомолекулярных РНК уменьшается (Frederiksen, Hellung-Larsen, 1973, 1974). У зародышей вьюна синтез этих РНК описан уже во время дробления (4—5 час при 21°) и продолжается на поздних стадиях (Соловьева, Тимофеева, 1973; Тимофеева и др., 1977).

Функция этих РНК неясна. Связь с хроматином позволяет предполагать их участие в регуляции функции ядер. По своим размерам они, очевидно, не могут кодировать синтез белков, так как даже гистоновые мРНК имеют большие размеры (9S).

Особый вид низкомолекулярных РНК, регулирующих трансляцию (тсРНК), был обнаружен в лаборатории Хейвуда (Bester et al., 1975).

Гигантские РНК в цитоплазме. РНК, седиментирующие с константами выше 28S, обнаруживаются в ядрах и рассматриваются как предшественники рибосомных и информационных РНК (про-рРНК и про-мРНК). Однако в некоторых случаях РНК такого размера находят и в цитоплазме. Так, в цитоплазме клеток слюнных

желез хирономуса обнаруживают 75S РНК, являющуюся полицистронной РНК, транскрибированной на кольцах Бальбиани (Daneholt, 1975). Эта РНК выходит из ядер, не проходя процессинга, хотя и присоединяет к себе после транскрипции полиадениловые последовательности (по-видимому, эта РНК, несущая информацию об основных белках слюны, транслируется целиком) (Daneholt, 1975).

Ниже (стр. 159) описано, что во время митоза вновь синтезированные РНК, еще не прошедшие процессинга, выходят в цитоплазму при растворении ядерной оболочки, а после завершения митоза возвращаются в ядра дочерних клеток (Нейфах, 1970). Их размер превышает 40—60S (Абрамова, Нейфах, 1973).

В зародышах морского ежа обнаружены цитоплазматические гигантские РНК, седиментирующие с константами выше 28S (Giudice, 1973; Giudice et al., 1972b; 1974; Sconzo et al., 1974; Rinaldi et al., 1974). Авторы получили доказательства того, что эти РНК не являются артефактом, т. е. следствием частичного разрушения ядер (рис. 25). Часть этих РНК содержит полиА-последовательности и может быть извлечена из полирибосомных комплексов. Об участии этих РНК в трансляции и о том, какие белки ими кодируются, пока ничего не известно.

ВИДЫ СИНТЕЗИРУЕМОЙ мРНК

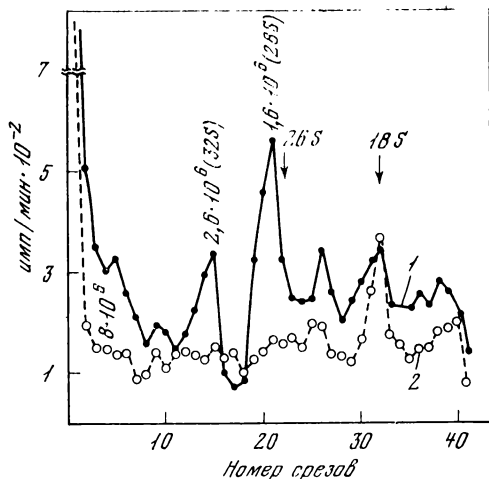
Принципы методов определения видов синтезируемой РНК

Определение стадий, на которых начинается синтез РНК в эмбриональном развитии, интенсивность этого синтеза и порядок включения синтеза РНК разных типов — только первый шаг исследования. Следующей задачей изучения эмбриональной транскрипции является анализ видов синтезируемой РНК и определение, таким образом, набора активных генов, функционирующих на разных стадиях развития. Но для того, чтобы получить полную картину характера генетического контроля над развитием, необходимо знать не только то, когда, какие мРНК и в каком количестве синтезируются, но и как они используются на последующих стадиях развития, т. е. сколько времени сохраняются и когда транслируются.

Существующие сейчас методы разделения и сравнения РНК позволяют сделать лишь первые шаги в этом направлении. Обычно методы разделения — на колонке МАК, в сахарозном градиенте или электрофорезном геле — могут характеризовать лишь степень гетерогенности РНК или выявить преимущественный синтез определенных фракций.

Если содержание РНК определяется по оптической плотности, то основную массу РНК зародыша составляют рРНК и тРНК,

Рис. 25. Гигантские РНК в цитоплазме ооцитов морского ежа. Ооциты инкубировали 6 час. с ^3H -уридином и микрургически разделяли на ядерные (1) и безъядерные (2) половины, выделяли РНК и анализировали электрофоретически. Над пиками приведены значения коэффициентов седиментации и молекулярных весов. Значительная часть меченой РНК в цитоплазме имеет мол. вес от $1,6 \cdot 10^6$ до $8 \cdot 10^6$, т. е. выше 26S рРНК (Giudice et al., 1974)



а мРНК почти не обнаруживаются. Неудивительно, что седиментационный анализ РНК из яиц морского ежа не позволяет установить какие-либо различия между профилями оптической плотности препаратов РНК из неоплодотворенного яйца и из поздней гаструлы (Slater, Spigelman, 1966). Седиментационный анализ распределения радиоактивности, т. е. вновь синтезированной РНК, уже позволяет выявить определенные различия в характере синтеза на ранних стадиях. По мере развития морского ежа от стадии 4 бластомеров до стадии бластулы гетерогенность вновь синтезированной РНК увеличивается, что, очевидно, означает увеличение видов РНК, т. е. количества активных генов (Slater, Spigelman, 1970). На стадии бластулы появляется и сохраняется на более поздних стадиях тяжелая РНК с молекулярным весом $1,5 - 2 \cdot 10^6$. Возможно, что это предшественник рРНК. На стадии гаструлы гетерогенность РНК несколько уменьшается, а значительную часть метки начинают составлять рРНК 28S и 18S.

Эта и другие аналогичные работы иллюстрируют тот не слишком неожиданный факт, что по мере развития число функционирующих генов возрастает. Средний молекулярный вес синтезируемых РНК по мере развития зародыша повышается. Вероятно, это связано с тем, что на самых ранних стадиях основная часть новых матриц определяет синтез ядерных белков — гистонов с небольшим молекулярным весом и соответственно с низкими седиментационными константами для мРНК. Позже начинается транскрипция иных мРНК большего размера.

Наиболее прямой метод определения видов мРНК — определение тех белков, которые этими мРНК кодируются. Само по себе появление новых белков безусловно свидетельствует о наличии в клетке соответствующих мРНК, но еще не позволяет установить,

были ли эти мРНК запасены в оогенезе или транскрибированы на гечах зародыша. Ряд методических приемов — гибридизация, инактивация ядер и другие — позволяет ответить и на этот вопрос. Однако прямое выделение и идентификация индивидуальных мРНК на ранних стадиях развития начали использоваться только в последнее время. Наибольшие успехи были получены для гистоновых мРНК, транскрибируемых и транслируемых на ранних стадиях развития морского сжа (Levy et al., 1975), и других объектов (Gabrielli, Baglioni, 1975). Поскольку критерием вида мРНК в этих экспериментах всегда служит синтез белков и поскольку эти работы должны рассматриваться и в разделах, посвященных синтезу белков и их генетической регуляции, все эти данные приводятся ниже.

Основные данные о видах РНК, синтезируемых в ходе эмбрионального развития, были получены посредством применения различных вариантов метода молекулярной гибридизации. И хотя принципы этого метода были рассмотрены во введении, мы должны здесь коснуться возможностей и ограничений этого важного пути исследования применительно к эмбриональному развитию.

Доля повторяющихся последовательностей в геноме может быть установлена по кинетике ренатурации ДНК. Эта доля у большинства видов варьирует от 40 до 70%. Обычные методы гибридизации РНК с ДНК дают информацию почти исключительно о транскрипции этой части генома. Очевидно, что закономерности, связанные с функцией уникальных генов, при этом ускользают от исследователя. Однако в последние годы были разработаны и начали применяться методы выделения уникальной части генома, основанные на различиях в скорости ренатурации уникальных и повторяющихся последовательностей (Davidson, Hough, 1971).

Выше уже говорилось, что эти методы позволили определить количество активных уникальных генов, действующих в оогенезе на стадии ламповых щеток. Доля РНК, синтезированной на этих гечах, соответствует около 1,2% уникальной фракции ДНК, но, очевидно, именно эта часть РНК определяет синтез большинства белков на ранних стадиях развития. Значение транскрипции уникальных генов в развитии млекопитающих хорошо иллюстрируется работами Черча (Church, Brown, 1972; Church, Schultz, 1974). Доля повторяющихся последовательностей, транскрибируемых на всех стадиях развития мыши — от стадии 8—16 бластомеров до взрослого животного, оказалась фактически постоянной величиной, составляющей 4—5% от всего генома. В то же время доля транскрибируемых уникальных генов на этих стадиях существенно меняется в ходе развития. На ранних стадиях (от стадии 8—16 бластомеров до стадии бластоциста) она очень невелика и не превышает 1% от всей ДНК. Но затем, во время органогенеза, к 7—14 дням эмбрионального развития она резко возрастает и до-

стигает к моменту рождения 10% от всей ДНК, а от общего числа уникальных последовательностей — 16%. Характерно, что кривые изменения процента транскрибирующихся уникальных последовательностей различны для разных органов. Для печени — морфологически просто организованного органа — доля активных уникальных последовательностей невелика (1,2—1,7%) и мало меняется от момента образования печени у зародыша и до взрослого органа. В то же время в клетках мозга эта доля у 14-дневного зародыша равна 3%, к рождению составляет 5% и в последующем развитии достигает 10%.

Эти данные показывают, что высокая относительная доля активных повторяющихся последовательностей по отношению к уникальным является особенностью только раннего эмбрионального развития. Вряд ли следует думать, что за специфические синтезы даже у ранних зародышей ответственны повторяющиеся гены. Тем не менее значительная часть данных, имеющихся сейчас в нашем распоряжении, относится почти целиком к повторяющимся последовательностям, что существенно ограничивает возможности интерпретации. Однако несмотря на это они проливают некоторый свет на качественные закономерности функции генома на ранних стадиях развития.

Анализ зависимостей процента гибридизации от времени отжига РНК с ДНК, от соотношения ДНК : РНК и от присутствия немеченых РНК, полученных из зародышей разных стадий, позволяет с большей или меньшей определенностью судить о нескольких параметрах, касающихся, однако, только повторяющихся последовательностей. Первым из них является доля активных генов на исследуемой стадии. Она соответствует количеству ДНК (в %), гибридизующейся в условиях насыщающих количеств РНК и достаточного времени, при котором кривая гибридизации выходит на плато. Вторым параметром является степень гибридизуемости РНК, которая определяется при значительных избытках ДНК. Этот параметр позволяет судить о степени разнообразия синтезируемых РНК и, в первую очередь, о наличии гетерогенной перибосомной РНК. Естественно, что большие количества рРНК, синтезируемые на участке ДНК, составляющем всего 0,02% генома, могут гибридизоваться с ней в совершенно незначительных количествах. Увеличение процента гибридизуемой РНК означает, что в ее составе существуют молекулы, синтезированные на большом числе различных участков ДНК (генов). Третьим параметром является сходство двух видов РНК, т. е. нуклеотидных последовательностей ДНК, с которых они были транскрибированы. Об этом параметре можно судить по степени конкуренции, которая выражается в снижении процента гибридизации меченой РНК первого вида в присутствии нарастающих количеств немеченой РНК второго вида. Чем выше конкуренция, т. е. чем в большей степени немеченая РНК подавляет гибридизацию меченой, тем выше их сходство, или, точнее, тем большее количе-

ство молекул в меченом и немеченом препаратах тождественны друг другу. Сравнивая таким путем РНК, выделенную на разных стадиях развития (на одной из них дается радиоактивная метка), можно судить о том, в какой мере на обеих стадиях функционируют одни и те же гены (рис. 26).

Дополнительные сведения могут быть получены при сравнении углов наклона и концентрации РНК при выходе на плато кривых конкуренций гибридизации. Они позволяют судить об относительном числе идентичных копий РНК, присутствующих в двух сравниваемых препаратах. Это в какой-то степени позволяет различить, связана ли степень конкуренции с тем, что на обеих стадиях активно небольшое число одних и тех же генов, на которых, однако, транскрибируется значительное число копий РНК, или же с тем, что на этих стадиях функционирует много одинаковых генов, на каждом из которых синтезируется небольшое число копий.

Меченую РНК для опытов по молекулярной гибридизации можно получать в результате короткой инкубации зародыша с предшественником (десяти минут), длительной инкубации (часы, дни) или, наконец, путем химического метилирования выделенной РНК с радиоактивным ^3H или ^{14}C -диметилсульфатом.

В первом случае радиоактивность будет отражать состав синтезируемой РНК, в которой значительную часть составят короткоживущие фракции. Во втором случае, при длительном введении метки, абсолютное количество меченой короткоживущей РНК останется тем же, а относительная ее доля сильно упадет за счет накопления в течение длительной инкубации долгоживущих фракций. Наконец при химическом мечении выделенной РНК гибридизация будет отражать не синтез, а состав РНК, синтезированных на всех предшествующих этапах развития и сохранившихся к моменту выделения. Очевидно, что при втором и третьем способах введения метки в препаратах РНК значительную часть должны составлять долгоживущие мРНК, прошедшие процессинг и функционирующие в цитоплазме.

Имеющиеся сейчас данные получены в основном на трех видах — шпорцевой лягушке-ксенопусе, морском еже и выуне. Полученные на этих разных объектах данные во многом согласуются, но имеют вместе с тем и различия.

Амфибии

Прежде всего следует рассмотреть ситуацию, которая возникает у зародышей амфибий на стадиях бластулы — гастролы, когда начинается транскрипция новых мРНК, в то время как материнские мРНК, запасенные в овогенезе, еще содержатся в клетках зародыша (Crippa et al., 1967) (рис. 27). Этот вопрос был исследован Криппа и Гроссом (Crippa, Gross, 1969), которые проводили конкурентную гибридизацию РНК, выделенной на стадии бла-

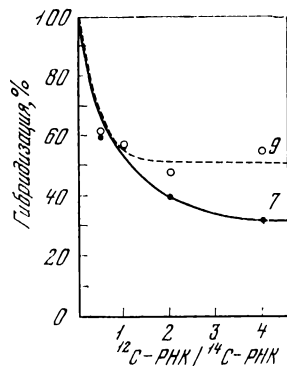
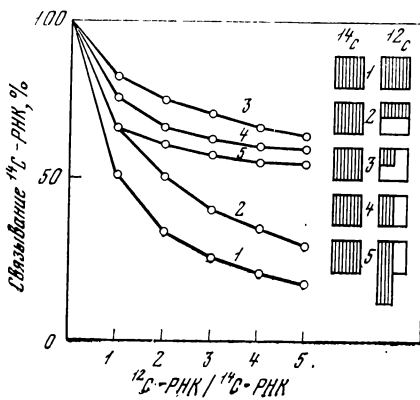


Рис. 26. Моделирование конкурентной гибридизации с ДНК

Теоретическое рассмотрение конкуренции меченых (^{14}C) и немеченых (^{12}C) РНК, в зависимости от их количественных соотношений и содержания одинаковых последовательностей. 1 — ^{12}C -РНК идентична ^{14}C -РНК; 2 — ^{12}C -РНК содержит те же фракции, что и ^{14}C -РНК, но в половинной концентрации; 3, 4, 5 — ^{12}C -РНК содержит лишь часть фракций, идентичных фракциям ^{14}C -РНК в меньшей (3), равной (4) или большей (5) концентрациях. Кривые различаются по углу наклона и уровню гибридизации, при котором выходят на плато (Куприянова, цит. по Рачкус и др., 1969б)

Рис. 27. Использование в раннем развитии ксенопуса РНК, транскрибированной в оогенезе, на стадии «ламповых щеток»

Ооциты в начале большого роста инкубировали с ^{32}P -фосфатом и выделенную ^{32}P -РНК гибридизировали с ДНК в присутствии различных количеств немеченой РНК, полученной со стадии 7 (ранняя бластула) и со стадии 9 (поздняя бластула). РНК на стадии 7, как и РНК яйца, содержит 70% тех же последовательностей, что РНК ооцита на стадии ламповых щеток. На стадии 9 это количество заметно уменьшается (Cirra et al., 1967)

стулы — гастролы с меченой РНК яйца, полученной метилированием *in vitro* с помощью ^{14}C -диметилсульфата. Они показали, что в яйце хранится РНК, транскрибированная на генах, составляющих 4,1% генома. Это больше значений, полученных Дэвидсоном на стадии ламповых щеток (2,7%) (Davidson et al., 1966), что, возможно, объясняется дополнительным синтезом РНК в позднем оогенезе и при созревании. Приведенные величины относятся к повторяющимся последовательностям, в то время как в зрелом ооците содержится РНК, транскрибированная только на 1,2% уникальных последовательностей ДНК (Davidson, Hough, 1971).

РНК, полученная на стадиях 7–10 (ранняя бластула — ранняя гастрולה) конкурирует с РНК яйца, показывая тем самым, что на этих стадиях еще сохраняются материнские виды РНК. Однако количество этих видов в течение развития постепенно убывает (Cirra, Gross, 1969). К ранней-средней бластуле (стадия 7) в зародыше сохраняются все виды запасенной в ооците РНК, $\frac{3}{5}$ этих видов РНК находится в полирибосомах и, оче-

видно, транслируется. К стадии поздней бластулы (стадия 9) в зародыше остается лишь 75% видов РНК яйца, и $\frac{2}{3}$ этих видов обнаруживаются в полирибосомах. На стадии ранней гастрюлы (стадия 10) сохраняется около 50% видов РНК, запасенных в яйце. На этой стадии уже все виды материнской РНК обнаруживаются в полисомах. Более новые данные, полученные на южноамериканской лягушке *Engystomops*, показали, что часть РНК, транскрибированных в оогенезе, сохраняется вплоть до стадии головастика (Hough et al., 1973).

Смесь РНК, полученных из полисом на стадиях 7 и 9, конкурирует с РНК яйца лучше, чем каждая из них в отдельности. Это указывает на некоторые различия видов РНК, транслируемых на этих стадиях. Показано, что новая мРНК зародыша, синтезированная на стадии 9, также входит в состав полирибосом и транслируется вместе с материнской РНК (Crippa, Gross, 1969). При этом в полисомах присутствует запасенная материнская РНК, транскрибированная на 2,8% материнского генома, а также новообразованная РНК, синтезированная на иных последовательностях ДНК, составляющих 2,2% от генома зародыша.

Те же стадии развития исследовали Дэвидсон и сотр. (Davidson et al., 1968). ^{32}P -фосфат вводили лягушке перед овуляцией и получали РНК, меченую на стадиях от овуляции до поздней бластулы. Подавляющую часть меченой РНК при этом составляла РНК, синтезированная во время интенсивного повышения транскрипции на стадии поздней бластулы (стадии 8—9). Опыты по конкуренции меченой таким образом РНК с немеченой РНК ооцита показали их полное различие, т. е. на стадиях бластулы активируются иные гены, чем те, которые работали во время оогенеза. Амфибии, как оказалось, отличаются в этом отношении от морского ежа, у которого гены, активные на стадии мезенхимной бластулы, во многом гомологичны генам, функционирующим в оогенезе (Glišhin et al., 1966). Конкуренция той же меченой (на стадиях 0—9) РНК с РНК, выделенной на стадии 7 (ранняя — средняя бластула), также была совершенно незначительна. Это не должно удивлять, так как синтез до стадии 7 ничтожен и РНК на стадии ранней бластулы не должна, следовательно, сколько-нибудь существенно отличаться от РНК яйца.

Затем исследовали конкуренцию РНК, синтезированной до стадии 9, с РНК, выделенной на стадии ранней гастрюлы (стадия 10). Хотя эти стадии отличаются одна от другой лишь на несколько часов развития, конкуренция оказалась небольшой и составляла всего 28%, т. е. менее $\frac{1}{3}$. Это должно означать, что большинство РНК, синтезированной на стадии поздней бластулы (стадия 9), уже к стадии 10 исчезает из зародыша. Менее $\frac{1}{3}$ ее видов сохраняется в клетках либо продолжает синтезироваться на тех же генах. Таким образом, у амфибий перед гастрюляцией синтезируется РНК, служащая, очевидно, для обеспечения гастрюляции. Эта РНК в основном стадиоспецифична, т. е. не синте-

зируется ни на предыдущих, ни на последующих стадиях и в значительной степени используется на этих же предгаструляционных стадиях. Вопрос о том, полностью ли прекращается ее синтез на последующих стадиях, остается открытым, так как сохранившиеся 28% тех же видов РНК к стадии 10 могут целиком или в значительной мере быть созданы за счет продолжения активности генов, работающих на стадии бластулы.

Работа Дэвидсона и соавт. (Davidson et al., 1968) позволила получить и некоторые данные о числе копий РНК, синтезированных в оогенезе и на стадиях бластулы. Об этом можно судить по соотношению ДНК : РНК, при котором достигается гибридационное насыщение, т. е. все комплементарные последовательности ДНК заполняются соответствующими последовательностями РНК. Для РНК из ооцитов насыщение достигается уже при соотношении ДНК : РНК, равном 1 : 2; то же соотношение для РНК стадии бластулы равно 1 : 400. Это означает, что каждый из видов мРНК яйца представлен очень большим количеством копий (10^4 — по данным Дэвидсона), в то время как на стадии бластулы успевает транскрибироваться лишь небольшое число копий на каждом активном гене.

Мы видим, что хотя данные этой работы касаются лишь синтеза и судьбы РНК, синтезированной на повторяющихся последовательностях, они дали ценный материал, который пока не мог быть получен иными способами.

В работах Дени (Denis, 1966 a, b, 1968) тоже на зародышах ксенопуса исследована взаимная конкуренция РНК, полученных на множестве стадий, в том числе позднеэмбрионального и личиночного развития. Используя относительно коротко меченную РНК, Дени получил данные о том, как в ходе развития происходит смена синтезируемых видов РНК. Данные параллельной серии с длительно меченой РНК позволяли судить о смене видов долгоживущей РНК и о длительности их использования после синтеза (рис. 28).

РНК, коротко меченная у плавающего головастика (стадия 42), не конкурирует с РНК яйца и РНК бластулы, но уже на стадии гастрюлы начинается конкуренция, которая постепенно увеличивается по мере того, как возрастает стадия зародышей и личинок, из которых выделялась немеченая РНК (рис. 28, б). Следовательно, по мере развития происходит включение все новых генов, активных на протяжении всего последующего развития.

Заметная конкуренция с РНК, коротко меченой в начале органогенеза (стадия 26—28, хвостовая почка), также начинается во время гастрюляции и постепенно увеличивается до стадии хвостовой почки, а затем сохраняется и на всех последующих стадиях.

Наконец, РНК, коротко меченная на стадии гастрюлы, не конкурирует с РНК яйца и с РНК бластулы, но хорошо конкурирует с РНК своей стадии и всех последующих, вплоть до позд-

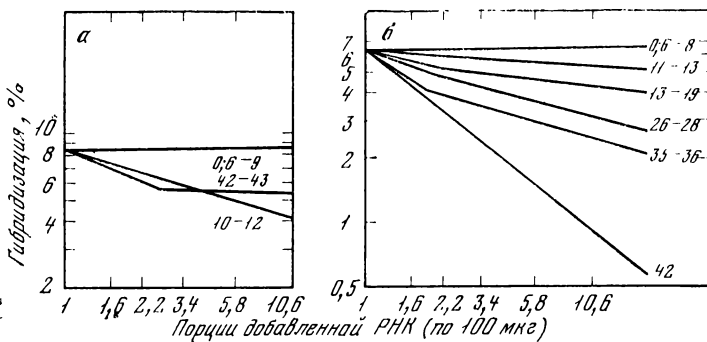


Рис. 28. Появление новых видов РНК в ходе развития ксенопуса

Зародышей на стадиях 10—12 (гастрюла) (а) или 42 (головастик) (б) инкубировали с $^{14}\text{C}\text{O}_2$, выделяли РНК и гибридизовали ее с ДНК в присутствии различных количеств немеченой РНК, выделенной из различных стадий. У каждой кривой обозначены стадии, на которых выделяли немеченую РНК. РНК, синтезированная на гастрюле, не конкурирует с РНК, хранящейся в яйце и на ранних стадиях (стадии 6—9). С началом синтеза РНК в зародыше количество видов РНК, общих с РНК головастика, постепенно увеличивается (Denis, 1966)

него головастика. Характер кривых конкуренции с немеченой РНК, взятой со стадии гастрюлы и из головастика, несколько различен. Конкурентное подавление гибридизации меченой РНК гастрюлы при добавлении немеченой РНК той же стадии медленно парастает по мере увеличения концентрации немеченой РНК. Кривая эта в опытах Дени так и не достигает плато. Это означает что число копий РНК, синтезируемых на стадии гастрюлы, относительно невелико. В то же время препарат РНК, выделенный из плавающего головастика, также хорошо конкурирует с меченой РНК гастрюлы. Однако в данном случае наклон кривой больше, и уже при малых концентрациях немеченой РНК кривая выходит на плато, которое лежит заметно выше, чем кривая конкуренции РНК гастрюлы. Это означает, что хотя на стадии 42 набор последовательностей (фракций РНК), общих с теми, которые синтезируются на стадии гастрюлы, меньше, количества копий каждого вида РНК — больше.

Данные Дени (Denis, 1966a, b, 1968) показывают, что по мере развития возрастает число активных генов, причем многие из них не имеют строгой стадиоспецифичности — включившись на той или иной стадии, они продолжают транскрибироваться и на последующих. Однако доля их от общего числа активных генов на поздних стадиях уменьшается, поскольку по мере развития к ним присоединяются новые активные гены. Надо помнить, что, во-первых, речь здесь по-прежнему идет лишь о повторяющихся последовательностях и, во-вторых, то, что препараты РНК выделялись из целых зародышей и личинок. Поэтому трудно сказать,

отражает ли такое присоединение новых активных генов события, происходящие в каждой клетке, или свидетельствует о появлении новых специализированных клеточных типов со своими специфическими наборами функционирующих генов.

При сравнении доли генома, участвующего в транскрипции на разных стадиях, обнаруживается существенная разница между короткой и продолжительной меткой. В первом случае гибридизация от стадии к стадии почти не меняется (1,8—2,4%), в то время как при длительном мечении она возрастает от 1% во время овуляции до 2,4% на стадии гастролы, до 5% на хвостовой почке и до 8—9% у головастика. Это означает, что активация новых генов приводит к синтезу в основном долгоживущих РНК, в то время как доля генов, на которых транскрибируются короткоживущие РНК, остается все такой же.

Увеличение числа активных генов в ходе развития лягушки *Rana ripiens* показано также в работе Грина и Фликинджера (Green, Flickinger, 1970). Как и в предшествующих работах, эти авторы нашли, что в ходе развития происходит не столько смена, сколько добавление новых генов, выражающееся в том, что с меченой РНК ранних стадий хорошо конкурируют РНК, выделенные из старших зародышей и личинок. Грин и Фликинджер метили выделенную РНК ^3H -диметилсульфатом, т. е. исследовали не синтезированную за тот или иной период, а всю имеющуюся в клетках РНК. Очевидно, что соотношение между видами РНК, синтезированными на предшествующих стадиях, зависело не только от интенсивности синтеза, но и в не меньшей мере от того, насколько долгоживущими были эти РНК и как много времени прошло с момента их синтеза. Короткоживущие РНК в этих условиях эксперимента составляли небольшую часть, причем только за счет молекул, синтезированных непосредственно перед стадией, на которой РНК выделяли. В такой постановке эксперимент позволял судить не столько об изменениях в наборе активных генов, сколько об изменениях в составе мРНК, готовых к трансляции.

По мере развития происходит увеличение гибридизации ДНК с РНК и изменение формы кривой, отражающей зависимость процента гибридизации от количества РНК. На стадиях гастролы и даже нейрулы уже при небольших количествах РНК кривая образует плато, т. е. все комплементарные участки ДНК закрываются РНК и новые порции РНК уже связываться с ДНК не могут. Это означает не только то, что число генов, на которых эти РНК синтезировались, невелико, но и то, что каждый из видов этих РНК представлен большим числом копий, из которых лишь часть может гибридизоваться. На последующих же стадиях (хвостовая почка, головастик) кривая гибридизации не только поднимается выше, отражая большее число активных генов, но и при самых высоких концентрациях РНК не образует плато. Это означает, что в составе РНК имеется небольшое число копий

каждого вида и по мере увеличения количества добавленной РНК все новые и новые молекулы РНК находят на ДНК комплементарные себе последовательности. К этому же выводу авторы приходят и на основании экспериментов по истощению РНК путем последовательного пропускания ее через фильтры с новыми порциями ДНК. Для РНК, полученной на ранних стадиях, требуется очень большое количество ДНК, чтобы связать заметную часть РНК, в то время как РНК поздних стадий в значительной своей части извлекается из раствора уже первыми порциями ДНК. Характерно, однако, что и в составе поздних РНК существует часть, не извлекаемая значительным количеством ДНК. Вероятно, это соответствует РНК, транскрибированным с уникальных последовательностей.

Различие в составе синтезируемых видов мРНК между частями зародыша амфибий обнаруживается методом конкурентной гибридизации уже со стадии поздней бластулы. РНК, выделенные из вегетативной и анимальной частей бластулы, из спинного и брюшного отделов зародыша на стадии хвостовой почки, заметно отличались друг от друга (Flickinger et al., 1966).

Морской еж

Между результатами экспериментов по гибридизации на амфибиях и на морских ежах существует принципиальное различие — если у амфибий уже в период раннего развития синтезируются мРНК новых видов, не транскрибируемых в оогенезе, то у морского ежа на всех стадиях от оогенеза и до дифференцированной личинки (призмы) значительная часть активных генов одинакова. Это было показано уже в первых экспериментах по конкурентной гибридизации, проведенных Уайтли (Whitely et al., 1966) и Глишиным (Glišin et al., 1966).

В опытах Уайтли меченую по ^{32}P РНК получали на стадии призмы и затем исследовали зависимость гибридизации от добавления немеченой РНК, взятой на более ранних стадиях. Оказалось, что РНК, полученная из неоплодотворенного яйца или на стадии бластулы, значительно (на 50%) конкурирует с РНК призмы, т. е. половина РНК на этих стадиях синтезируется на тех же последовательностях ДНК. По мере развития степень конкуренции возрастает, достигая естественного максимума, когда конкурируют меченая и холодная РНК, полученные на той же личиночной стадии. Несколько меньшую, но вполне определенную конкуренцию с РНК призмы обнаруживает мРНК, выделенная из взрослых тканей — семенника и кишечника (Whitely et al., 1966).

К аналогичным выводам приходит и Глишин, который исследовал конкуренцию между РНК, меченой на стадии поздней бластулы, и РНК, полученной на более ранних и более поздних стадиях. Как и в опытах Уайтли, РНК из неоплодотворенного яйца, РНК, взятая на стадии раннего дробления, и РНК на ста-

дии бластулы оказались при таком методе гибридизации сходными, т. е. с меченой РНК бластулы конкурировали одинаково. Меньше, но все же значительно (на 40%) конкурировали с той же РНК и препараты, полученные на стадии гастролы и из личинки на стадии призывы (Glišin et al., 1966) (рис. 29).

Из этих ранних работ по гибридизации РНК, в которых учитывались преимущественно или исключительно повторяющиеся последовательности, следует, что начиная с оогенеза и кончая стадией бластулы активно считываются одни и те же последовательности и лишь на более поздних стадиях к ним добавляется еще такое же количество новых.

В более поздней работе (Hynes, Gross, 1972) было, однако, показано, что уже на стадии морулы значительная часть синтезирующейся РНК (70%) отличается от РНК, запасенной в оогенезе.

В опытах В. Г. Вольфсона и В. И. Воробьева (1971, 1972), и В. Г. Вольфсона (1971) был сделан следующий шаг — меченую РНК получали на стадиях бластулы и гастролы из целых зародышей, а также синтезировали ее *in vitro* на хроматине, выделенном на этих же стадиях, и, наконец, выделяли из полисом, т. е. брали не тотальную, а заведомо транскрируемую мРНК. В этих работах представляет интерес сравнение степени гибридизации с ДНК — препаратов РНК, синтезированных на хроматине бластулы, хроматине гастролы и на чистой ДНК. Количество ДНК было избыточным, т. е. из раствора извлекалась вся та РНК, которая могла гибридизоваться в этих условиях (с повторяющимися последовательностями), и определяли процент этой связанной РНК. Оказалось, что РНК, синтезированная на чистой ДНК, гибридизуется менее всего (менее 20%). РНК, синтезированная на чистой ДНК, лишенной белка, транскрибируется в равной мере по всей длине ДНК, а потому могла бы гибридизоваться со всей ДНК (т. е. гибридизация должна быть близка к 100%). Этого, однако, не происходит, потому что в используемых авторами условиях в гибридизацию вступают лишь повторяющиеся последовательности, доля которых у морского ежа невелика (менее 20%).

На хроматине бластулы (*in vitro*) и в самой бластуле *in vivo* синтезируется РНК, которая гибридизуется существенно выше — на 45%. И это естественно объясняется тем, что на ранних стадиях доля активно транскрибируемых повторяющихся генов очень велика. Для РНК, синтезированной на стадии гастролы *in vivo* или на хроматине *in vitro*, характерно уже меньшее участие в гибридизации — при насыщающих количествах ДНК с ней связывается не более 25% РНК. Доля считанных повторов в популяции РНК становится меньше, очевидно, за счет повышения доли активных уникальных генов. Взаимная конкурентная гибридизация РНК, синтезированных на стадиях бластулы и гастролы, показывает, что приблизительно половина последовательностей,

Рис. 29. Появление новых видов РНК в развитии морского ежа

Меченую РНК получали на стадии поздней бластулы и гибридовали с ДНК в присутствии различных количеств немеченых РНК, взятых с той же стадии (1), два часа спустя (2), из неоплодотворенного яйца (3), со стадий гастролы (4) и призмы (5). Состав РНК в неоплодотворенном яйце и на стадии бластулы не различается, но со стадии гастролы в зародыше появляются новые виды РНК (Ghisin et al., 1966)

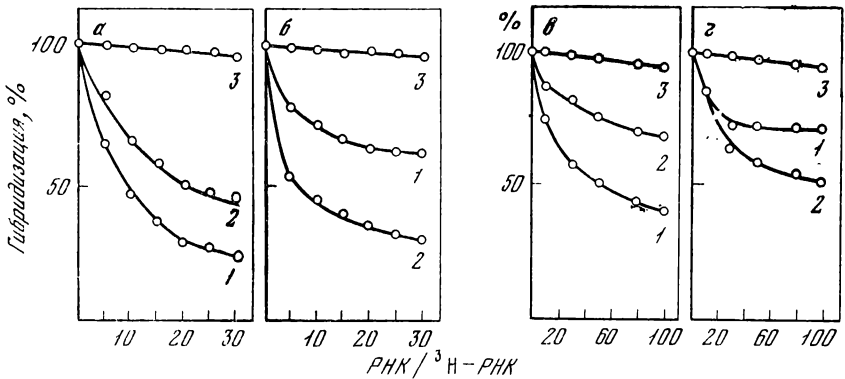
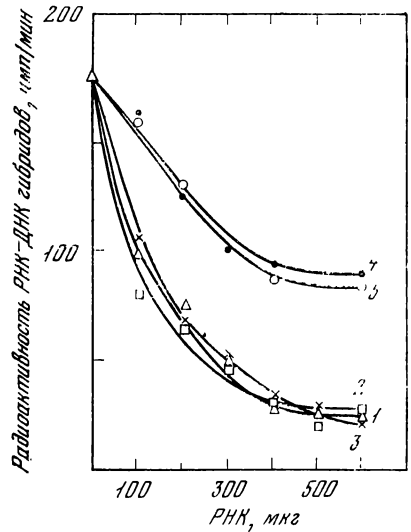


Рис. 30. Различия РНК, синтезируемых у зародышей морского ежа на стадиях бластулы и гастролы

Зародышей *Strongylocentrotus droebachiensis* на стадии поздней бластулы (а) и поздней гастролы (б) инкубировали с ^3H -уридином и получали меченые РНК. Такие же РНК получали при синтезе РНК *in vitro* на хроматине, выделенном из бластулы (в) и гастролы (г). Меченые РНК гибридовали с ДНК в присутствии немеченых тотальных (а, б) или ядерных (в, г) РНК из бластулы (1) или гастролы (2). Для контроля использовали также немеченую чужеродную РНК из инфузории (3). РНК, синтезируемые на стадиях бластулы и гастролы, хотя и имеют часть общих последовательностей, отличаются одна от другой. Эти различия сохраняются и у РНК, синтезированных *in vitro* на хроматине (Вольфсон, Воробьев, 1972)

активных на этих стадиях, одинаковы. Но не менее половины транскрибируемых повторяющихся последовательностей различно, т. е. во время перехода от стадии бластулы к стадии гаструлы происходит замена или добавление значительной части набора активных генов (рис. 30а, б).

Так как синтез РНК на изолированном хроматине в бесклеточной системе происходил при участии не собственного фермента, а бактериальной РНК-полимеразы, полученной из *E. coli*, то возникает естественный вопрос: в какой степени синтезированная в этих условиях РНК тождественна по составу РНК, синтезированной в целых клетках на той же стадии? Существующие в настоящее время данные противоречивы и не позволяют дать окончательный ответ на этот вопрос, но используемые до сих пор методы гибридизационного анализа не дают возможности обнаружить заметные различия между РНК, синтезированными *in vivo* и *in vitro*. В работе В. Г. Вольфсона такие РНК, транскрибируемые на хроматине на стадиях бластулы и гаструлы, сохранили те же различия между стадиями, которые были показаны для РНК, синтезированных *in vivo* в целых зародышах на этих стадиях (Вольфсон, Воробьев, 1972). Более того, получение РНК путем ее синтеза на хроматине дает некоторые преимущества в том случае, когда предметом исследования является не состав РНК в клетке, а набор активных генов. Дело в том, что как бы ни была коротка инкубация в целом зародыше, синтезированные РНК успевают подвергаться определенным изменениям — процессингу, деградации короткоживущих матриц, а при выделении эти РНК оказываются смешанными с избытком конкурирующих с ними помеченных долгоживущих мРНК и сильно разбавлены рРНК. В том же случае, если транскрипция происходит *in vitro*, все эти вторичные процессы и примеси сведены к минимуму и продукция активных генов исследуется как бы в момент ее образования. Если же задачей работы является исследование не собственно активности генов, а состава РНК в клетке, то меченую РНК удобнее получать или путем длительной инкубации с предшественником или метилированием после выделения, как это уже обсуждалось в опытах на амфибиях.

В опытах В. Г. Вольфсона и В. И. Воробьева (1972) был исследован и выход РНК из ядра в цитоплазму. Для этого сравнивали гибридизуемость РНК, полученных из различных клеточных фракций — ядер и цитоплазмы, а также более чистых фракций — хромосомно-ядрышковой фракции и фракции полирибосом. Очевидно, что эти фракции позволяют как бы проследить последовательный ход изменений РНК: тотчас после ее синтеза (РНК из хромосомно-ядрышкового препарата), в ходе ее изменений внутри ядра (РНК из целых ядер), после ее выхода из ядер (цитоплазматическая РНК) и, наконец, на завершающем этапе, в момент трансляции (РНК из полирибосом). Оказалось, что гибридизуемость на всех этих последовательных этапах возрастает от

15% на хромосомах до 35% в целых ядрах и до 55—60% в цитоплазме и полирибосомах. Эти цифры позволяют сделать важные выводы. Первый из них заключается в том, что на пути преобразований РНК от места транскрипции к месту трансляции происходят значительные ее изменения. И второй вывод, в ходе этих изменений значительно возрастает доля повторяющихся последовательностей (об этом и только об этом очевидно говорит повышение гибридизуемости). Вероятное объяснение может состоять в том, что значительную часть синтезируемой РНК на стадии бластулы составляют матрицы для синтеза гистонов (Gross K. W. et al., 1973, a, b). По мере выхода из ядра и включения в состав полисом возрастает их относительная доля среди других РНК и соответственно возрастает процент гибридизации с повторяющимися генами гистонов.

Может быть, более интересны те опыты В. Г. Вольфсона, когда исследовали меченую РНК бластулы из хромосомно-ядрышкового аппарата и РНК из цитоплазмы зародышей путем конкуренции с немеченой РНК тех же клеточных фракций, полученных на стадиях бластулы и гастролы. Оказалось, что хромосомно-ядрышковые РНК бластулы и гастролы мало отличаются друг от друга по степени конкуренции (80 и 70% соответственно). В то же время для РНК цитоплазмы различия эти намного больше — 70% конкуренции для цитоплазматической РНК бластулы и только 30% для цитоплазматической РНК гастролы. Это означает, что различия в составе РНК в ходе развития во многом создаются уже в ходе процессинга и выхода РНК в цитоплазму или, что, вероятно, более точно, в ходе развития синтезируются две фракции РНК — одна, остающаяся в ядре и мало меняющаяся в ходе развития, и вторая (собственно мРНК), выходящая в цитоплазму, состав которой значительно преобразуется от стадии к стадии.

Более подробно и глубоко различия между ядерными и цитоплазматическими мРНК у зародышей морского ежа были исследованы в лаборатории Бриттена и Дэвидсона, где учитывали транскрипты только с уникальных последовательностей ДНК (Galau et al., 1974; Hough et al., 1975). Результаты этих исследований содержат важную информацию, но пока что еще не могут быть однозначно интерпретированы. Авторы исследовали «сложность» (complexity) состава РНК, т. е. степень ее разнообразия (diversity), которая может быть измерена числом нуклеотидов, составляющих сумму видов молекул РНК в данном препарате. Очевидно, что это разнообразие отражает число генов, на которых эти РНК были транскрибированы.

Цитоплазматические РНК на стадии гастролы морского ежа были выделены из полирибосом и представляли, следовательно, истинные мРНК. Их гибридизовали с неповторяющимися последовательностями денатурированной ДНК, а связанную таким образом ДНК затем ренатурировали со всей ДНК. Полученные этим

методом данные позволяли только определить долю уникальных последовательностей ДНК, ответственных за транскрипцию мРНК зародыша на стадии гастрюлы. Она составляла 2,7%, что соответствует 17 млн. пар нуклеотидов или 14 тыс. структурных генов среднего размера (1200 пар нуклеотидов) (Galau et al., 1974). Аналогичное исследование ядерных РНК привело к существенно большим значениям — ядерные РНК, согласно этим данным, транскрибируются на 28% уникальной части генома, т. е. обладают в 10 раз большей «сложностью», чем мРНК на полирибосомах (Hough et al., 1975).

По расчетам авторов, в цитоплазме значительную часть мРНК составляют немногие виды матриц, представленные большим числом копий, в то время как 8% всей мРНК составлено из очень многих видов матриц, каждая из которых имеет не более 500 копий на зародыш. На стадии гастрюлы зародыши морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* состоят из 600 клеток, и на одну клетку приходится по этим расчетам менее одной копии каждого из многочисленных видов мРНК. Авторы логично предполагают, что разные мРНК транскрибируются и содержатся в различных дифференцированных клетках зародыша. Подобные же расчеты для ядерных РНК приводят к труднообъяснимым значениям — число копий разных видов РНК оказывается меньше единицы на зародыш. Очевидно, что расчеты требуют иных допущений, и число различных последовательностей не может быть отождествлено с числом самостоятельно транскрибируемых генов.

Принципиально важным является вывод о том, что «сложность» РНК в ядрах намного выше, чем в цитоплазме. Одним из объяснений этого факта может служить предположение о значительной селекции мРНК в ядрах, т. е. о том, что на уровне транскрипции осуществляется лишь предварительный отбор активируемых генов, а более строгая регуляция происходит в ядрах, на уровне посттранскрипционной селекции матриц, выходящих в цитоплазму.

Однако полученные данные можно объяснить и с позиций представлений Г. П. Георгиева о структуре оперона эукариот. Про-мРНК содержит большую «регуляторную» часть, которая помимо повторяющихся последовательностей включает уникальные фрагменты. Разнообразие этих уникальных последовательностей, деградирующих в ходе процессинга про-мРНК, намного выше, чем «сложность» мРНК, выходящих в цитоплазму.

В следующей работе этого цикла Дэвидсон и др. (Galau et al., 1976) отделяли ДНК, содержащую уникальные последовательности, комплементарные к мРНК гастрюлы, от остальной уникальной ДНК (не комплементарной РНК гастрюлы). Эти два вида ДНК гибридизовали с мРНК зародышей и различных взрослых тканей. Таким путем определяли сложность транскрибируемой доли генома — гомологичной (тождественной) мРНК гастрюлы и не гомологичной ей. Если на стадии гастрюлы эта сложность, изме-

ряемая числом нуклеотидов ($\times 10^6$), равна 17, то на стадии бластулы оказалось — 12, гомологичных гастрале, а не гомологичных — 15, на плютеусе — 14, и около 0,6, а во всей РНК ооцитов — 17 и 20 соответственно. У взрослых тканей эти цифры были: для кишки — 2,1 и 3,7, для целомических клеток — 3,5 и 1,4, для яичника — 13 и 6,7. Таким образом, общая сложность последовательностей РНК выше в эмбриональных тканях и ниже в дифференцированных, но особенно велика в ооците. Многие гены, активные на стадии гастролы, функционируют на других стадиях и во взрослых тканях. Около $2 \cdot 10^6$ нуклеотидов (около 2 тыс. генов) активны во всех исследованных тканях (Galau et al., 1976).

Региональные отличия в составе мРНК у зародышей морского ежа были обнаружены очень рано — уже со стадии 16 бластомеров: до этой стадии виды мРНК, сравниваемые методом конкурентной гибридизации, одинаковы во всех бластомерах, а начиная с 16-клеточной стадии РНК, транскрибируемая в микрометрах, начинает отличаться от РНК макро- и мезомеров (Mizuno et al., 1974).

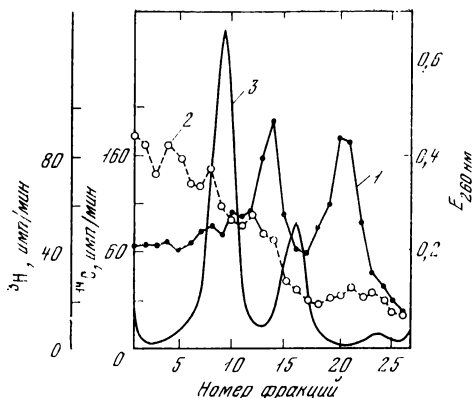
У ранних зародышей морского ежа были получены данные о синтезе новых и использовании материнских мРНК, кодирующих гистоны и тубулин. Уже в первых работах из лаборатории Гросса (Kedes, Gross, 1969; Kedes et al., 1969), посвященных этой проблеме, было показано, что в раннем развитии синтезируются преимущественно ядерные белки: среди меченых мРНК преобладает фракция 9S, а в легких полирибосомах включение лизина значительно превышает включение триптофана. Все это привело авторов к выводам, что значительную часть ранней транскрипции и трансляции составляют мРНК гистонов (рис. 31). Позднее, вопреки противоположным выводам из лаборатории Хнилицы (Johnson, Hnilica, 1970) это было прямо показано путем идентификации белков, синтезирующихся в системе *in vitro* на матрицах, запасенных в яйце морского ежа (Gross K. W. et al., 1973; Ruderman, Gross, 1973) (рис. 32). И хотя во время первых делений дробления происходит преимущественная транскрипция гистоновых генов, ее абсолютное значение невелико и синтез гистонов в раннем развитии в основном (на 85%) происходит на матрицах, запасенных в оогенезе. Доля гистоновых матриц, транслирующихся в раннем развитии (дробление — ранняя бластула) составляет около 60% всех мРНК (Nemer, 1975).

Разделение мРНК, выделенных из полирибосом ранних зародышей морского ежа, электрофоретически на восемь фракций и исследование их природы в белоксинтезирующей системе показало, что три крупнейшие фракции соответствуют гистоновым мРНК, которые вместе составляют большинство запасенных в яйце матриц (Levy et al., 1975).

В последние годы индивидуальные мРНК для отдельных гистонов были выделены и с помощью обратной транскрипции син-

Рис. 31. Изменения видов РНК, синтезируемой в раннем развитии морского ежа

Зародыши морского ежа на стадии 32 бластомеров инкубировали с ^3H -уридином, а на стадии поздней бластулы с ^{14}C -уридином. Выделенные РНК анализировали центрифугированием в сахарозном градиенте совместно. Радиоактивность ^3H -РНК, меченой на 32 бластомерах (1), радиоактивность ^{14}C -РНК, меченой на стадии поздней бластулы (2), количество РНК (E_{260} нм) (3). На стадии морулы синтезируются преимущественно 20S РНК и 9—10S РНК (ядерные белки), а на стадии поздней бластулы — широкий спектр преимущественно тяжелых РНК (Kedes et al., 1969)



тезированы комплементарные к ним ДНК. Это позволило в настоящее время отдельно исследовать мРНК, кодирующие все пять классов гистонов. Сравнение мРНК для каждого из гистонов, запасенных в яйце и вновь синтезированных в раннем развитии, показало их сходство по гибридизуемости и по размеру молекул (Lifton, Kedes, 1976). Это означает, что транскрибированные в оогенезе и длительное время хранящиеся матрицы принципиально не отличаются от вновь синтезированных и сразу же транслирующихся.

Однако у других видов, например, в яйцах моллюска *Spisula* запаса гистоновых мРНК обнаружить не удалось (Gabrielli, Baglioni, 1975).

Индивидуальные мРНК, кодирующие тубулин, были выделены из полирибосом ранних зародышей морского ежа (Hirama, Mano, 1974). Эти полирибосомы, содержащие по 15—20 рибосом, связываются с колхицином и осаждаются винбластином, что и указывает на содержание в них полипептидов, тождественных с тубулином. Как было показано Рафом, основная часть матриц для тубулина запасена в яйце (Raff et al., 1971, 1972, 1973, 1975).

Рыбы

Исследование ДНК-РНК-гибридизации на рыбах было проведено на зародышах вьюна Ю. А. Рачкусом, М. Я. Тимофеевой, Н. С. Куприяновой и К. А. Кафиани (Рачкус и др., 1969а, б, 1971). К началу этих работ в литературе уже были получены приведенные выше и сильно различающиеся данные на амфибиях и морских ежах. В эмбриональном развитии амфибий новосинтезированные РНК практически не конкурируют с РНК, запасенными в оогенезе, т. е. транскрипция идет на совершенно новых последовательностях (генах). Исследования на морском еже не

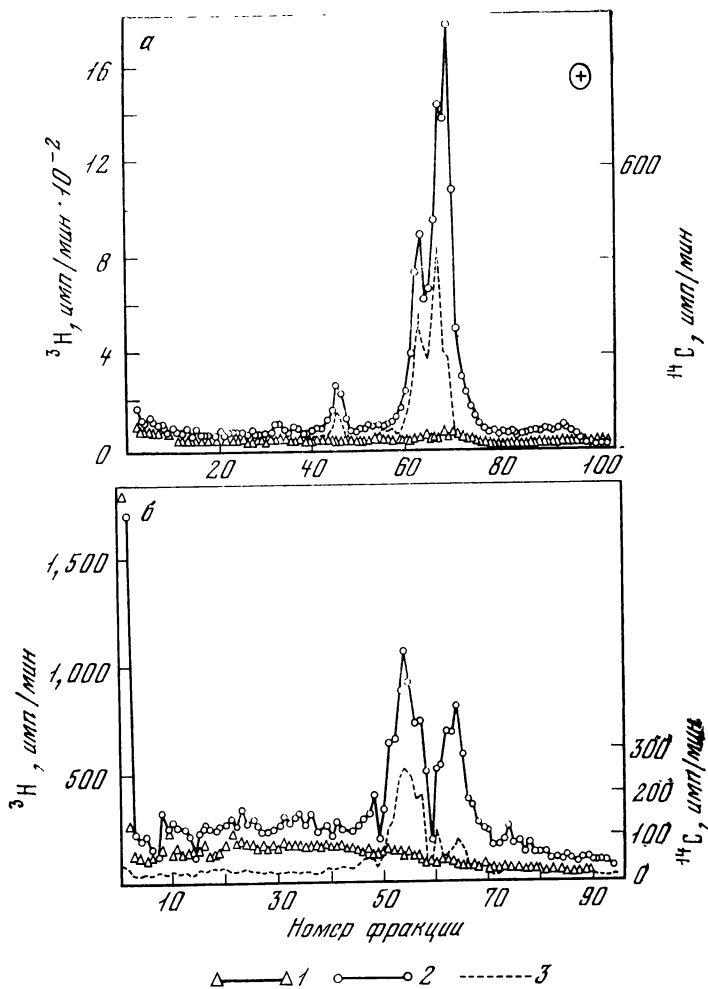


Рис. 32. Идентификация гистоновых мРНК из зародышей морского ежа
 У зародышей *Lytechinus pictus* на стадии ранней бластулы выделяли РНК, фракционировали в сахарозном градиенте и фракцию в области 9S транслировали в бесклеточной белоксинтезирующей системе из асцита Кребса с ^3H -лизином. Белки смешивали с маркерными гистонами морского ежа, меченными ^{14}C -лейцином, и анализировали электрофоретически в SDS-акриламидном геле при нейтральном (а) или кислом (б) рН. Контрольная белоксинтезирующая система без 9S РНК (1), система с 9S РНК (2), маркерные гистоны (3). Значительная часть синтеза, индуцированная 9S РНК, происходит в области гистонов (Gross et al., 1973)

менее убедительно показали, что на ранних стадиях (до бластулы включительно) синтез РНК идет почти на тех же самых последовательностях, что и в оогенезе. В систематическом отношении рыбы, естественно, ближе к амфибиям, хотя по типу развития костистые рыбы значительно от них отличаются. Тем не менее в характере транскрипции эксперименты по гибридизации показали их сходство с морским ежом.

РНК, меченная на стадиях поздней бластулы (самая ранняя стадия, когда можно получить достаточное включение предшественника в РНК), хорошо конкурирует с РНК неоплодотворенного яйца. Это остается справедливым и для РНК, синтезированной на стадии гастролы или в органогенезе (Рачкус и др., 1969а, б) (рис. 33). Сходство рыб с иглокожими и их отличие от амфибий кажется поразительным. Очевидно, что объяснение этого явления мы найдем только после того, как в данном аспекте будут исследованы другие — близкие и далекие — систематические группы. Более интересно было бы провести опыты на осетровых рыбах — по строению яйца и типу развития они очень близки к амфибиям. Было бы также полезно убедиться, что хвостатые амфибии мало отличаются от бесхвостых (было бы удивительно, если бы оказалось, что степень сродства РНК яйца и зародыша свободно варьирует внутри узких систематических групп). И на очереди такие более доступные объекты, как морские черви и моллюски, а из позвоночных — птицы. Мы можем только выдвигать более или менее вероятные предположения. Одно из них состоит в том, что общие закономерности молекулярных механизмов развития должны быть одинаковыми у всех животных, а у рыб и амфибий безусловно. Второе заключается в том, что многие белки, например, гистоны или некоторые ферменты, в равной степени синтезируются в оогенезе и на поздних стадиях развития и, следовательно, их синтез определяется активностью тех же генов. Иными словами, какая-то часть последовательностей РНК должна быть общей на всех стадиях оогенеза и развития.

Тот факт, что эти общие последовательности не улавливаются в опытах на амфибиях, указывает на то, что они составляют небольшую по объему или уникальную часть генов, не обнаруживаемую теми методами гибридизации, которые употребляли до последнего времени. Усовершенствование методов гибридизации, позволяющее работать с уникальными последовательностями, в ближайшие годы позволит получить новые факты, которые заполнят этот разрыв. Как уже было сказано выше, предполагается, что значительная часть повторов играет какую-то служебную роль, и данные о гибридизации указывают на возможные функциональные различия между разными, даже не очень далекими группами животных.

В работе Ю. А. Рачкуса и др. (1969б) (см. рис. 33) было показано, что РНК вьюна, меченная на стадии гастролы, заметно лучше конкурирует с РНК из неоплодотворенного яйца, чем с

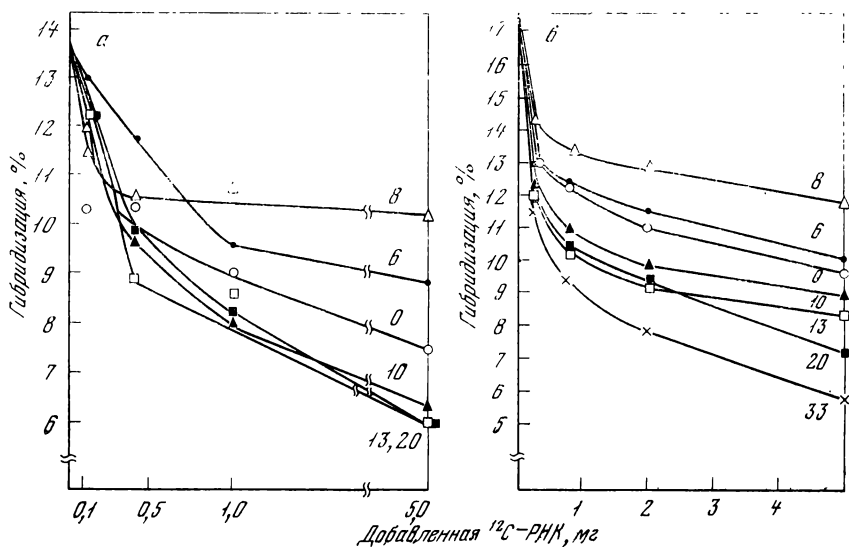


Рис. 33. Изменения состава РНК в эмбриональном развитии вьюна

^{14}C -РНК получали на стадии 13 час. (гастрюляция; а) или на стадии 33 час. (поздний органогенез; б) и гибридизовали с ДНК в присутствии немеченых РНК, взятых из неоплодотворенного яйца, и стадий 6 и 8 час. (бластулы), 10 и 13 час. (гастрюляция), 20 и 33 час. (органогенез). В период раннего развития (от 0 до 8 час.) зародыш теряет часть видов РНК, запасенных в оогенезе, а затем разнообразие этих видов РНК в развитии возрастает (Рачкус и др., 1969)

РНК на стадиях средней — поздней бластулы (стадия 6 и 8 час.). Иными словами, в ходе самого раннего развития, когда мРНК практически не синтезируется (0—6 час.) или синтез только начинается (6—8 час.), уменьшается число видов, содержащихся в зародыше РНК. Использование РНК, запасенной в оогенезе в ходе раннего развития, мы уже рассматривали на амфибиях. (В этом отношении рыбы и амфибии оказались похожими.) Далее, однако, на стадиях от 8 до 10 час. наблюдается количественный скачок, когда конкуренция РНК, полученной на стадии 10 час., с РНК, синтезированной на стадии 13 час. или позже, вновь увеличивается, т. е. возрастает число общих видов РНК. Это увеличение отражает происходящий на стадиях 8—10 час. активный синтез РНК, среди которых, очевидно, много тех же последовательностей, что и на более поздних стадиях.

Далее наблюдается картина, описанная для амфибий, — по мере развития возрастает число видов РНК, причем не столько за счет замены активных ранее генов, сколько за счет добавления новых. По стадиям развития увеличение числа активных генов совпадает с прогрессирующей дифференцировкой зародыша и, очевидно, в значительной степени определяется увеличением чис-

да клеточных типов, а не только ростом разнообразия активных генов в каждой клетке.

Дополнительные данные дает раздельный анализ угла наклона кривых конкуренции и высоты плато, т. е. уровня конкуренции (процента гибридизации, который уже не может быть уменьшен дальнейшим добавлением меченой РНК). В ходе развития уровень плато становится все ниже и ниже, т. е. все большее число видов РНК становится таким же, как на поздних стадиях, т. е. активизируется все большее число генов. Угол наклона этих кривых также становится все круче и круче. Это означает, что требуется все меньшее количество конкурирующих молекул, чтобы заметно снизить гибридизацию молекул меченых. Это означает, что по мере с возрастанием числа видов РНК число копий каждого вида увеличивается. Этот вывод также хорошо согласуется с тем, что разнообразие РНК во многом достигается за счет разнообразия типов клеток. Количество копий многих видов РНК может быть в этих случаях совсем небольшим, так как многие клеточные типы представлены в зародыше очень небольшим числом клеток, составляющим доли процента от всех клеток. Эти виды РНК, вероятно, просто не улавливаются.

Сравнение ядерной и цитоплазматической РНК у рыб показало их определенные различия и большую степень повторов в цитоплазматической фракции. Как мы теперь знаем, аналогичные данные были затем получены и на зародышах морского ежа. Эти результаты в какой-то мере могут объясняться значительной транскрипцией мРНК гистонов, кодируемых повторяющимися генами.

Млекопитающие

Эмбрионы млекопитающих являются чрезвычайно трудным объектом для проведения молекулярно-эмбриологических исследований. В работе Черча по молекулярной гибридизации эта трудность была преодолена тем, что вместо получения меченой РНК из зародышей использовали высокомеченую ДНК из клеточных культур (Church, Brown, 1972; Brown, Church, 1971, 1972). Использование высокомеченой ДНК и продолжительная (до двух недель) гибридизация в растворе позволили авторам раздельно исследовать повторяющиеся и уникальные последовательности и использовать в качестве объекта не только постэмбриональное, но и эмбриональное развитие мыши. И хотя использование такого дефицитного в количественном отношении материала, как эмбрионы мыши, сильно ограничило дробность исследуемых стадий, данные Черча и Брауна дали совершенно новую информацию о характере транскрипции генов в развитии (см. Church, Brown, 1972; Church, Schultz, 1974).

Геном мыши на 5–10% представлен сателлитной, высокоповторяющейся ($\times 10^6$ раз) ДНК, состоящей в основном из АТ-последовательностей и локализованной преимущественно в области

центромеров и концевых участков хромосом (Pardue, Gall, 1970). Эта ДНК, вероятно, никогда не транскрибируется. 25—30% генома составляют промежуточные повторы (10^4 — 10^5). При обычных методах гибридизации (на фильтрах, с отжигом в течение 1—2 дней) исследуется состав РНК, транскрибированных только с этой повторяющейся части генома. И, наконец, 65% ДНК составляют уникальные последовательности (гены), транскрипция которых в развитии представляет особый интерес и исследование которых начато в последние годы.

Данные о конкурентной гибридизации РНК из разных тканей взрослого организма привели к уже известным результатам — приблизительно 50% считываемых повторяющихся последовательностей ДНК оказалось общими для таких разных тканей, как мозг и печень или печень и почки, в то время как остальные 50% являются тканеспецифичными. Если считываемые повторы представляют только регуляторные участки ДНК, то очевидно, что активация их дифференциальна на 50% в разных тканях и их участие в развитии представляет определенный интерес. Поэтому данные о конкурентной гибридизации РНК с ДНК, полученные на морских ежах, рыбах и амфибиях, не потеряют своего значения и после того, как их дополнят исследования активности уникальных генов.

В ходе эмбрионального развития мыши, как показали Черч и Браун (Church, Brown, 1972), уровень гибридизации, т. е. доля активных генов для повторяющихся последовательностей, меняется довольно мало. Доля гибридизации возрастает примерно в два раза (от 2,5 до 5%) в самом раннем развитии от 8—16 клеток до стадии морулы, затем слабо снижается в начале дифференцировки (с четвертого дня к седьмому дню эмбрионального развития) и остается на постоянном уровне — около 4%, что составляет 13—16% от всех повторяющихся, но не сателлитных ДНК. В этом смысле млекопитающие значительно отличаются, например от амфибий, где доля гибридизации повторов возрастает в четыре раза (от 5 до 20%) в ходе развития зародыша и головастика.

В то же время в ходе развития мыши активность уникальных генов изменяется весьма значительно. Для всего организма она остается очень небольшой (около 1%) вплоть до начала дифференцировки (стадия бластоциста, четвертый день эмбриогенеза), но затем быстро увеличивается, достигая в последующие три дня 5%, к двум неделям — 8,5%, а к моменту рождения — почти 10%. Дальнейшие изменения невелики, и, вероятно, общее число активных уникальных последовательностей в целом организме, определяемое таким способом, не превышает 11—12% (рис. 34).

Отношение повторяющихся и уникальных генов резко меняется в ходе эмбрионального развития млекопитающих. До начала видимой дифференцировки оно равно 5 (2,5—5% для повторов и 0,5—1% для уникальных последовательностей), на седьмой

РНК, полученные на разных стадиях развития мыши, гибридизовали с фракциями уникальных (1) и повторяющихся (2) последовательностей меченой ДНК. Транскрипция повторяющихся последовательностей меняется мало, в то время как транскрипция уникальных последовательностей быстро возрастает (Church, Schultz, 1974)

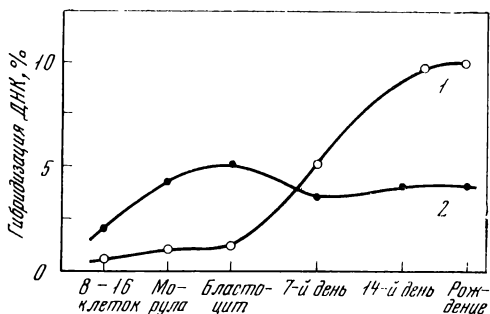


Рис. 34. Соотношение числа видов РНК, транскрибированных с уникальных и повторяющихся последовательностей в эмбриональном развитии мыши

день развития это же соотношение равно 1 (4% для тех и других), а к моменту рождения мышонка падает до 0,4 (4% для повторов, 10% для уникальных последовательностей). Аналогичное явление наблюдалось и при дифференцировке в культуре миобластов цыпленка: в делящихся миобластах транскрибируется больше повторяющихся последовательностей, а при образовании миотрубочек возрастает доля транскрибируемых уникальных последовательностей (Man, Cole, 1974).

Может быть, наиболее ценными в работах Черча и Брауна являются исследования транскрипции уникальных последовательностей в отдельных органах в период зародышевого и постэмбрионального развития. У 14-дневного зародыша морфологическая дифференцировка органов в основном завершена, но в ряде тканей и особенно в мозгу еще продолжается цитодифференцировка. Это находит свое отражение и в кривых гибридизации уникальных последовательностей. В печени эта величина не выходит за пределы 2—4%, в то время как в тканях мозга она поднимается с менее чем 3% у зародыша до 5% у только что родившихся животных и почти до 40% у взрослой мыши. Можно предполагать, что этот рост в основном происходит за счет увеличения разнообразия типов нервных клеток, а не за счет увеличения числа активных генов в каждой из них.

Если для РНК тканей мозга характерно постепенное повышение уровня гибридизации и затем сохранение постоянного высокого уровня, то для других тканей картина иная. Гибридизация РНК печени с уникальными последовательностями ДНК, достигающая у новорожденного мышонка величины 2,5%, в первые две недели составляет 4,5% (почки — 3,5%, селезенка — 3,2%). Однако у взрослого животного все эти величины уменьшаются до 2%. Анализ этой ситуации был произведен Брауном и Черчем методом дополнительной гибридизации.

Из-за того, что в их опытах гибридизация уникальных генов определялась по связыванию меченой ДНК, а не РНК, класси-

ческий прием конкуренции меченой и немеченой РНК был неприменим. Авторы смешивали равные количества РНК из двух источников (двух тканей или на двух стадиях развития) и сравнивали полученный процент гибридизации с суммой процентов связывания ДНК с теми же РНК, но гибридизованными по отдельности. Если процент гибридизации со смесью двух препаратов РНК был равен проценту гибридизации с одним из компонентов (с тем, естественно, который гибридизуется с большим процентом ДНК, чем второй), то это означает, что существует полное перекрытие. Следовательно, в транскрипции более гибридизуемого препарата РНК принимают участие все те последовательности ДНК, которые активны и при синтезе другого, менее гибридизуемого препарата РНК. Так, например, РНК из мозга новорожденного мышонка гибридизуется с 5,2% ДНК, а из мозга взрослого — с 8,2%. Смесь обеих РНК гибридизуется практически так же, как и одна РНК из мозга взрослой мыши, — на 8,4%. Это означает, что во время постэмбрионального развития мозга мыши все гены, активные в момент рождения, остаются активными и далее, но к ним добавляется часть новых генов.

В другом варианте может оказаться, что процент гибридизаций со смесью намного выше, чем с каждым из компонентов в отдельности (в крайнем случае процент гибридизации смеси равен сумме процентов гибридизации каждой из составных частей). Это означает, что перекрытия нет или оно невелико, и большая часть активных последовательностей ДНК в обоих типах клеток различна. Почти так, в частности, оказалось при сравнении РНК, полученных из печени мыши в момент рождения (2,5%) и через 6 недель после него (2%). Смесь равных количеств обеих препаратов РНК гибридизуется с 3,5% ДНК, т. е. в большей мере, чем каждый из компонентов (Church, Brown, 1972). Нетрудно рассчитать, что группа уникальных последовательностей, составляющая 40% от активной части генома печени новорожденной мыши, и 50% у взрослой на этих двух стадиях совпадают, в то время как соответственно 60 и 50% активных генов оказываются различными. Иными словами, в ходе постэмбрионального развития происходит смена более чем половины всех транскрибируемых последовательностей. Такую смену можно объяснить резкой сменой функции печени: у зародыша она играет в основном роль кровотокового органа, а после рождения эта функция постепенно угасает, но ей на смену возникает обычная функция печени — депонирование углеводов, образование желчи и т. д. (в это время процент гибридизации возрастает до 4,5%). У взрослой мыши печень выполняет лишь эту основную функцию, мало сходную с первой.

Однако определенное сходство обнаруживается и при сравнении других органов, например таких далеких, как печень и мозг. У повзрослевшей мыши смесь РНК мозга (5,2%) и печени (2,5%) гибридизуется с 6,5% ДНК, т. е. перекрытие состав-

ляет $6,5 - 5,2 = 1,3\%$. Это означает, что 20% активных последовательностей мозга и более 50% активной части генома печени оказываются общими. Для тех же взрослых органов (РНК мозга — 8,2% ДНК, РНК печени — 2,0%; сумма этих РНК — 8,8%), перекрывание меньше и оно равно $8,8 - 8,2 = 0,6\%$, т. е. общими оказываются только 7,3% активных генов мозга и 30% — активных генов печени. Можно предполагать, что многие общие звенья метаболизма в этих органах остаются одинаковыми. Вероятно, этих данных все же недостаточно, чтобы по ним судить о сходстве или различии в работе генома и сопоставлять его с функцией органа.

Более современный методологический подход был использован в лаборатории Пола, где из полирибосом 14-дневных эмбрионов мыши, мозга и печени взрослых животных выделяли полиА мРНК, синтезировали на ней комплементарную сДНК и изучали кинетику ее гибридизации со своей РНК или РНК других тканей (Young et al., 1976). Авторы нашли, что сложность полиА мРНК в эмбрионах, мозге и печени была равна $7 \cdot 10^8$, $1,5 \cdot 10^{10}$ и $7 \cdot 10^9$ дальтон, что соответствует 0,7%; 1,7% и 0,8% всего генома. Меньшие значения, чем в работе Черча, объясняются, очевидно, тем, что тут исследовали только полирибосомные и только полиА мРНК. В работе также показано, что около половины активных генов (55%) одинаковы в различных тканях (Young et al., 1976).

Можно подвести некоторые итоги исследования состава РНК, синтезируемых в ходе развития организма методами молекулярной гибридизации.

1. На всех исследованных видах показано, что в ходе развития увеличивается число видов РНК, т. е. транскрибируемых последовательностей ДНК, или, что, видимо, то же самое, число активных генов. Неясно, в какой мере это происходит за счет увеличения разнообразия активных генов в пределах каждой клетки, но в основном, очевидно, за счет появления новых клеточных типов.

2. Увеличение достигается главным образом путем добавления новых транскрибируемых последовательностей, но для части их определенно показана смена активных генов, т. е. синтез стадияспецифичных РНК. В наиболее прямой форме это проявляется у амфибий, у которых в оогенезе активны одни, а в эмбриогенезе совсем другие повторяющиеся последовательности. Для морских ежей и рыб, напротив, характерно значительное перекрывание, т. е. активность одних и тех же повторяющихся генов в оогенезе, в эмбриональном и в личиночном развитии.

3. В ходе развития млекопитающих доля активных повторяющихся последовательностей неуклонно снижается за счет значительного роста разнообразия активных уникальных последова-

гельностей. Эта закономерность, вероятно, характерна и для других видов. Показана органоспецифичность и стадийспецифичность для части уникальных последовательностей. Органо- и стадийспецифичность активности части повторяющихся генов, вероятно, указывают на важную и специфичную роль этой части генома в развитии.

4. На всех этапах пути РНК от транскрипции до трансляции происходят ее частичные преобразования и селекция, в результате чего меняется ее состав и, в частности, в ходе раннего развития увеличивается доля повторяющихся последовательностей. На поздних стадиях развития и во взрослом организме, вероятно, справедлива обратная зависимость — уменьшение доли повторов в ходе процессинга и селекции. Повторяющиеся последовательности, представленные в РНК цитоплазмы, на ранних стадиях могут также отражать высокую интенсивность транскрипции и трансляции повторяющихся гистоновых генов.

5. Метод молекулярной гибридизации, несмотря на ряд ограничений в интерпретации полученных с его помощью данных, уже привел к установлению определенных, хотя и не слишком неожиданных зависимостей. Дальнейший прогресс в этой области возможен при раздельном исследовании уникальных и повторяющихся последовательностей как на целых зародышах, так и на гомогенных популяциях клеток одного типа.

Накопление мРНК специфических белков в специализирующихся клетках

Если при рассмотрении транскрипции на эмбриональных стадиях существующие в настоящее время методы позволяют судить только о разнообразии видов мРНК, то в случае узкоспециализированных клеток речь уже может идти о выявлении транскрипции, накоплении и трансляции индивидуальных мРНК. Эти данные особенно важны, так как позволяют оценить реальное значение для клеточной дифференцировки таких событий, как включение генов или увеличение скорости транскрипции на них, накопление и запасание мРНК и, наконец, эффективность трансляции специфических белков.

До недавнего времени о появлении и времени жизни индивидуальных мРНК можно было судить только косвенно — по синтезу соответствующих белков. В ряде случаев достаточной характеристикой для мРНК является их константа седиментации: 9S РНК в ретикулоцитах соответствует глобиновой мРНК, 9S РНК в зародышах морского сжа — мРНК гистонов (Nemer, 1975), 26S РНК в миобластах наиболее велика и соответствует мРНК для тяжелой цепи миозина (Buckingham et al., 1974a). О содержании специфических мРНК в препаратах можно судить по синтезу соответствующих белков в белоксинтезирующей системе *in vitro* или при инъекции этих РНК в ооцит (см. например,

Levy et al., 1975). Однако в последние годы развит и все шире применяется метод определения количества индивидуальных мРНК путем гибридизации с комплементарными ДНК (сДНК), т. е. с копиями, синтезированными с помощью обратной транскрипции на мРНК. Этот метод оказался намного чувствительнее всех других (O'Malley et al., 1975). В настоящее время известно только несколько моделей специализации клеток, в которых удалось определить число молекул мРНК, кодирующей специфический белок клетки, ответственный за ее дифференцировку.

При помещении линзового эпителия в культуральную среду, содержащую сыворотку, клетки начинают удлиняться и дифференцироваться в линзовые волокна. При этом в них синтезируется дельта-кристаллин (Milstone, Piatigorsky, 1975). На очищенной мРНК (17S) для δ -кристаллинов была синтезирована комплементарная ^3H -ДНК, с помощью которой было определено количество молекул мРНК δ -кристаллина в клетках линзового эпителия по мере его дифференцировки в линзовые волокна (Milstone et al., 1976).

Исходные клетки эпителия содержат около 6 тыс. молекул кристаллиновой мРНК на клетку, и через 5 час. после начала стимуляции дифференцировки это количество не изменяется. Зато в последующие 19 час. оно возрастает почти в три раза. Судя по тому, что при этом количество указанной мРНК и в ядрах возрастает в несколько раз, увеличение числа матриц является результатом усиления их транскрипции.

В линзе цыпленка клетки эпителия содержат по 12 тыс. молекул мРНК δ -кристаллина, а клетки волокон — в 4 раза больше (Milstone et al., 1976).

Другим примером дифференцировки, где удалось измерить число молекул мРНК, является стимуляция синтеза овальбумина в железистых клетках яйцевода молодых цыплят после инъекции им эстрадиола. При ежедневной инъекции гормона у цыплят происходит дифференцировка железистых клеток яйцевода, в ходе которой количество мРНК, определяемое по гибридизации с сДНК, возрастает за 18 дней от нуля до 50 тыс. молекул на клетку (клетки яйцевода взрослой курицы содержат по 140 тыс. молекул). После прекращения введения эстрадиола цыплятам количество специфических мРНК у них снова уменьшается до нуля. Однако повторное введение эстрадиола приводит к появлению первых молекул мРНК овальбумина уже через 30 мин. (O'Malley et al., 1975). Через 3 часа их уже 1000, а через сутки 4000.

Пальмитер (Palmiter, 1975) приводит несколько иные цифры: при вторичной индукции через 4 сут. количество мРНК овальбумина достигает 70 тыс., в то время как у взрослых кур-несушек их 101 тыс. на клетку. По его данным, стабильное состояние, которое достигается на 5-й день, соответствует синтезу (и распаду) 34 молекул мРНК овальбумина в минуту на клетку и продолжительность времени полужизни этих мРНК — 24 часа.

Очевидно, что количество каждого вида мРНК в клетке определяется соотношением скоростей их синтеза и распада. По в начале дифференцировки, когда мРНК данного вида в клетках еще мало, скорость синтеза превышает скорость распада, которая является функцией числа молекул. Накопление числа молекул мРНК продолжается, очевидно, до тех пор, пока обе величины не сравняются, и число молекул, распадающихся за единицу времени, будет равно числу синтезирующихся. Однако стабилизация мРНК, которая может происходить на определенном этапе дифференцировки, нарушает это равновесие и приводит к новому повышению числа молекул мРНК в клетке. Такого рода стабилизация, т. е. увеличение времени полураспада мРНК, была описана в ряде случаев — для кристаллинов (Yoshida, Katoh, 1972) и для миозина (Buckingham et al., 1974a).

ПРОЦЕССИНГ РНК И ТРАНСПОРТ РНК В ЦИТОПЛАЗМУ

Механизмы расщепления и избирательной дегградации частей гигантских молекул РНК (созревание, процессинг) и механизмы селекции и выхода РНК после процессинга в цитоплазму известны недостаточно. Очевидно, что в них участвуют информоферные белки Георгиева, образующие в ядрах РНП-комплексы, и специфические рибонуклеазы и метилазы. Участие белков не снимает, однако, проблемы опознавания различных последовательностей РНК, определяющих точки расщепления или метилирования, выбор деградирующих отрезков и селекцию при выходе из ядра. В последнее время это связывают с полиУ и полиА последовательностями, созданием вторичной структуры РНК и в частности с образованием «шпилек» — петель, стабилизированных водородными связями между комплементарными нуклеотидами. Вполне вероятно, что этапы процессинга гигантских молекул РНК и выхода мРНК из ядра представляют собой единый процесс, в котором каждое последующее звено — метилирование, расщепление, дегградация, полиаденилирование, селекция и выход — однозначно определяется предыдущим. Поэтому разделение всего процесса на два — процессинг и транспорт — может оказаться чисто условным. На основании того материала, который сейчас известен для дифференцирующихся клеток, в качестве процессинга можно рассматривать все посттранскрипционные изменения, т. е. все сведения об уменьшении молекулярного веса РНК после синтеза, ее метилировании и вообще об отличиях транскрибированной РНК от транслируемой РНК.

Наиболее подробно ход процессинга описан только для рРНК, где это явление состоит из последовательных процессов метилирования гигантского предшественника, отщепления и дегградации «лишних» фрагментов, после чего остаются 28S РНК и 18S РНК,

собственно и составляющие высокополимерные РНК рибосом. Предполагается, что точки метилирования определяются первичной структурой РНК, а метилированные нуклеотиды, в свою очередь, защищают фрагменты 28S и 18S рРНК при отщеплении «лишних» последовательностей от предшественника. Оба этапа осуществляются с помощью ферментов — метилаз и нуклеаз. Для метилаз, в основном, на примере избирательного метилирования ДНК прокариот, известно, что они способны «узнавать» определенные основания (цитозин, аденин и др.), отличающиеся от таких же оснований тем, что граничат с другими нуклеотидами (см. Богданов и Леднева, 1975; Murray, 1975). Расщепление и деградация РНК происходят с помощью специфических эндо- и экзонуклеаз, относительно избирательности действия которых известно пока намного меньше.

О процессинге информационных РНК известно немного. В ядрах синтезируются большие молекулы предшественника — про-мРНК, а в цитоплазму попадают намного меньшие молекулы мРНК, размеры которых, например, в случае глобиновой мРНК, составляют 25—50% размера предшественника. Одним из заключительных этапов процессинга является присоединение к будущей мРНК нетранслирующегося фрагмента полиА, содержащего 100—150 адениловых остатков. Данные, полученные для глобиновых про-мРНК, справедливы не для всех мРНК. Например, показано, что матрицы, с которых транслируются гистоны, а также ряд других не содержат полиА-последовательностей. Последним этапом процессинга является присоединение к 5'-концу мРНК «кэп'а» (шапочки), образованной 7-метилгуанозином, который связан с одним или двумя метилированными нуклеотидами через трифосфатную связь: $m^7GpppNmNm$ (Furuichi et al., 1975). Предполагается, что «кэп» служит сигналом для опознавания мРНК специфическим центром на рибосоме и образования иницирующего комплекса (Hickey et al., 1976).

Процессинг информационных РНК

О процессинге гетерогенной высокомолекулярной (информационной) РНК могут свидетельствовать данные о различиях состава РНК в ядрах и цитоплазме. Однако нельзя исключить того, что часть ядерных РНК не является предшественниками мРНК. Различия между ядерными РНК и цитоплазматическими мРНК видны в характере их распределения по размерам, в относительном содержании повторяющихся последовательностей и, наконец, в степени разнообразия, т. е. в том, сколько видов последовательностей и каким числом копий представлены обе популяции.

Сравнение распределения ядерных и цитоплазматических РНК в сахарозном градиенте уже по их оптической плотности, т. е. по количественному содержанию, показывает существование тяжелых РНК (>28S), которых практически нет в цитоплазме. Эти

отличия особенно заметны, если сравнивать меченые, т. е. вновь синтезированные, РНК. У зародышей вьюна на стадии гастрюлы в ядрах значительная часть метки лежит в области 30—60S, в то время как в цитоплазме бóльшая часть меченой РНК седиментирует в области 2—14S, с пиком на 8—10S (Рачкус и др., 1971). Очевидно, что процессинг большей части мРНК состоит в уменьшении про-мРНК с 30—50S до 8—10S мРНК, т. е. приблизительно в 15—25 раз. У зародышей морского ежа эти отличия, по-видимому, меньше — РНК в ядрах имеет размер в 0,5—3 млн. дальтон, а в цитоплазме от 100 тыс. до 2 млн. дальтон (Kung, 1974). Автор предполагает, что в эволюции по мере роста организации возрастает и размер ядерных РНК и, следовательно, степень деградации про-мРНК в ходе процессинга.

Сравнение гибридизации этих РНК с ДНК показывает, что ядерные РНК содержат не более 20% повторяющихся последовательностей, в то время как цитоплазматические РНК на этих ранних стадиях гибридизуются на 40—50%, т. е. содержат значительное число повторов. Позже, во время органогенеза, различие между ядерными и цитоплазматическими РНК уменьшается и число повторов в ядерных РНК падает до 15%, а в цитоплазме до 8—12% (Рачкус и др., 1969а). Можно предполагать, что в ходе развития характер процессинга несколько меняется и на поздних стадиях в цитоплазму выходит большее число уникальных последовательностей, чем на ранних. РНК, транскрибированная с повторяющихся последовательностей, найдена недавно и в цитоплазме эмбриональных клеток зародыша лягушки (Dobner, Flickinger, 1976).

В аналогичных экспериментах на стадиях бластулы и гастрюлы морского ежа (Вольфсон, Воробьев, 1972) также было показано, что на последовательных этапах посттранскрипционных превращений доля повторяющихся (гибридизуемых) последовательностей постепенно возрастает. Для хромосомно-ядрышковой РНК эта величина составляла 21%, для тотальной ядерной — 35, для тотальной РНК цитоплазмы — 57 и для полирибосомной мРНК — 60%. Особенно интересны различия между хромосомно-ядрышковой (новотранскрибированной, экстрагируемой горячим фенолом) РНК и общей РНК ядер, включавшей еще и легко экстрагируемую фракцию. Из этих данных следует, что повышение доли повторов создается именно на пути превращений и селекции первоначальных транскриптов в РНК цитоплазмы.

По мере процессинга, как было показано в этой же работе (Вольфсон, 1972; Вольфсон, Воробьев, 1972), увеличиваются стадиоспецифические различия: если хромосомно-ядрышковые (не прошедшие процессинга) РНК на стадиях бластулы и гастрюлы почти не отличаются друг от друга по конкурентной гибридизации, то для цитоплазматических РНК эти отличия довольно велики. Более вероятно, что стадиоспецифические отличия не создаются в ходе процессинга и селекции, а лишь выявляются бла-

годаря этим явлениям: одинаковые фрагменты РНК деградируют в ядрах, а в цитоплазму выходит небольшая часть РНК, которая содержит последовательности, характерные для разных стадий развития.

Изменение характера процессинга или, точнее, доли ядерных РНК, распадающихся в ходе развития морского ежа, было показано и при сравнении интенсивности синтеза РНК в ядрах и доли РНК, выходящей в цитоплазму на последовательных стадиях от дробления до плутеуса (Kijima, Wilt, 1969). Если скорость синтеза РНК в расчете на зародыш все время возрастает, то в расчете на ядро она уменьшается. В период от стадии ранней бластулы до стадии гастрюлы скорость синтеза на ядро уменьшается в пять раз. В то же время выход РНК в цитоплазму за это время даже увеличивается. Следовательно, доля РНК, распадающейся в ядрах, особенно велика в начале развития и процент выходящей в цитоплазму РНК по мере развития вырастает в несколько раз. Эти данные не позволяют, однако, решить: идет ли речь о том, что на ранних стадиях развития деградации подвергаются большие участки про-мРНК или, что вероятнее, большая доля ядерных РНК распадается целиком.

Сравнение уникальных последовательностей РНК на стадии гастрюлы у морского ежа показало, что в ядрах содержится в 10 раз больше видов последовательностей, чем в мРНК полирибосом цитоплазмы. И в данном случае трудно решить, какая часть этого избытка видов ядерной РНК содержится в деградируемых фрагментах про-мРНК, а какая — в специфически ядерных РНК, деградирующих целиком (Kijima, Wilt, 1969).

Одним из немногих примеров, где исследовали процессинг индивидуальной про-мРНК, является глобиновая мРНК в эритропоэтических клетках. Первоначально для размера про-мРНК глобина были получены очень высокие значения порядка 60S (Gasarian, Andreeva, 1972). Это означало, что в ходе процессинга до мРНК размером 9—10S деградирует около 97% первоначально транскрибированной последовательности. Недавно было показано, что действительный размер предшественника мРНК составляет около 14S (не превышает 18S). Отсюда следует, что в ходе процессинга глобиновой про-мРНК деградирует 60—75% молекулы предшественника (Ross, 1976). Следовательно, в ходе терминальной дифференцировки происходит процесс, как бы обратный тому, что наблюдается в начале развития — доля РНК, распадающихся в ядре и не выходящих в цитоплазму, по мере дифференцировки увеличивается.

Большие различия в числе видов РНК («сложности» РНК) в ядрах и на полирибосомах и значительное количество РНК, целиком распадающихся в ядрах, выдвигают вопрос о роли процессинга и селекции в регуляции синтеза белка. Возможно, в ядре транскрибируется большее число видов или копий про-мРНК, чем количество видов и копий мРНК, выходящих в цитоплазму. Если

бы это предположение оказалось верным, роль процессинга состояла бы не просто в преобразовании про-мРНК в мРНК, но и в отборе видов про-мРНК и определении их доли, подвергающейся процессингу. Тогда процессинг мог бы рассматриваться как новое звено регуляции, существенно влияющее не только на скорость выхода, но и на состав мРНК в клетке и на их количество. Этот вопрос, очевидно, решится тогда, когда будут выяснены состав ядерных РНК, их функция и механизмы их дегградации.

Полиаденилирование

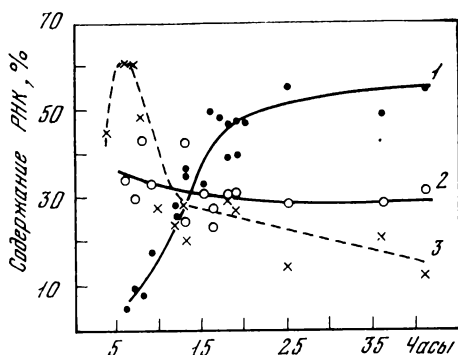
Заключительным этапом процессинга является полиаденилирование. После его открытия предполагалось, что полиА-фрагменты содержат все мРНК. Относительная простота определения и выделения полиА-содержащих молекул (на колонке целлюлозы, связанной с полиУ- или олиго-dT-последовательностями), казалось бы, обеспечивала надежный метод определения мРНК. Однако оказалось, что мРНК гистонов не содержат полиА-фрагментов, а затем было найдено, что доля мРНК, уже транслирующихся на полисомах и лишенных полиА, также может быть значительной (Nemer, 1975; Fromson, Verma, 1976; Sonenshein et al., 1976).

Выше уже говорилось, что в ходе оогенеза полиаденилированию подвергаются не все мРНК, и значительная их часть в яйцах морского ежа аденилируется в цитоплазме уже после оплодотворения (Wilt, 1973; Slater, Slater, 1974) или активации яиц (Wilt, Mazia, 1974). Это явление, однако, не было обнаружено у эмбрионов млекопитающих (Schultz, 1975), хотя в культуре опухолевых клеток у них показано, что достраивание полиА-фрагмента может происходить и в цитоплазме (Brawerman, Diez, 1975).

В ходе эмбрионального развития доля полиА-содержащих мРНК, транслирующихся на полирибосомах, меняется; у зародышей моллюска *Styanassa*, например, она падает по мере развития (Collier, 1975). По данным Немера, у зародышей морского ежа на самых ранних стадиях 60% всех матриц составляют гистоновые (не содержащие полиА) мРНК, а среди остальных только около 10% мРНК содержат полиА-фрагменты. На стадии выклева (средняя бластула) количество гистоновых мРНК и в цитоплазме снижается и их место замещают полиА-содержащие мРНК, доля которых далее возрастает. Не содержащие полиА негистоновые мРНК на всем исследованном протяжении развития (до раннего плютеуса) составляют около 30% всех мРНК (Nemer, 1975) (рис. 35). Немер установил также, что лишенные полиА мРНК способны связывать меньше рибосом в полисоме, чем мРНК, содержащие полиА-фрагменты. И, наконец, принципиально важным является то, что мРНК, содержащие полиА, почти не конкурируют с мРНК, лишенными полиА, за место на ДНК, т. е. коди-

Рис. 35. Относительное содержание полиА мРНК в развитии морского ежа

Зародышей морского ежа на разных стадиях развития инкубировали 1 час. с ^3H -уридином и из полирибосом выделяли мРНК. По способности связываться с олиго(dT)-целлюлозой мРНК фракционировали на (+ полиА) мРНК, содержащую фрагмент полиА (1); (- полиА) мРНК, неполиаденированную (2) и из нее 9S гистоновые мРНК (3). Относительное содержание этих фракций в эмбриогенезе меняется (Nemer, 1975)



руют различные белки (Nemer, 1975). Это заключение подтвердилось в последующей работе, где было показано, что на стадии мезенхимной бластулы морского ежа полиА-содержащие и лишённые полиА мРНК имеют одинаковое распределение по размерам (с максимумом 26S), одинаково распределяются в системе *in vitro*, но различаются по составу кодируемых ими белков (Fromson, Verma, 1976). Различия между ядерными высокополимерными РНК в отношении длины полиА-фрагмента позволили разделить их на три класса: α — содержащие олигоА-фрагмент (25н.), β — с длинными полиА-фрагментами (175н.) и γ — лишённые полиА и олигоА-фрагменты. По мере развития содержание класса γ уменьшается (ранняя бластула — 76%, мезенхимная — 63%), а α и особенно β возрастают (Dubroff, Nemer, 1976).

Таким образом, на заключительном этапе процессинга — полиаденировании — осуществляется некоторая сортировка промРНК, в результате которой одни виды матриц получают полиА-фрагменты, а другие нет. В дальнейшем это возможно сказывается на эффективности трансляции (Sonenshein et al., 1976) и на продолжительности жизни мРНК.

Процессинг рибосомных РНК

Сложная и последовательная картина расщепления и распада гигантских РНК была прежде всего и наиболее полно изучена на рРНК млекопитающих, когда из предшественника с молекулярным весом в 4,2 млн дальтон (45S) остаются две молекулы с молекулярным весом 1,5 млн (28S) и $0,75 \cdot 10^6$ дальтон (18S), а остальные отрезки деградируют еще в ядрышке. У многих эукариот этот процесс менее сложен, предшественник имеет меньший вес — около 3 млн. дальтон (39—40S), и в результате процессинга деградирует не 50%, а только 20% первоначально транскрибированной молекулы (Perry et al., 1970).

У червя *Urechis* предшественник рРНК имеет размер — 38S. Он быстро процессирует до 30S и в таком виде мигрирует из фибриллярной части ядрышка в гранулярный кортекс, где затем медленно превращается в зрелые рРНК (Das et al., 1970).

У морского ежа предшественник рРНК еще меньше — 33S (молярный вес $2,6 \cdot 10^6$) и в ходе процессинга распадается сначала на 28S и 18S, а затем 28S отщепляет еще один фрагмент и превращается в зрелую рРНК — 26S. Этот второй этап процессинга происходит значительно медленнее, чем первый (Sconzo et al., 1971).

Противоречие между данными Гвидиче и данными Эмерсона и Гемфри о начале синтеза рРНК казалось возможным объяснить за счет задержки процессинга, т. е. тем, что синтез пр-рРНК начинается у морского ежа уже на стадии бластулы, а образование зрелых рРНК и их включение в рибосомы — только на стадии гастролы. Действительно, синтез тяжелых РНК был обнаружен и на стадии бластулы и на стадии гастролы (Giudice, Muto, 1969). Однако показать, что среди этих РНК на стадии бластулы действительно есть предшественник рРНК, не удалось (Giudice, 1973).

Изменение в скорости процессинга в ходе развития морского ежа все же обнаруживается. Так как освобождение 18S РНК происходит уже на первом этапе процессинга, то в цитоплазме меченые 18S РНК появляются раньше, чем 26S рРНК, и молярное отношение между ними в первые часы не равно единице. Оказалось, что эти различия, т. е. задержка выхода 26S рРНК, выше на стадии гастролы, чем на стадии призмы (Giudice, Muto, 1967).

Скорость процессинга оказывается различной не только на разных стадиях развития, но в разных частях зародыша. Так, при разделении раннего зародыша на макро-, микро- и мезомеры и их длительном выращивании в виде агрегатов (Hynes et al., 1972b) отношение радиоактивности 26S рРНК к 18S рРНК через 4 часа инкубации на стадии, эквивалентной стадии ранней гастролы, было 0,25 для мезомеров и 0,51 для микромеров. На более поздней стадии, эквивалентной раннему плутеусу, эти отношения возрастают до 1,45 и 1,22 соответственно, но все еще не становятся пропорциональными отношениям молекулярных весов 26S и 18S рРНК, т. е. 2,0.

У зародышей форели скорость процессинга замедляется, если бластомеру выращивать изолированно от желтка. После инкубации с мечеными предшественниками в течение 20 час при 4° в целых яйцах большая часть метки оказывается над пиками 28S и 18S, а в изолированной бластомере она все еще преимущественно находится в области предшественника (40S) (Мельникова и др., 1972).

Можно было бы думать, что задержка процессинга связана в этом случае с нехваткой донора метильных групп — метионина.

Такой механизм задержки был обнаружен при инкубации изолированных слюнных желез дрозофилы (Greenberg, 1969). Однако добавление метионина к среде культивирования бластодермы форели не повысило скорости процессинга (Мельникова и др., 1972).

У амфибий выход 18S рРНК в цитоплазму в эмбриональном развитии также опережает выход 28S рРНК. При культивировании диссоциированных клеток с H_3 -уридином на разных стадиях развития было показано, что молярное отношение 18S рРНК и 28S рРНК на стадиях ранней гаструлы составляет 1,1—1,2 и лишь у головастика снижается до 1,0; у взрослых животных даже до 0,9 (Abe, Yamana, 1971).

В ходе раннего развития млекопитающих синтез и процессинг рРНК осуществляются достаточно быстро и зрелые молекулы 28S и 18S рРНК обнаруживаются на стадии 4 и даже 2 бластомеров (Knowland, Graham, 1972). На стадии бластулы мыши (4-дневный зародыш) после 30 мин. инкубации с 3H -уридином почти вся метка наблюдается в области тяжелого предшественника, но уже через 60 мин. она находится преимущественно над 28S и 18S пиками рРНК (Pikó, 1970, 1975). Однако подробного сравнения скорости процессинга на разных стадиях раннего развития млекопитающих не производили.

На более поздней стадии эмбрионального развития мыши процессинг рРНК в дифференцирующихся клетках эритроидного ряда исследовали в желточном мешке 10- и 13-дневных эмбрионов (Fantoni et al., 1972). Авторы показали, что, хотя скорость синтеза про-рРНК в эритроблестах у ранних зародышей намного выше, процессинг у них идет иначе. Образование 28S рРНК у ранних зародышей задержано, а 18S рРНК, выходя в цитоплазму, распадается в ней. На более поздней стадии (13 дней) практически вся про-рРНК проходит процессинг и образует зрелые 28S и 18S рРНК.

Наконец, в дифференцирующихся клетках линзы процессинг предшественника рРНК проходит различно в стабильно дифференцированных клетках эпителия линзы и линзовых волокон и в делящихся и дифференцирующихся клетках экваториальной зоны, где клетки пролиферируют и превращаются в линзовые волокна. В дифференцированных клетках синтезируется про-рРНК — 45S и происходит первый этап ее превращения в молекулы 30S. Однако зрелые рРНК — 28S и 18S — в этих клетках почти не образуются. В то же время в той зоне линзового эпителия, где клетки делятся и, удлиняясь, превращаются в линзовые волокна, происходит быстрый процессинг про-рРНК в 28S и 18S рРНК (Parasconstantinou, Yulku, 1968).

Таким образом, в разных группах животных процессинг рРНК является процессом, если не регулирующим, то во всяком случае зависимым от стадии развития и характера дифференцировки.

Имеющиеся в литературе данные о процессинге про-тРНК в основном относятся к прокариотам. Тем не менее на культуре тканевой млекопитающих обнаружен предшественник тРНК (про-тРНК) размером 4,5S. В ходе процессинга про-тРНК происходит отщепление нуклеотидов с 5'- и 3'-концов и последующее метилирование (Altman, 1971; 1975; Burdon, 1971). В отсутствие источника метильных групп — метионина — задерживается и созревание про-тРНК (Bernhardt, Darnell, 1969).

В нашей работе (Соловьева и др., 1973б, Timofeeva, Solovjeva, 1973) синтез и процессинг тРНК были исследованы на ранних стадиях развития вьюна. Инкубирование зародышей с $^{14}\text{CO}_2$ или бластодермы с ^3H -уридином или ^3H -цитидином на стадии 6 час. (средняя бластула) и позже дало хорошее включение в пик 4S, т. е. показало, что на этих стадиях синтез тРНК уже достаточно интенсивен. Однако при инкубации с меченым предшественником более ранних зародышей (4—5 час., ранняя бластула) было обнаружено не сильное, но отчетливое включение в области, сдвинутой от пика 4S в более тяжелую сторону. При актиномициновом чейзе в течение 2,5 часа вся метка перемещается в область 4S, т. е. про-тРНК проходят медленный процессинг в зрелые тРНК. Метилирование тРНК с помощью метильной группы метионина активно происходит на стадии 6 час. и позже. При этом метилируется не только 4S РНК, но и более крупные молекулы (тяжелое плечо 4S пика). Активность метилаз в экстракте бластодермы вьюна на стадиях морула — бластула очень не велика, но возрастает к стадии гастрюлы (Остерман и др., 1974).

Все эти данные показывают, что у зародышей вьюна уже на стадии ранней бластулы (4 часа) еще до начала активного синтеза мРНК (6 час.) начинается синтез про-тРНК, однако, на этих стадиях замедлен ее процессинг. Активация процессинга происходит позже — на стадии 6 час. На этой стадии синтез тРНК усиливается, а относительная доля включения в область про-тРНК сильно уменьшается (Соловьева и др., 1973б).

Таким образом, в образовании тРНК в раннем развитии вьюна можно различать два несколько сдвинутых по времени процесса — активация синтеза про-тРНК и активация ее процессинга. Вероятно, так же как в процессинге рРНК, частичное метилирование необходимо для начала процессинга. Однако после активации процесса отщепления «лишних» нуклеотидов и достижения молекулой тРНК окончательных размеров (4S) происходит ее дальнейшее метилирование, обеспечивающее создание вторичной структуры.

Заключая этот раздел, можно сказать, что процессинг является таким же характерным для эмбриогенеза, как и для дифференцированных клеток. Он обнаруживается на всех стадиях развития, начиная с самых ранних (морской еж) и кончая тер-

минальными дифференцировками (эритропоэз). Однако роль его в развивающихся системах более сложная. В тканях со стабильным набором активных генов и синтезирующихся белков процессинг является необходимым этапом посттранскрипционных событий, выделяющим из новосинтезированных гигантских молекул РНК функционально способные молекулы РНК цитоплазмы — рРНК, мРНК, тРНК. Вследствие процессинга между синтезом этих РНК и их выходом в цитоплазму проходит некоторое постоянное для каждого вида РНК время.

В дифференцирующихся же клетках процессинг приобретает дополнительную роль — регулирует время протекающих в зародыше событий. Благодаря ему задерживается новообразование рибосом у зародышей морского ежа и млекопитающих и появление новых тРНК у вьюна. Различия в процессинге определяют и разную судьбу РНК в ядрах эритробластов и ретикулоцитов птиц.

У нас пока немного оснований думать, что процессинг играет активную роль, т. е. изменяет время выхода РНК из ядра при постоянном наборе активных генов и таким образом изменяет ход событий, происходящих в цитоплазме. На примере эритропоэза кажется более вероятным, что первичным является изменение набора активных генов, а различный процессинг лишь отражает различия в составе синтезируемых РНК. Однако на ранних стадиях развития замедление процессинга рРНК или тРНК может определяться не первичной структурой их предшественников, а, например, активностью метилаз или нуклеаз.

Так или иначе, очевидно, что данные об особенностях процессинга на разных стадиях и для разных РНК являются необходимым компонентом молекулярной биологии развития.

Транспорт РНК из ядра в цитоплазму

Рассмотрение выхода РНК из ядра в цитоплазму представляет собой трудную и пока в полной мере не решаемую задачу. В клетке одновременно происходят четыре процесса — синтез РНК, распад РНК в ядре, транспорт РНК из ядра в цитоплазму и распад РНК в цитоплазме. О транспорте РНК можно судить по кинетике включения метки в РНК ядра и цитоплазмы. Так как при получении чистых препаратов ядерной РНК неизбежны потери части материала, наряду с определением удельных активностей РНК необходимо независимо установить содержание РНК в ядре и цитоплазме исследуемых клеток.

Для того, чтобы оценить транспорт РНК, необходимо также исключить или учесть дегградацию РНК в ядре и в цитоплазме и синтез новых РНК. Пренебрежение этими процессами вносит ошибку тем большую, чем дольше время эксперимента. При некоторых условиях эту ошибку можно оценить, определив время распада РНК в клетке. Чтобы исключить ошибку, связанную с продолжающимся синтезом РНК, используют «чейз», когда про-

водится минимально короткое мечение РНК и затем прослеживается судьба меченых молекул. Идея таких опытов состоит в том, чтобы после исчезновения меченого предшественника (нуклеозидтрифосфата) из среды синтез РНК продолжался за счет немеченых нуклеозидтрифосфатов, образующих внутренний пул клетки. Тогда изменение локализации метки позволяет проследить судьбу РНК после ее транскрипции.

Для осуществления «чейза» синтез меченых РНК должен быстро смениться синтезом немеченых молекул. Для этого пул предшественников должен быть невелик и быстро обновляться за счет их поступления из среды. Однако клетки зародышей обычно содержат большой запас предшественников, и когда радиоактивные нуклеозиды проникают в клетку, они разводятся во внутреннем пуле. В результате если просто удалить меченый предшественник из среды, синтез меченых РНК продолжается еще значительное время. Даже если меченое соединение в среде заменить большим избытком такого же нерадиоактивного вещества, внутриклеточный радиоактивный пул только разводится, но не исключается совсем.

Полного «чейза» можно достичь только при прекращении, вслед за образованием меченой фракции РНК, всякого ее синтеза, например с помощью актиномицина. Тогда в ходе дальнейшей инкубации удастся проследить за транспортом меченой РНК и даже учесть ее деградацию. Однако серьезное нарушение работы клетки, вызванное блокированием синтеза РНК, не может не сказаться на происходящих в ней процессах. В ряде работ, например, показано замедление транспорта РНК в присутствии актиномицина. Очевидно, по этим причинам до настоящего времени в литературе почти нет работ, в которых был бы проведен полный количественный анализ судьбы транскрибируемой РНК.

Значительные изменения скорости выхода вновь синтезированной РНК из ядра в цитоплазму были установлены Сайном (Singh, 1968) в процессе эмбрионального развития зародышей морского ежа. Сравнивая стадии 18 и 36 час. развития (до начала гастрюляции и на стадии гастрюлы), он показал, что поток быстро меченой РНК из ядра в цитоплазму ускоряется за это время в 10—15 раз. Так как скорость синтеза РНК в расчете на ядро на ранних стадиях выше, чем на поздних (см. Neyfakh, 1971), то медленный выход РНК на ранних стадиях должен был бы означать ее накопление в ядрах в начале развития. Очевидно, однако, что значительное количество синтезированной в ядрах РНК распадается, не выходя в цитоплазму. По некоторым расчетам (Aronson, Wilt, 1969), в цитоплазму выходит только 6% РНК, синтезируемой в ядрах за единицу времени. Судя по тому, что удельная активность ядерной РНК уже через 15 мин. достигает плато и далее остается неизменной несколько часов, среднее время жизни ядерных РНК очень невелико. В то же время в цитоплазму попадают относительно долгоживущие РНК (Aronson,

Wilt, 1969). Выход РНК из ядер в цитоплазму продолжается и при блокированном синтезе белка (Hogan, Gross, 1972). По данным Брандхорста и Хемфри (Brandhorst, Humphreys, 1972) в ядрах зародышей морского ежа распадается 85% всей синтезированной в них РНК и только 15% выходит в цитоплазму и включается в состав полирибосом. По их данным среднее время полураспада ядерных РНК оказывается равным 7 мин., в то время как в цитоплазме половина мРНК распадается за 75 мин.

У зародышей выюна значительный синтез РНК в ядрах обнаруживается со стадии средней бластулы (6 час.). Однако выход РНК в цитоплазму начинается позже — не ранее 8 час., т. е. незадолго перед гастрюляцией (Neufakh et al., 1972). Кинетика выхода РНК из ядер в цитоплазму у более поздних зародышей выюна достаточно сложна. В первый час в цитоплазме оказывается около 30% всей меченой РНК. В последующие часы выход ранее синтезированной РНК продолжается, так что определенная доля РНК выходит из ядер даже через 5—6 час. после синтеза.

Пока нет данных о том, изменяется ли состав РНК, выходящих в цитоплазму, в зависимости от времени их пребывания в ядре. Но очевидно, что в раннем развитии скорость выхода РНК в цитоплазму является дополнительным фактором регуляции синтеза белка на вновь образованных матрицах. В первую очередь это можно сказать о регуляции интенсивности синтеза белка, но, вероятно, это же относится и к регуляции порядка трансляции матриц, кодирующих разные белки.

Миграция ядерных РНК во время митоза

Поведение РНК во время митоза такая же существенная его часть, как и поведение хромосом, ядрышка, белков веретена и т. д. Однако до последнего времени судьба ядерной РНК во время митоза почти не рассматривалась в литературе. Несколько большее внимание привлекала к себе судьба ядрышка — его растворение на стадии ранней профазы и видимое с помощью методов классической гистологии «размазывание» вдоль спирализующихся хромосом. Судьба ядерной РНК после растворения ядерной оболочки интересна не только для специалистов по митозу. Не меньший интерес она представляет для специалистов, интересующихся общей проблемой посттранскрипционных изменений РНК — механизмов процессинга и выхода РНК из ядра в цитоплазму. Митоз в этом смысле представляет собой уникальный природный эксперимент для изучения взаимоотношений хроматина и РНК в ядре. Действительно, деление клетки эукариот является событием, резко нарушающим нормальную клеточную структуру и взаимоотношение ее элементов; спирализация хромосом, деградация ядерной мембраны, смешивание кариоплазмы с цитоплазмой и тем самым стирание всех различий в их хими-

ческом составе, прекращение синтеза РНК и значительное ослабление синтеза белка — все это является как бы платой за возможность размножения клеток. Не случайно при многих далеко зашедших клеточных дифференцировках, таких как образование нервных клеток, эритроцитов, остеоцитов и т. д., митоз становится несовместимым с сохранением нормальной структуры клеток.

Вслед за делением ядра и цитоплазмы митоз завершается восстановлением нарушенной организации клетки и нормальных клеточных функций — деспирализацией хромосом, образованием ядрышка и ядерной мембраны, возобновлением синтеза РНК и т. д. При этом, естественно, восстанавливаются и различия в химическом составе ядра и цитоплазмы. Сейчас, когда много известно о различиях ядерных и цитоплазматических РНК, проблема восстановления нормального распределения в полной мере относится и к этому виду макромолекул.

Для ядерных РНК во время митоза существуют три возможности: 1) ядерные РНК остаются связанными с хромосомами; в пользу такой возможности говорят наблюдения над судьбой ядрышка и некоторые биохимические данные (см. Ченцов, 1966); 2) ядерные РНК смешиваются с цитоплазмой и остаются в ней. Митоз, таким образом, как бы ускоряет естественный выход РНК, но зато возникает проблема судьбы тех гигантских молекул РНК, которые были синтезированы непосредственно перед митозом и к его началу еще не успели пройти процессинга. Ядерные РНК должны очевидно синтезироваться заново уже в ядрах дочерних клеток; 3) значительная часть ядерных РНК на время митоза входит в цитоплазму и распределяется по всей клетке, но после образования ядер дочерних клеток возвращается в эти ядра, восстанавливая тем самым нормальное распределение РНК в клетке. Наши данные показали, что именно эта возможность, очевидно, ближе всего к истинному положению вещей (Нейфах, 1970).

Авторадиографические данные многих авторов показали, что в начале митоза вся или почти вся вновь синтезированная РНК покидает область ядра и распределяется по цитоплазме. Например, Гоулд (Gould, 1969b) отмечает, что в меченых урцидном метафазных клетках зародыша *Urechis* вся метка распределяется по клетке. Автор предполагает, что затем эта РНК распадается в цитоплазме.

Мнение о выходе ядерных РНК во время митоза не разделялось в первую очередь теми исследователями, которые ставили своей задачей изоляцию хромосом и определение их химического состава. В зависимости от метода выделения в изолированных хромосомах наряду с ДНК и белком обнаруживалось большее или меньшее количество РНК, в том числе и меченой (если клетки перед митозом инкубировались с радиоактивным предшественником). Так, в одной из работ такого рода (Fan, Penman, 1971) показано, что с изолированными хромосомами связана значительная часть всей меченой РНК. Вместе с тем очевидно, что

хромосомы способны адсорбировать РНК во время их выделения. Это особенно четко показано в работе Салзмана (Salzman et al., 1966), в которой немеченые хромосомы инкубировались с меченой рРНК. В этом случае метка прочно связывалась с хромосомами. Адсорбция РНК на хромосомах, очевидно, зависит от условий выделения (ионная сила, рН и др.), которые трудно сравнить с условиями в живой клетке. Поэтому до тех пор, пока не будут найдены методические приемы, позволяющие контролировать адсорбцию и иные виды неспецифического связывания РНК с хромосомами при их выделении, отличить факты от артефактов не представляется возможным. В этой связи крайне приблизительными должны считаться и другие биохимические данные о содержании РНК, полученные при анализе изолированных хромосом.

Авторадиографические исследования, несмотря на то, что они являются обычно полуколичественными и не позволяют определить тип РНК, дают более надежную информацию. Очевидно, что при мгновенной фиксации клетки существенные перераспределения РНК между хромосомами и цитоплазмой вряд ли возможны. Эти данные однозначно показывают, что значительная часть синтезированных перед митозом ядерных РНК во время митоза оказывается вне хромосом и распределяется по всей клетке, хотя мечеными оказываются и сами хромосомы.

Исследования радиоавтографических препаратов ранних зародышей мыши, инкубированных с ^3H -уридином, показали, что во всех интерфазных клетках метка почти полностью сосредоточена в ядрах (выход в цитоплазму в эти сроки был еще незначителен) (Нейфах, Костомарова, 1971). В то же время в многочисленных делящихся клетках метка была рассеяна по цитоплазме, и в области метафазной пластинки ее было не больше, чем в других частях клетки. За время инкубации (1—2 часа) значительная часть клеток несомненно прошла митоз (митотический индекс на ранних стадиях довольно велик), но интерфазных клеток, в которых бы метка оказалась рассеянной по цитоплазме, на препаратах не оказалось. Этих наблюдений было бы достаточно для того, чтобы утверждать, что после митоза меченая РНК возвращается в ядра, если бы не одно возражение. Рассмотренный выше опыт не позволил, в принципе, исключить возможность того, что вышедшая во время митоза в цитоплазму РНК быстро распадается, а в ядрах сразу после деления происходит синтез новой РНК как за счет меченых продуктов распада, так и за счет радиоактивного пула предшественников, сохранившегося после инкубации с ^3H -уридином.

Эта возможность была исключена в специально поставленных опытах. Изолированные бластомеры мыши частично синхронизировали охлаждением (Нейфах, Ротт, 1959), коротко инкубировали с ^3H -уридином и затем помещали в среду с актиномицином D, где значительная их часть делилась в течение первого часа. При помощи авторадиографии показано, что в этих условиях в деля-

щихся клетках большая часть вновь синтезированных РНК (84 %) находится в цитоплазме. В клетках же, прошедших деление, почти вся метка оказывалась над дочерними ядрами. Так как в присутствии актиномицина синтез РНК не происходит, то, следовательно, большая часть метки в ядре соответствует РНК, вышедшей в цитоплазму на время митоза и возвратившейся в ядра после митоза.

Следующий шаг в этом исследовании был сделан на культуре клеток млекопитающих — фибробластах китайского хомячка (Нейфах и др., 1971) (рис. 36). В опытах к синхронной культуре фибробластов добавляли ^3H -уридин, а еще через 10 мин. колцемид, останавливающий митозы на стадии метафазы. Затем из культуры отдельно получали метафазные и интерфазные клетки (Stubblefield et al., 1967) и инкубировали в присутствии актиномицина. В интерфазных клетках происходит постепенный выход метки из ядра в цитоплазму. В делящихся же клетках метка равномерно распределяется по цитоплазме, а после митоза возвращается в дочерние ядра. По сравнению с интерфазными клетками митоз не только не ускоряет, а напротив, замедляет или даже останавливает нормальный выход РНК из ядер.

Сохраняет ли эта РНК свойства ядерной РНК, становится очевидным из наших данных (Абрамова, Neyfakh, 1973). Из метафазных клеток выделяли цитоплазму (смешанную с кариоплазмой) и хромосомы, а из интерфазных — цитоплазму и ядра. Далее из этих фракций получали РНК, которые анализировали в сахарозном градиенте. На рис. 37 показаны результаты опыта. Во фракциях интерфазных клеток распределение метки обычное — в цитоплазме содержатся преимущественно рибосомные РНК (28S и 18S), а также транспортные РНК (4S). Никаких меченых РНК с константой седиментации более чем 28S в цитоплазме интерфазных клеток не обнаруживается. В ядрах наряду с некоторыми количествами тех же видов РНК присутствуют и тяжелые РНК (30—45S) — предшественники рРНК, а также гигантские РНК (50—60S), еще не прошедшие процессинга.

Иначе распределяются метки между фракциями метафазных клеток. Хромосомы содержат различные виды РНК, в том числе и тяжелые. Как мы уже говорили, трудно решить, в какой мере эти виды РНК действительно связаны с хромосомами в делящейся клетке, а в какой — адсорбировались в ходе гомогенизации и осаждения хромосом. В отличие от интерфазной цитоплазмы в «цитоплазме» метафазных клеток обнаружены характерные для ядер тяжелые РНК, седиментирующие при 30—60S. Таким образом, показано, что на время митоза в цитоплазме оказываются ядерные РНК, которые сохраняют там свои характерные свойства — прежде всего высокий молекулярный вес.

Аналогичные данные о поведении РНК в митозе были получены и на одном из примитивных эукариот — амебе. Рао и Прескотт (Rao, Prescott, 1969) показали, что у амёбы с длительно меченой

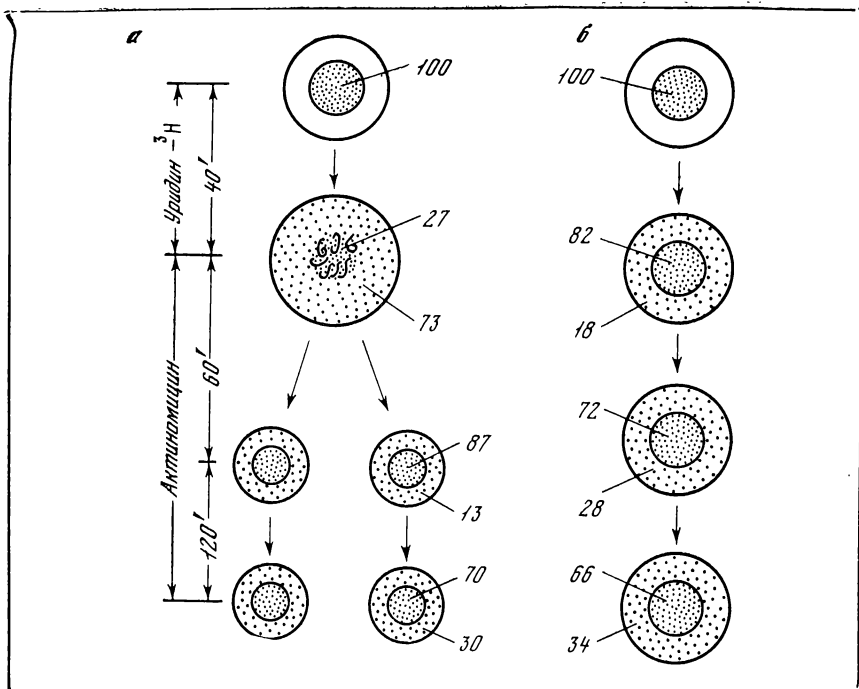


Рис. 36. Миграция вновь синтезированной РНК во время митоза (авторадиографические данные, схема)

Фибробласты китайского хомячка в культуре коротко метили ^3H -уридином в присутствии коллемеда. Метафазные (а) и интерфазные (б) клетки разделяли и инкубировали в среде с актиномицином (2 мкг/мл), где метафазные клетки завершали деление. Распределение меченой РНК над ядром и цитоплазмой определяли авторадиографически и выражали в процентах. В интерфазных клетках вновь синтезированная РНК постепенно выходит в цитоплазму. На метафазе вся РНК равномерно распределяется по клетке, а после завершения митоза возвращается в дочерние ядра (Neufakh et al., 1971)

РНК во время митоза вся метка оказывается в цитоплазме, а после митоза — снова в ядрах. Так как у этих амёб ядра и цитоплазма были мечены равномерно, нельзя утверждать, что в ядра возвращается та же самая РНК, которая вышла в цитоплазму в начале митоза. Мы повторили эти опыты (Yudin, Neufakh, 1973) с небольшой модификацией: амёб инкубировали относительно короткое время (3 часа) с высокометеным ^3H -урацилом, который проникает в амёбу и включается в РНК. За это время у амёб метка еще не успевает выйти в цитоплазму. Далее амёб переносили в среду, содержащую актиномицин, отбирали только что разделившиеся клетки и изолировали, как Рао и Прескотт, их ядра. Радиоактивность обоих дочерних ядер, определенная авторадиографически, оказалась хорошо совпадающей с радиоактив-

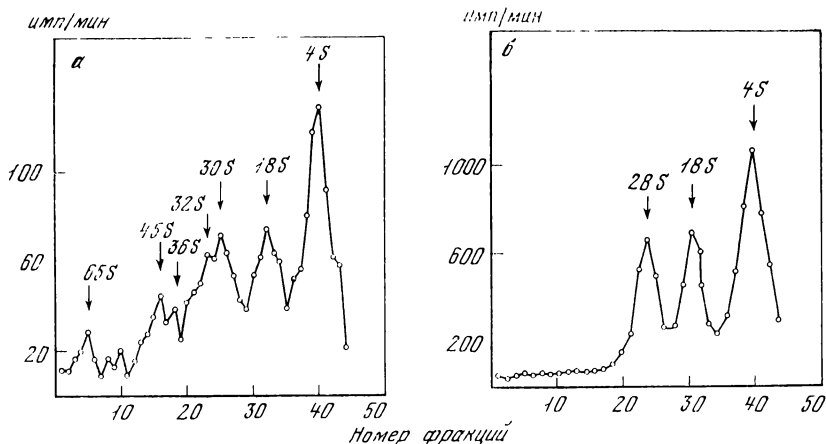


Рис. 37. Гигантские РНК в «цитоплазме» метафазных клеток

Из коротко меченных ^3H -уридином метафазных клеток получали «цитоплазматическую» фракцию (супернатант после 4000 g), выделяли РНК и анализировали центрифугированием в сахарозном градиенте (а). В контроле так же обрабатывали интерфазные клетки (б). На рис. а («цитоплазма» метафазы) видны пики гигантских РНК (30—65S), обычно локализованные в ядре и отсутствующие в цитоплазме интерфазных клеток (б) (Abramova, Neyfakh, 1973)

ностью ядра материнской клетки. Таким образом, мы подтвердили данные Прескотта и Рао, но дополнительно сделали более достоверным вывод о том, что РНК, возвращающаяся в ядра, является той же самой, которая вышла из ядер в начале митоза.

На том же объекте было установлено очень важное явление (Goldstein et al., 1969). Если ядро амобы с меченой РНК пересадить в другую амобу, то через некоторое время часть меченой РНК из пересаженного ядра окажется во втором, собственном ядре амобы-реципиента. Авторы показали, что часть ядерной РНК может мигрировать из ядра в цитоплазму и обратно и попадать в другое ядро, если их в клетке два. Это означало, что небольшая часть ядерной РНК находится все время в цитоплазме. Очевидно, ядерные РНК находятся в некотором динамическом равновесии между ядром и цитоплазмой, сильно сдвинутом в сторону ядра. Сдвиг этот можно объяснить химическим сродством ядерной РНК и хроматина, который, однако, в амбе удерживает не всю ядерную РНК, а лишь 98%, в то время как 2% находится в цитоплазме. (По данным Прескотта и Рао, меченая РНК из пересаженного ядра распределяется между ядром и цитоплазмой в отношении 50 : 1.) Следует напомнить, что речь здесь идет не о всех РНК — в цитоплазме их намного больше, чем в ядре, — а только о ядерных, т. е. о тех, которые еще не вышли из ядра или всегда в нем находятся.

В заключение мы рассмотрим один пример на эмбриологическом материале, в котором миграция РНК во время митоза случит, по-видимому, не просто для восстановления предмитотического распределения разных РНК между ядром и цитоплазмой.

В некоторых исследованиях Дэвидсон использовал южноамериканскую лягушку *Engystomops pustulosus*, отличающуюся относительно коротким оогенезом (периода 3—4 месяцев). Меченый уридин вводили этой лягушке в том возрасте, когда ооциты были на стадии ламповых щеток. Через 3 месяца, когда от нее получили икру и оплодотворили, на стадии ранней бластулы в ядрах была обнаружена меченая РНК. Автор полагает, что это РНК, синтезированная на стадии ламповых щеток. Очевидно, что во время созревания ооцита эта РНК находилась в цитоплазме и затем вернулась в ядра (Davidson, Haugh, 1969b).

В нашей работе ³H-уридин вводили самкам выюна одновременно с введенным хориогонина — гормона, вызывающего овуляцию и стимулирующего при этом в период созревания синтез РНК в зародышевом пузырьке. Ранее было показано, что во время созревания РНК, синтезированная в зародышевом пузырьке, при его разрыве выходит в цитоплазму и более или менее равномерно распространяется по всему яйцу. Было установлено, что она попадает (возвращается) в ядра бластомеров. Очевидно, в этом случае речь идет не обязательно о мРНК, не прошедшей процессинг, так как за время между овуляцией и дроблением проходит много часов. Можно предполагать, что она является специфически ядерной РНК, выполняющей в ядрах какие-то специальные функции. Не менее вероятно, что эта РНК является про-мРНК, хранящейся в ядрах и длительное время не проходящей процессинга. Так как синтеза РНК в ядрах на ранних стадиях развития нет, то естественно думать, что указанная РНК запасается в оогенезе (на стадии ламповых щеток и во время созревания), затем попадает в ядра бластомеров. Важно отметить, что РНК зародышевого пузырька, разводясь в цитоплазме всего яйца, способна несколько раз при созревании и при каждом делении дробления выходить из ядер и возвращаться в них. Механизмы восстановления структуры ядер после митоза в данном случае, очевидно, выполняют специальные функции хранения РНК в оогенезе и раннем развитии.

Теперь мы можем попытаться объяснить данные по миграции РНК во время митоза и проблему транспорта РНК из ядра в цитоплазму в целом. Между ядерными РНК и хроматином существует химическое сродство. Ассоциация РНК — хроматин недавно была прямо показана (Kimmel et al., 1976). Связь хроматина и РНК может быть нарушена искусственно при обработке клеток горячим фенолом. На этом построен метод температурного фракционирования ядерных и цитоплазматических РНК по Георгиеву: при холодной фенольной обработке извлекаются «легкоэкстрагируемые» РНК — РНК цитоплазмы и небольшая фрак-

ция ядерных РНК, очевидно, уже не связанных с хроматином и растворенных в кариоплазме. Обработка фенолом при высокой температуре позволяет извлечь и РНК, связанную с хроматином. По-видимому, это РНК, еще не прошедшая процессинга. Можно предполагать, что не просто большой размер молекул, а иные свойства определяют сродство ядерных РНК к хроматину. Может быть, это наличие специальных последовательностей, отвечающих за связь с хроматином. Судя по данным, полученным на амебе, это сродство не слишком жесткое и константа диссоциации достаточно велика, так как определенная часть ядерных РНК способна быстро переходить в цитоплазму и обратно и мигрировать в другие ядра. Возможно, что в отличие от амебы в клетках высших эукариот сродство это намного выше и ядерные РНК удерживаются в ядре прочнее.

В интерфазной клетке многие (если не все) ядерные РНК подвергаются изменениям — процессингу. В ходе его они модифицируются, разрезаются на части, и лишь некоторые из образованных таким образом отрезков выходят в цитоплазму. Размер этих выходящих участков может составлять 80% всей синтезированной молекулы (как рРНК у хладнокровных животных), 50% (как рРНК у теплокровных) и даже меньше (как, по-видимому, обстоит дело с мРНК гемоглобина). Их выход из ядра означает, что они утратили сродство к хроматину и перешли сначала в состав легкоэкстрагируемой фракции кариоплазмы, а затем прошли через ядерную мембрану, которая, очевидно, не является для РНК препятствием, в цитоплазму. Таким образом, процессинг и выход РНК из ядра получают единое объяснение, а сложная проблема механизмов избирательной селекции РНК в ядре может быть сведена к более простой — наличию или отсутствию участков, имеющих сродство к хроматину.

Итак, выход РНК из ядра в интерфазе в результате процессинга происходит за счет того, что в комплексе хроматин-РНК изменяется РНК. Однако во время митоза происходят значительные изменения во втором компоненте комплекса — в хроматине. Он спирализуется в хромосомы и при этом, очевидно, утрачивает полностью или частично свое сродство к ядерным РНК. Кроме того, в это же время разрушается и ядерная мембрана. Не связанные с хромосомами молекулы ядерной РНК в этот период свободно диффундируют во всей клетке. Процессинг, определяемый, очевидно, ядерными ферментами, в цитоплазме не происходит. Затем наступает телофаза, хроматин деспирализуется и окружается ядерной мембраной. Где-то в этот момент ядерные РНК вновь собираются в ядре. Создается впечатление, что РНК возвращается лишь в уже оформленные ядра, окруженные ядерной мембраной. Если это так, то лишний раз подтверждается, что ядерная мембрана не играет решающей роли в процессах транспорта РНК между ядром и цитоплазмой. Очевидно, когда хроматин деспирализуется, восстанавливается его сродство к ядерным

РНК. Трудно представить какой-либо механизм, направленно двигающий молекулы ядерных РНК в ядра дочерних клеток. Значительно естественнее представить, что это происходит путем диффузии — РНК попадают в ядро и связываются с хроматином, который их как бы улавливает. Так восстанавливается нормальное интерфазное распределение РНК между ядром и цитоплазмой. В ядре затем вновь начинается процессинг, и прошедшие его РНК выходят в цитоплазму вторично.

Представленная здесь схема взаимоотношений хроматина и РНК в деталях весьма гипотетична. Однако она опирается на три основные группы данных: 1) существование в ядрах большой трудноэкстрагируемой фракции РНК, практически представляющей все ядерные РНК; 2) связь процессинга и транспорта РНК в интерфазных ядрах; 3) способность ядерных РНК возвращаться в ядра дочерних клеток. Предложенная гипотеза сродства хроматина и РНК, нарушаемого в интерфазе процессингом РНК, а при митозе — спирализацией ДНК, представляет собой единое объяснение всего комплекса проблем.

РНК В ЦИТОПЛАЗМЕ

Только для тех РНК, которые прошли процессинг и вышли из ядра в цитоплазму, справедливы «классические» представления о трех типах РНК — мРНК, рРНК и тРНК. Их функция в белоксинтезирующем аппарате осуществляется при участии многих других молекул и прежде всего энзиматических и структурных белков. В свободном, не связанном с белком состоянии находится только тРНК, хотя и ее функция состоит во взаимодействиях с аминоксил-тРНК-синтетазами, и полипептидом и белками рибосом.

Связь с белками очевидна для рибосомных РНК, которые по существующим представлениям играют в рибосоме роль каркаса, обеспечивающего построение их структуры из десятков различных специфических молекул белка (Спирин, Гаврилова, 1971; Богданов, Леднева, 1975), хотя выполняют и функциональную роль, взаимодействуя с тРНК и мРНК.

Менее известно о роли белков, связанных с мРНК, хотя, возможно, именно они играют ведущую роль в хранении мРНК и регуляции ее трансляции.

Рибосомы

Образование рибосом в оогенезе рассмотрено выше. Ко времени овуляции яйца всех видов животных содержат большие запасы рибосом, готовых к участию в белковом синтезе.

У большинства животных (рыбы, амфибии, иглокожие) на начальных стадиях развития — от оплодотворения до стадии гаструлы и позже — синтез белка происходит только на рибосомах,

ранее запасенных в оогенезе. Затем, когда начинается образование новых рибосом, старые постепенно вытесняются (деградируют), так что длительное время общее количество рРНК почти не изменяется.

У рыб и, может быть, у других животных с неполным дроблением значительная часть рибосом находится среди гранул желтка и не попадает в цитоплазматический бугорок яйца, из которого образуются blastomeres и затем все клетки зародыша. Однако на стадиях средней — поздней бластулы происходит переход рибосом из желточной части яйца в клетки. У зародышей вьюна это наблюдается между 7 и 9 час. развития и выражается в резком увеличении содержания РНК в blastodermе (при неизменном количестве РНК во всем яйце) (Айтхожин и др. 1964). Аналогичный процесс был показан также на зародышах форели (Hagenmeier, 1969). Механизм этого перехода неясен. Возможно, он состоит в активной миграции рибосом в клетки, прилежащие к желтку (Айтхожин и др., 1964; Thomas R., 1968), а может быть, просто во включении верхнего слоя желтковой части яйца в состав клеток перибласта при их делении. Неясно также, как распределяются эти рибосомы в дальнейшем — остаются только в клетках области перибласта или проникают в вышележащие клетки. Однако на стадии поздней бластулы существует градиент в распределении рРНК от высоких концентраций в базальном слое к низким в поверхностных клетках бластулы (Костомарова, Нечаева, 1970). Этот градиент, по-видимому, определяет аналогичный градиент в интенсивности синтеза белка (Krigsgaber et al., 1971).

К настоящему времени в литературе известны два объекта — ксенопус и морской еж, на которых удалось получить данные о продолжительности жизни старых (материнских) рибосом яйца. Выше уже упоминалась мутация ксенопуса *nullo* — *nu*, когда полностью отсутствует ядрышковый организатор. У гетерозиготных по этой мутации лягушек клетки содержат по одному ядрышку, что достаточно для обеспечения нормального количества рибосом в течение всей жизни лягушки. Иными словами, если судить не по числу ядрышек, а по количеству рибосом, данная мутация является рецессивной. При скрещивании этих гетерозиготных мутантов друг с другом в 25% случаев образуются гомозиготные по этой мутации зародыши, вовсе лишенные ядрышек. Тем не менее они нормально развиваются до стадии хвостовой почки и даже доживают до стадии плавающего головастика (Elsdale et al., 1958). Вместе с тем хорошо известно, что у амфибий синтез новых рРНК начинается уже в конце гастрюляции, а так как общее количество РНК не возрастает, то это свидетельствует, что одновременно с образованием новых идет эквивалентный распад старых рибосом.

Можно ли на модели развития безъядрышковых мутантов определить время сохранения рибосом яйца в нормальном зародыше? Подавление синтеза белка почти немедленно останавливает

развитие. Следовательно, вплоть до поздних стадий развития синтез белка в мутантных зародышах близок к нормальному, и «материнские» рибосомы способны функционировать. В какой-то степени это может достигаться за счет компенсаторного усиления синтеза белка в расчете на одну сохранившуюся рибосому. Но хотя прямых определений количества рибосом у гомозиготных безъядрышковых мутантов и не производилось, можно думать, что деградация рибосом яйца у них, по сравнению с контролем, задержана. Иными словами, рибосомы способны функционировать в развитии дольше, чем они сохраняются в норме, когда их «вытесняют» новые рибосомы самого зародыша. Если синтез рРНК начинается на стадии гастрюлы, то, очевидно, постепенная замена старых рибосом новыми в нормальном развитии происходит где-то со стадии нейрулы.

У зародышей морского ежа Немец обнаружил, что рибосомы, запасенные в яйце, отличаются от новообразованных рибосом зародыша. При нагревании их до 60° и выделении затем рРНК оказалось, 18S рРНК из рибосом ооцита распадается на два отрезка, седиментирующие при 13S, в то время как 18S рРНК из новых рибосом более теплоустойчива. Позже оказалось, что этой особенностью обладают лишь некоторые экземпляры морских ежей *Strongylocentrotus purpuratus* и отличия материнских рибосом от рибосом зародыша объясняются их генетическими различиями. Так или иначе, эти различия позволили Немецу количественно показать, как новые рибосомы сменяют в развитии рибосомы, запасенные в оогенезе. Этот процесс начинается на стадии мезенхимной бластулы (20 час.). Замена старых рибосом на новые достигает 50% через 50 час. (призма), протекает довольно монотонно и заканчивается полной заменой на стадии плютеуса через 70—80 час. развития (Nemer, Infante. 1967). Можно высказать предположение о взаимозависимости двух процессов: появление новых рибосом определяется распадом старых или же старые рибосомы распадаются оттого, что их вытесняют новые.

В неоплодотворенных яйцах вьюна отношение 5S рРНК к высокополимерным рРНК равно 0,7—0,8, т. е. около 20% рибосом не содержат низкомолекулярного компонента. Вероятно, эти рибосомы менее стабильны, так как по мере развития к стадии поздней бластулы отношение возрастает до 0,9, в то время как синтез 5S рРНК еще не начинается. В активированных водой яйцах вьюна этот процесс не происходит, что может указывать на то, что распад рибосом, лишенных 5S РНК, является функцией развития (Соловьева и др., 1973а).

Деградация рибосом может быть проявлением клеточной дифференцировки, если в результате ее образуются клетки, имеющие низкий уровень синтеза белка. Это наблюдалось, например, при дифференцировке линзовых волокон (Lapisek, Papaconstantinou, 1973).

Рибосомы в клетках могут быть в свободном состоянии или связаны с внутриклеточными мембранами — эргастоплазмой или эндоплазматическим ретикулумом. Недифференцированные клетки, как правило, почти не имеют эргастоплазмы, и ее количество возрастает по мере дифференцировки. Очевидно, тогда же происходит и фиксация рибосом на эндоплазматическом ретикулуме.

Полирибосомы

В состав полирибосомы входят рибосомы, участвующие в трансляции одной молекулы мРНК. Так как расстояние между рибосомами вдоль цепи мРНК величина относительно постоянная, то размер полирибосом однозначно определяется длиной мРНК и коррелирует с молекулярным весом синтезируемого белка. Эта корреляция может быть не очень строгой, так как определенную часть мРНК составляют нетранслируемые полиА-последовательности и, возможно, последовательности, предшествующие иницирующему кодону. Например, для глобиновой мРНК полиА-фрагмент равен 150 адениловым нуклеотидам, т. е. составляет около 25% всей длины мРНК.

При седиментационном анализе полирибосомы образуют широкий слой, соответствующий значениям от 100S до 800S, или от 2 до 50 рибосом на одну полирибосому. По этому критерию к полирибосомам принято относить все частицы, более тяжелые, чем рибосомы. Однако это не совсем так, ибо если о наличии частицы судят не по оптической плотности, а по радиоактивности, то в эту же категорию попадают и информосомы (см. ниже). Более надежный критерий — величина плавучей плотности, которая для рибосом близка к 1,55, для полирибосом — 1,51, а для информосом — 1,40. [Здесь указаны значения, полученные на зародышах вьюша (Овчинников и др., 1969б, Spirin, 1969). Для других объектов они могут варьировать в третьем знаке]. Тот факт, что полисомы оказываются достоверно легче рибосом, указывает на более высокое (приблизительно на 30%) содержание белка. Это не может быть объяснено только добавлением синтезирующихся полипептидных цепей и указывает на то, что в процессе образования и функционирования полисомы к ней присоединяются дополнительные белки, прочно связывающиеся или с самими рибосомами, или с мРНК. В лаборатории Глишина было показано, что мРНК в полирибосомах из зародышей морского ежа находится в виде РНП, содержащего 60% белка (Ruzdisic, Glišin, 1972).

На одиночных рибосомах (моносомах) в клетке белок практически не синтезируется. Поэтому доля рибосом, вовлеченных в состав полисомных комплексов, может служить косвенным показателем интенсивности синтеза белка или, точнее, степени загрузки белоксинтезирующего аппарата. При очень медленном синтезе белка — например, в неоплодотворенных яйцах мор-

ского ежа или при действии ингибиторов белкового синтеза — полисомы почти не образуются. Однако и при самом интенсивном синтезе доля рибосом клетки, находящихся в составе полисомных комплексов, обычно не превышает 50%. Это связано с тем, что для поддержания структуры полисом необходимо, чтобы к 5'-концу мРНК (начало трансляции) все время присоединялись новые рибосомы (одновременно с 3'-конца сходят рибосомы, на которых синтез данного полипептида уже закончился). Поэтому в цитоплазме должна поддерживаться некоторая оптимальная концентрация свободных рибосом.

Хорошим примером корреляции интенсивности синтеза белка и количества полисом является раннее развитие яиц морского ежа. В неоплодотворенных яйцах синтез белка едва заметен и содержание полисом не превышает 2%. После оплодотворения синтез белка почти сразу резко усиливается и доля рибосом, входящих в полисомную фракцию, возрастает и через несколько часов достигает максимума (у разных авторов от 40 до 60%) (Kedes, Gross, 1969; Mackintosh, Bell, 1969b, Finamore, Clegg, 1969; Mano, 1971a). Синтез белка в это время также максимальный.

Зная, что доля мРНК в общей РНК полирибосом составляет около 2%, можно подсчитать количество мРНК, участвующей в трансляции. По данным Хэмфри (Humphreys, 1971), через 2 часа после оплодотворения яиц морского ежа доля полисом составляет 20%, и это соответствует $6 \cdot 10^{-12}$ г мРНК, или всего 0,4% всей РНК яйца, т. е. намного меньше, чем количество потенциальной мРНК, определяемое по ее матричной активности.

Размер полисом, как уже говорилось, отражает молекулярный вес синтезируемых белков. На поздних стадиях развития, когда синтезируются самые различные белки, размер полирибосом широко варьирует. Изменение размеров полирибосом на ранних стадиях развития морского ежа исследовали Инфант и Немер (Infante, Nemer, 1967) (рис. 38). Они показали, что после оплодотворения в яйцах появляется и начинает возрастать довольно размытый пик больших полисом с константой седиментации, варьирующей вокруг 300S. На более поздних стадиях (8—16 бластомеров) к нему добавляется новый класс полисом с максимумом около 200S. В присутствии актиномицина пик 300S появляется и увеличивается так же, как и в норме, в то время как пик малых полисом не появляется. Эти данные показывают, что на матрицах, запасенных в оогенезе, синтезируются более крупные белки. На новых же матрицах, транскрибированных уже в самом зародыше (их появление может быть подавлено актиномицином) транслируется класс белков с меньшим молекулярным весом.

Эти исследования были продолжены в лаборатории Гросса. Если в качестве теста на полисомы использовать меченые предшественники РНК, можно обнаружить те полисомы, на которых транслируются только вновь синтезированные матрицы. Размер

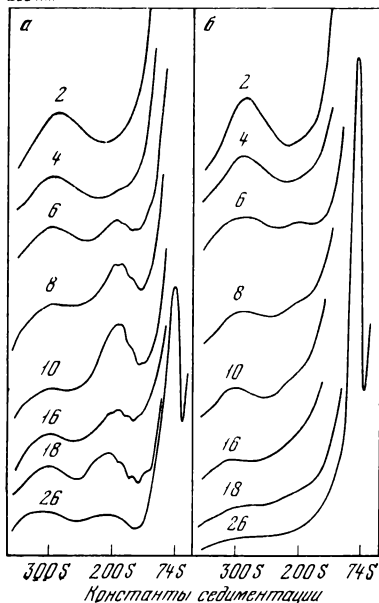
$E_{260\text{nm}}$ 

Рис. 38. Изменения размеров полирибосом в развитии морского ежа

Зародыши *Strongylocentrotus purpuratus* развивались разное время в норме (а) и в присутствии актиномицина (б); из них получали безмитохондриальный экстракт и анализировали центрифугированием в градиенте сахарозы. Цифры у кривых — стадии развития зародышей в часах. В ходе нормального развития (а) пик тяжелых полисом (300S) несколько уменьшается и появляется пик легких полисом (200S). В присутствии актиномицина (б) полисомы постепенно исчезают. Очевидно материнские матрицы транслируются на 300S полисомах, а вновь транскрибированные — на 200S (Infante, Nemer, 1967)

«новых» полирибосом на ранних стадиях очень невелик и не превышает 2—7 рибосом (Kedes et al., 1969a). Это соответствует синтезу белков с молекулярным весом около 3 тыс. Такими белками являются гистоны, которые, обеспечивая белковый компонент быстро нарастающей массы ядер, интенсивно образуются во время дробления. Таким образом, данные о размерах полирибосом позволили (правда, не очень прямым способом) установить, что гистоны в раннем развитии синтезируются на новых матрицах, или, наоборот, что основная часть мРНК, синтезирующаяся на самых ранних стадиях развития морского ежа, служит матрицами для синтеза ядерных белков (Kedes et al., 1969a, b). Недавно было показано, что загруженность мРНК рибосомами в разных полирибосомах у зародышей морского ежа может варьировать. В частности, мРНК на стадии бластулы связаны с меньшим числом рибосом, чем на более поздних стадиях. Для полиА-содержащих мРНК загруженность рибосомами возрастает в большей мере и достигает максимума, в то время как для мРНК, не имеющих полиА-фрагментов, это возрастание незначительно (Nemer, 1975).

Размеры полисом приобретают одно или несколько дискретных значений при дифференцировке клеток с узкой специализацией и преимущественным синтезом немногих белков. Так, в ретикулоцитах преобладает один пик полисом, содержащий 9—10S мРНК, служащую матрицей для синтеза полипептидов глобина.

В эмбриональных мышцах цыпленка выделяются три пика полисом — очень большие, содержащие до 50 рибосом, средние и малые. Они соответствуют трем видам мышечных белков, синтез которых преобладает в этих клетках: миозину, актину и тропомиозину (Heuwood, Rich, 1968).

Таким образом, в ряде случаев анализ полисом может дать некоторую информацию о размерах синтезируемых белков, об относительной интенсивности их синтеза, зависимости его от транскрипции и т. д.

Транспортные РНК

Между количеством транспортных РНК и рибосомами существует некоторое оптимальное соотношение, обеспечивающее максимальную эффективность работы белоксинтезирующего аппарата. Судя по цифрам, полученным для многих дифференцированных тканей, это соотношение равно приблизительно 10—15 молекулам тРНК на одну рибосому или, если учитывать только полисомы, 20—30 молекулам тРНК на одну функционирующую рибосому, т. е. приблизительно по одной молекуле тРНК для каждого вида амниокислот.

В ооците амфибий, как мы уже говорили, это соотношение на порядок ниже — около одной молекулы тРНК на одну рибосому. Следовательно, в ооците может функционировать (с нормальной скоростью) только $\frac{1}{10}$ часть всех рибосом яйца. Это не должно удивлять, так как очевидно, что большая часть рибосом ооцита неактивна и только хранится до эмбриогенеза. Однако и в эмбриогенезе амфибий количество тРНК начинает увеличиваться со стадии ранней гаструлы, после чего оно некоторое время нарастает параллельно увеличению числа клеток, что при постоянном числе рибосом уже на стадии нейрулы приводит к достижению нормального соотношения: 15 молекул тРНК на рибосому (Brown, Littna, 1966). В количественном отношении это соответствует тому, что масса тРНК составляет около 10% массы рРНК.

У ранних зародышей вьюна дело, по-видимому, обстоит несколько иначе (Соловьева и др., 1973а). В неоплодотворенном яйце у них приблизительно такое же относительное количество тРНК, как и у амфибий. Если в качестве показателя количества рибосом считать число молекул 5S РНК, то оно в яйцах вьюна равно $3,3-5,6 \cdot 10^{11}$, это составляет 0,5—0,8 от количества высокомолекулярных рРНК (28S + 18S). В таком случае при содержании в яйце и на ранних стадиях развития зародыша $5-9 \cdot 10^{11}$ молекул тРНК на одну рибосому приходится 1,4—2,0 молекулы тРНК. (Если число рибосом определять по числу молекул 28S + 18S рРНК, то это отношение уменьшится до 0,8—1,4 молекулы тРНК на рибосому). Синтез тРНК начинается у вьюна раньше, чем у лягушки, — на стадии ранней бластулы, но количество тРНК вплоть до стадии ранней гаструлы существенно не меня-

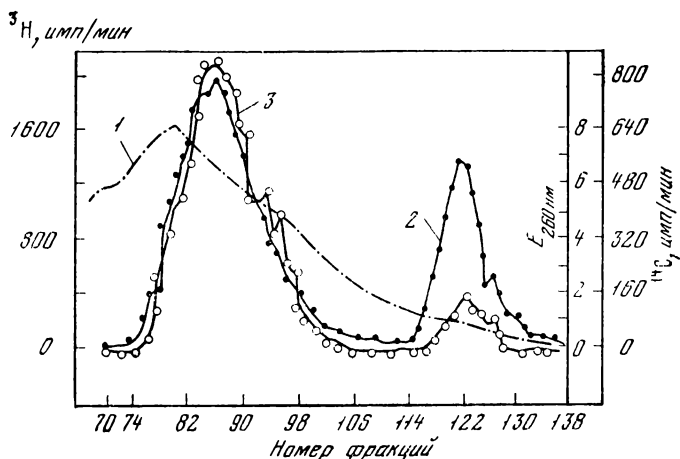


Рис. 39. Изменение состава тРНК в раннем развитии морского ежа

тРНК из яиц и из бластулы *Strongylocentrotus purpuratus* аминокислотировали ^3H - и ^{14}C -лейцином соответственно и совместно хроматографировали на МАК-колонке. 1 — оптическая плотность (при $E_{260\text{ нм}}$); 2 — ^3H -лейцил-тРНК; 3 — ^{14}C -лейцил-тРНК. Относительное содержание двух изоакцепторных лейциновых тРНК в ходе развития меняется (Zeikus et al., 1969)

ется. Можно предположить, что на этих стадиях синтез тРНК лишь компенсирует их убыль, а увеличение количества тРНК и возрастание отношения числа молекул тРНК на рибосому происходят у выюна на более поздних стадиях.

Видовой состав тРНК в эмбриональном развитии исследовали несколько раз, и было показано, что хотя на разных стадиях развития в зародыше присутствуют те же виды тРНК, количественное соотношение между ними несколько меняется; так, изменения в составе некоторых изоакцепторных тРНК были обнаружены в развитии насекомых (White et al., 1973; Smith, Forrest, 1973; Araya et al., 1975), морского ежа (Zeikus et al., 1969) (рис. 39), ранних эмбрионов птиц (Portugal, 1972), зародышей млекопитающих (Clandinin, Schultz, 1975) и их постнатальном развитии (Chou, Johnson, 1972).

Этих данных недостаточно, чтобы представить общую картину изменений в составе тРНК и понять смысл этих изменений. В ходе развития может несколько меняться аминокислотный состав синтезируемых белков, например, на тех стадиях, на которых часть новых белков составляет основные ядерные белки, может несколько возрастать необходимость в лизиновых и аргининовых тРНК. Изменение соотношения разных тРНК может быть также связано с изменением пула различных свободных аминокислот — уменьшение концентрации какой-либо из них может быть частично компенсировано увеличением концентрации соответствующей тРНК и тем поддерживать достаточное количе-

ство комплексов аминоксил-тРНК. И, наконец, изменение состава тРНК в ходе дифференцировки может служить механизмом регуляции состава синтезируемых белков. Эти вопросы будут рассмотрены в книге, посвященной механизмам регуляции синтеза макромолекул в развитии (см. также Остерман, 1977).

Маскированная мРНК

Наибольший интерес, конечно, представляют факты, относящиеся к тому, что происходит в цитоплазме с информационными РНК. Сейчас накопилось достаточно фактов, чтобы отказаться от представления о том, что мРНК, выходя в цитоплазму, всегда полностью включаются в состав полирибосом и транслируются до тех пор, пока не деградируют. Возникающие при этом проблемы могут быть разделены на две: 1) существует ли в цитоплазме нетранслируемая (маскированная) мРНК и 2) какую роль в регуляции синтеза белка играет время жизни мРНК в цитоплазме и какие механизмы это время определяют.

Термин «маскированная РНК» был предложен А. С. Спириным (Spirin, 1966) и Тейлором (Tyler, 1967) и даже получил специальное обозначение mmRNA (masked messenger RNA). Таким термином может обозначаться мРНК, которая находится в цитоплазме, не транслируется в данный момент, но вступает в трансляцию в более позднее время. Доказанных примеров, подтверждающих существование этой формы РНК, немного. Наиболее известным может служить мРНК, запасенная в оогенезе. Действительно, существование этой РНК было убедительно показано на неоплодотворенных яйцах морского ежа. Ее количество могло быть оценено по матричной активности в системе *in vitro* (Slater, Spigelman, 1966). Очень низкий уровень белкового синтеза в яйцах морского ежа служит свидетельством того, что почти все эти мРНК до оплодотворения еще не используются.

Получить безупречные доказательства существования маскированной мРНК в яйцах амфибий и рыб сложнее, так как синтез белка у них продолжается на всех стадиях развития, и трудно утверждать, что не все мРНК участвуют в трансляции. Преимущество этих объектов по сравнению с морским ежом, однако, состоит в том, что на всем протяжении раннего развития транскрипции мРНК у них практически нет. Вместе с тем характер транслируемых РНК, как это показано в опытах по конкурентной гибридизации полисомных мРНК, в ходе раннего развития меняется, т. е. одни маскированные РНК включаются в трансляцию на самых ранних стадиях, а другие — на более поздних (Grippa, Gross, 1969).

Еще одним примером, где синтез нового белка начинается при отсутствии синтеза новых мРНК, является процесс спермиогенеза. Синтез РНК в дифференцирующихся сперматозоидах прекращается очень рано — до второго деления мейоза или сразу же

после него. Это было показано на дрозофиле (Hess, 1968; Henning, 1968) и других членистоногих (Brasiello, 1968) и многократно на различных млекопитающих (Monesi, 1965; MacLaughlin, Terner, 1973; Kierszenbaum, Tres, 1975; см. обзор Auriault, 1975). После прекращения синтеза РНК проходит несколько дней, в течение которых сперматоцит второго порядка постепенно дифференцируется в сперматоид. Матрицы мРНК для этого процесса, как было хорошо показано на дрозофиле, синтезируются на Y-хромосоме перед мейозом. На всем протяжении спермиогенеза синтезируются белки, одни ферменты заменяются другими (Turkington, Majumder, 1974). Нельзя утверждать в данном случае, что матрицы для всех упомянутых синтезов не транскрибируются на ранних этапах спермиогенеза, а сначала хранятся и лишь постепенно вступают в состав полисом. Однако ряд ферментов появляется лишь в акросоме (Turkington, Majumder, 1974), богатые аргинином гистоны начинают синтезироваться и заменять богатые лизиним гистоны в головке сперматозоида только в самом конце спермиогенеза (Das et al., 1964a, Marushige, Marushige, 1975). В таком случае можно утверждать, что матрицы для этих гистонов синтезировались не позже предмейотической стадии и в течение всего времени спермиогенеза (около 8 дней) хранились в маскированной форме.

Формой существования маскированной мРНК могут служить ее РНК-комплексы (частицы). Такие комплексы были обнаружены и названы информосомами (Спирин и др., 1964).

Информосомы

Исследуя в сахарозном градиенте цитоплазматическую фракцию эмбриональных клеток вьюна, меченных C^{14} -уридином, Спирин и соотр. (1964) (Spirin, 1966, 1969) обнаружили в пострибосомальной (более легкой, чем 80S) области ряд пиков радиоактивности, не соответствующих по седиментации ни рибосомам, ни их субъединицам, ни рибосомной РНК (рис. 40). Аналогичные пики выявлялись и после инкубации с мечеными аминокислотами. Все это дало основание заключить, что в цитоплазме обнаружен новый вид рибонуклеопротеидных частиц, содержащих белок и мРНК. Это позволило назвать их информосомами. Отличительной особенностью информосом являлась их плавучая плотность (ρ), которая при исследовании в градиенте CsCl оказалась постоянной величиной для всех классов информосом = 1,40. При плавучей плотности белка 1,35 и РНК — 1,95 это означало, что соотношение РНК : белок в информосомах равно 1 : 3, т. е. намного меньше, чем в рибосомах (1 : 1,5) и полисомах (1 : 2) (Spirin, 1969; Овчинников и др., 1969) (рис. 41). Используя в качестве критерия этот признак, информосомы удалось обнаружить и в прерибосомной (более тяжелой, чем 80S) области, где в сахарозном градиенте их нельзя отличить от полисом.

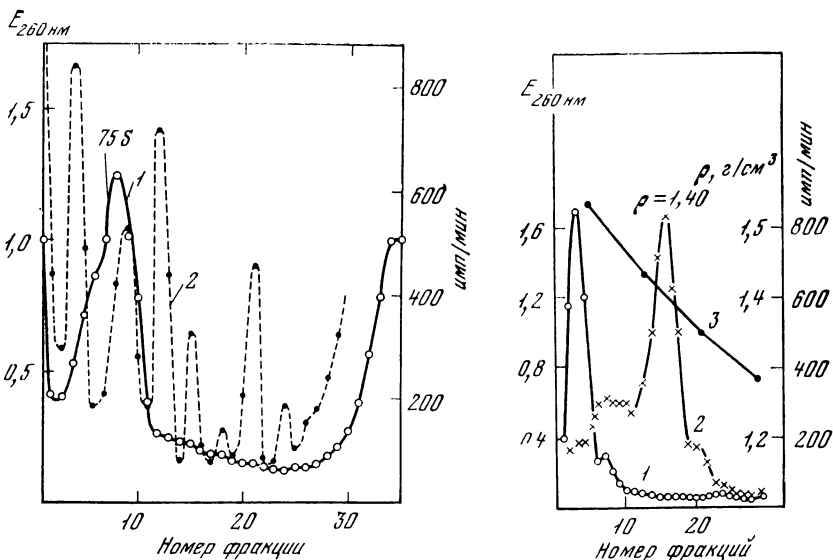


Рис. 40. Информосомы зародышей вьюна

Зародыши вьюна со стадии бластулы инкубировали 6 час. с ^{14}C -аденином и ^{14}C -уридином. Цитоплазматический (безъядерный) экстракт анализировали центрифугированием в градиенте сахарозы. 1 — оптическая плотность ($E_{260 \text{ nm}}$); 2 — радиоактивность. Радиоактивные пики информосом располагаются в более тяжелой и более легкой областях по отношению к пикам рибосом (75S) (Spirin, 1966)

Рис. 41. Плавающая плотность информосом и рибосом

Зародышей вьюна инкубировали с ^{14}C -уридином с 13 до 16 час. развития, получали цитоплазматический экстракт, фиксировали рибонуклеопротеидные комплексы формальдегидом и исследовали их распределением по плотности в градиенте CsCl . 1 — оптическая плотность ($E_{260 \text{ nm}}$); 2 — радиоактивность РНК (имп/мин); 3 — плавающая плотность — ρ (г/см^3). Рибосомы, выявленные оптически, имеют плавающую плотность 1,55, а информосомы, образующие пик радиоактивности, 1,40 (Овчинников и др., 1969а)

Седиментационные характеристики информосом варьируют от 20S до 100—200S, т. е. при постоянном соотношении РНК:белок они отличаются друг от друга размерами молекул РНК. Действительно, после депотеинизации из них был получен ряд размерных классов РНК, обычных для мРНК. Содержание информосом в клетке очень мало, и до сих пор их не удалось выделить в количествах, измеряемых по оптической плотности. Поэтому судить о них приходится только по радиоактивности (обычно РНК). В дальнейшем информосомы были обнаружены в некоторых других типах животных клеток, где их также характеризовала плавающая плотность, близкая к 1,4. Информосомы были описаны Немеом, Спириным и Инфантом (Spirin, Nemer, 1965; Nemer, Infante, 1965; Infante, Nemer, 1968). Позже Мано нашел,

что в неоплодотворенных яйцах морского ежа содержатся РНП, седиментирующие при 300—400S и содержащие молекулы РНК размером 20—60S. После оплодотворения, очевидно, под действием протеаз, эти частицы распадаются и РНК включается в полирибосомы (Mano, Nagano, 1970).

Новые данные были получены на такой модели дифференцировки, как образование мышечных волокон из миобластов в культуре ткани. Синтез мРНК миозина начинается уже в миобластах, и в период до слияния миобластов в миотрубочки, т. е. до начала видимой дифференцировки, она обнаруживается в виде РНП-комплексов в цитоплазме и по своим характеристикам может быть отнесена к информосомам (Buckingham et al., 1974a, Buckingham, Gross, 1975). В эмбриональной сетчатке ³H-уридин сначала включается в РНП-частицы, содержащие около 60% белка, а затем переходит в состав полирибосом (Sarkar, Moscona, 1971). По-видимому, это один из немногих случаев, когда удалось показать миграцию РНК из информосом в полисомы.

Уже в первые годы после обнаружения информосом был выдвинут ряд гипотез об их важной роли в регуляции синтеза белка, в которых информосомы рассматривались как промежуточное звено в миграции мРНК из ядра к полирибосомам (Spirin, 1966). Это привлекло к ним серьезное внимание. В некоторых сообщениях информосомы рассматривались как артефакт, нестабильные РНП-комплексы, неспецифически возникающие при гомогенизировании клеток (Girard, Baltimor, 1966). Действительно, было показано, что информосомоподобные комплексы возникают при смешивании с клеточным экстрактом любых видов РНК, в том числе, например, рРНК из бактерий (Овчинников и др., 1968).

Тем не менее, используя в основном эмбриональные клетки бычьего ядра, удалось обнаружить и некоторые черты специфичности информосом. Так, например, «искусственные информосомы», созданные при совместной инкубации гиалоплазмы бычьего ядра и различных РНК, оказались более стабильными, если они были образованы с мРНК бычьего ядра и при температурах, оптимальных для зародыша бычьего ядра (Степанов, Воронина, 1972). Среди белков гиалоплазмы информосомоподобный комплекс с РНК способна образовывать только очень небольшая фракция белков (около 0,3% всех белков) с определенными физико-химическими свойствами (молекулярный вес около 200 тыс. дальтон) (Степанов и др., 1972).

Существование информосом в интактных клетках было доказано в следующем остроумном эксперименте. Клеточный экстракт гиалоплазмы смешивали с меченой мРНК в присутствии избытка немеченой рРНК. При этом информосомы с $\rho = 1,4$ не образовывались. Очевидно, причиной этого было то, что информосомообразующего белка не хватало, и он распределялся между всей РНК, в результате чего отношение РНК:белок оказывалось выше, чем 1:3. Однако если в присутствии избытка немеченой рРНК гомогенизировали не гиалоплазму и меченую РНК, а целые

клетки, то обнаруживаются обычные информосомы. Это можно было объяснить тем, что рРНК, которая добавлялась в момент гомогенизирования к уже существующим информосомам, не могла конкурировать за их белковый компонент, прочно связанный с мРНК вьюна (Овчинников и др., 1969а).

В ядрах многих типов клеток в лаборатории Г. П. Георгиева были обнаружены РНП-комплексы, белок которых был назван информофером (Самарина и др., 1965). В отличие от информосом эти РНП-комплексы присутствуют в ядрах во вполне измеримых количествах, что позволило получить их изображение в электронном микроскопе. Плавающая плотность ядерных РНП-комплексов также близка к 1,4. Позже эти РНП-комплексы были названы ядерными информосомами. По своему белковому компоненту и, по-видимому, функциональной роли ядерные информосомы отличаются от информосом цитоплазмы. У зародышей морского ежа в ядрах и в цитоплазме обнаружены РНП-комплексы, отличающиеся по соотношению белка и РНК (Alfageme, Infante, 1975).

По схеме, предложенной в лаборатории Г. П. Георгиева (Samarina, 1975), роль ядерных РНП-комплексов сводится к следующему.

В ядрах тотчас вслед за транскрипцией про-мРНК образуются РНП-комплексы с белком информофер — информатином, в результате чего цепочка РНК оказывается связанной с несколькими информоферными глобулами. Предполагается, что этот комплекс защищает про-мРНК от неспецифического действия нуклеаз. В составе РНП-комплекса про-мРНК проходит процессинг — подвергается рестрикции, полиаденилируется и становится зрелой мРНК. При выходе мРНК из ядер в цитоплазму ее связь с информоферами, по-видимому, утрачивается и в цитоплазме мРНК присоединяется прямо к рибосомам или образует РНП-комплексы (информосомы) с цитоплазматическими белками.

Роль, которую играют информосомы в цитоплазме клетки, неясна. В цитоплазме эмбриональных клеток вьюна до 80% меченой РНК оказывается связанной с этими частицами и только 20% — с полирибосомами (Spirin, 1966). В то же время на иных клетках, как взрослых, так и эмбриональных, показано, что мРНК очень быстро входит в состав полирибосом и транслируется (Kedes et al., 1969a, b; Dworkin, Infante, 1976).

Если информосомы лишь промежуточное звено, то было естественно ожидать, что в опытах с короткой меткой с последующим чейзом или просто при продолжительной инкубации с предшественником доля информосомной метки должна уменьшаться, а полирибосомной — увеличиваться. Этого, однако, не обнаружено.

Можно было бы думать, что между полирибосомами и информосомами существует динамическое равновесие и постоянное соотношение мРНК между ними (например, 20% и 80%) означает,

что в каждый момент транслируется лишь небольшая часть всех матриц. Об этом свидетельствует, например, тот факт, что при дезагрегации полирибосом освобождаются не свободные мРНК, а мРНК-комплексы с плавучей плотностью $\rho = 1,4$, т. е. сходные с информосомами. В совокупности с данными об избытке белков в полирибосомах это позволяет предполагать, что полирибосомы образуются не из свободных мРНК и рибосом, а из рибосом и информосом.

В недавней работе (Dworkin, Infante, 1976) были исследованы неполирибосомные свободные РНП-частицы у зародышей морского ежа. Авторы показали, что эти РНП содержат те же классы РНК, что и в полисомах, но на стадии бластулы отличаются меньшей степенью полиаденилирования (40—50% полиА в полисомах и около 30% в свободных РНП). Содержание свободных РНП в ходе развития уменьшается от 50% всех цитоплазматических новосинтезированных РНК во время дробления до 20% на стадии мезенхимной бластулы. Сравнение скоростей синтеза и времени жизни РНК в ядрах, полисомах и РНП — показывает, что мРНК из свободных РНП могут быть предшественником лишь небольшой части полисомных матриц и что эти РНП-частицы следует рассматривать как некоторый избыток транскрибированных мРНК, используемый в регуляции трансляции.

Очевидно, могут быть и другие предположения. Решение этого вопроса требует новых экспериментов, проведение которых затрудняется прежде всего тем, что масса информосом в клетке слишком мала. Однако очевидно, что РНП-частицы, в состав которых в эмбриональных клетках входит большая часть мРНК цитоплазмы, не могут не играть важной роли в превращениях макромолекул.

Независимо от конкретных механизмов образования информосом и их действительной функциональной роли сама идея комплексов мРНК с белком оказалась чрезвычайно плодотворной и обсуждается в десятках работ в течение последних лет. Решение проблемы, структуры и функции РНП-комплексов, по-видимому, лежит в основе многих проблем регуляции синтеза белка в клетке на уровне трансляции.

Продолжительность жизни информационных РНК

Время жизни мРНК в дифференцированных клетках, по-видимому, не меняется. Концентрация матриц в цитоплазме, необходимая для обеспечения синтеза соответствующих белков, поддерживается на некотором постоянном уровне и определяется соотношением скоростей синтеза новых мРНК в ядрах и их распада в цитоплазме. Но в клетках, в которых характер синтезов изменяется во времени, продолжительность трансляции на молекулах мРНК после их транскрипции, процессинга и выхода в цитоплаз-

му может влиять на характер дифференцировки, существенно модифицируя состав и количественные соотношения синтезируемых белков. Значение продолжительности жизни мРНК как инструмента регуляции синтеза белков особенно отчетливо проявляется в тех дифференцировках, когда синтез новых мРНК еще не начался, как в самом раннем развитии, или уже окончился, как в терминальных дифференцировках типа эритропоэза или спермиогенеза.

У бактерий время жизни мРНК не всегда так коротко, как это полагали прежде, но тем не менее большая часть вновь синтезируемых матриц существует минуты, а меньшая «долгоживущая» часть — десятки минут (Дэвидсон, 1972). В клетках эукариот это время по крайней мере на один или два порядка больше, т. е. короткоживущие мРНК функционируют в пределах часа, а долгоживущие — десятки часов и дни. Так, на клетках культуры тканей получены довольно различные значения. В клетках HeLa время полураспада короткоживущей фракции (33%) — 7 час., а долгоживущей (67%) — 24 часа (Singer, Penman, 1973). В лимфоцитах время полураспада долгоживущей фракции оказалось таким же, но короткоживущей — всего 17 мин. (Berger, Corcoran, 1975).

Применимость актиномицина для определения времени жизни мРНК обсуждалась много раз. Если актиномицин может задерживать процесс транспорта РНК из ядра в цитоплазму, то и время жизни мРНК в присутствии актиномицина может изменяться. Так, по данным Эндо (Endo et al., 1971), это время увеличивается в 1,5—2 раза. Такое «неспецифическое» действие актиномицина может быть связано не только с тем, что он блокирует синтез каких-то РНК или белков, влияющих на время жизни уже синтезированных мРНК, но и с тем, что в норме новые мРНК активно «вытесняют» старые, а после блока транскрипции этого не происходит. Однако, согласно другим данным, актиномицин, напротив, укорачивает время жизни мРНК вдвое (Singer, Penman, 1973).

Различное время жизни мРНК в развивающихся системах прежде всего обнаруживается по постепенности спlicing интенсивности синтеза белка в зародышах с инактивированными ядрами. На рис. 48 приведены данные о снижении синтеза белка у зародышей морского ежа после обработки актиномицином. Если ядра инактивированы в самом начале развития, то весь синтез белка идет только на матрицах, запасенных в оогенезе. Достигнув некоторой максимальной величины, он начинает снижаться, очевидно, за счет того, что часть матриц мРНК перестает функционировать, в то время как другие еще участвуют в трансляции. Актиномициновая обработка на более поздних стадиях также приводит к постепенному уменьшению скорости синтеза по сравнению с контролем, и в этом случае, очевидно, одни мРНК инактивируются раньше, а другие способны функционировать дольше.

Недавно было показано, что в яйцах морского ежа активомидии не влияет ни на время жизни мРНК, ни на синтез белка и поэтому может быть использован в опытах подобного рода (Sargent, Raff, 1976). Среднее время полураспада мРНК в цитоплазме эмбриональных клеток морского ежа оказалось равно 75 мин. (Brandhorst, Humphreus, 1972). По данным (Grainger, Wilt, 1976) оно равно всего 23 мин. Время полураспада отдельно ядерных РНК, мРНК полисом и РНК в РНП-комплексах (информосомах) у зародышей морского ежа соответственно равно 12 мин., 65 мин. и 40 мин. (Dworkin, Infante, 1976). Эти данные, однако, дают мало информации о природе процесса, так как они не позволяют различать, идет ли речь о разной продолжительности жизни одних и тех же или разных видов мРНК. Трудно представить, чтобы в молекуле мРНК был заложен механизм, точно определяющий время ее жизни,— процесс распада мРНК, по-видимому, происходит стохастически и характеристикой продолжительности жизни мРНК, как в атомной физике, может служить время распада половины молекул. Тогда даже для совершенно гомогенной популяции молекул мРНК, синтезированных одновременно и не различающихся по средней продолжительности жизни, мы получим, после актиномицинового блока, асимптотическое снижение интенсивности синтеза белка (см. Лейтин, 1975 а, б).

Данные о постепенном уменьшении конкуренции РНК, взятых с разных стадий раннего развития у зародышей морского ежа, рыб и амфибий (Glâshin et al., 1966; Рачкус и др., 1969; Grippa et al., 1967; Grippa, Gross, 1969) показывают, как в ходе раннего развития, когда синтез РНК отсутствует или очень мал, происходит исчезновение отдельных запасенных в оогенезе видов РНК, время жизни которых, очевидно, короче, чем других. На эмбриональных клетках ксенопуса было показано, что вновь синтезированные (за 30 мин. мечения) полиА-содержащие РНК очень гетерогенны (от 9S до более, чем 40S), а через 5 час. остается менее гетерогенная популяция (9—28S), т. е. большие полиА-содержащие РНК обладают меньшим временем жизни (Sagata et al., 1976).

Известным примером короткоживущих мРНК являются матрицы для синтетазы дельта-аминолевулиновой кислоты, время полужизни которых в печени крыс не превышает одного часа (Tschudy et al., 1965).

К долгоживущим индивидуальным мРНК следует отнести матрицы глобина, функционирующие в ретикулоцитах в течение нескольких дней после их синтеза в эритроблестах (см. выше). Долгое время после прекращения синтеза РНК продолжается синтез фиброина в шелкоотделительной железе шелкопряда. На долгоживущих матрицах происходит очевидно многодневный синтез белков в ходе спермиогенеза, когда после мейоза прекращается всякая транскрипция. Эти примеры иллюстрируют функцию долгоживущих матриц в специализированных клетках, где дли-

тельное время после естественного прекращения синтеза РНК продолжается синтез почти всех белков.

Может быть, более интересны примеры, когда после актиномицинового блока на фоне постепенного снижения общего синтеза белков сохраняется синтез отдельных белков на долгоживущих матрицах. Такие данные получил Кафатос (Kafatos, 1972) на куколках павлиноглазки. После обработки актиномицином включение меченых предшественников в общий белок снижается на 50% за 2,5 часа. Но снижение синтеза специализированного фермента куколки — «коконазы» происходит намного медленнее — на 50% за 99 час. Аналогичное накопление мРНК для синтеза дельта-кристаллина происходит *in vitro* при дифференцировке линзового эпителия в линзовые волокна (Milstone et al., 1976). Накопление мРНК, определяющих преимущественный синтез специфических белков в специализированных клетках, происходит, таким образом, не за счет более интенсивной транскрипции, а за счет большей продолжительности жизни этих мРНК.

По времени жизни мы можем в настоящее время различать в цитоплазме клеток эукариот по крайней мере три группы мРНК. К первой группе относятся немногие короткоживущие мРНК со временами полураспада около 20—60 мин. По-видимому, эти мРНК несут информацию о гистонах, белках ядрышка и некоторых ферментах. Вторую группу составляет основная масса мРНК цитоплазмы со «средним» временем полураспада — от 2—3 до 24 час. И наконец, третья группа — это «долгоживущие» мРНК, в основном кодирующие специфические белки высокоспециализированных клеток, такие как гемоглобин, фиброин, коконаза, белки сперматозоидов и т. д.

Принципиальным является вопрос о том, определяется ли различие во времени жизни мРНК только тем, какой белок они кодируют (т. е. в конечном итоге их первичной структурой), или этот процесс может зависеть от избирательного действия факторов, лежащих вне данной мРНК. Ответ на этот вопрос могут дать данные о так называемой стабилизации мРНК в процессе дифференцировки. При развитии хрусталика в нем уже на ранних этапах дифференцировки начинается синтез специфических белков — кристаллинов. На этих стадиях актиномицин быстро подавляет синтез этих белков, выявляя тем самым короткий срок жизни этих мРНК. Но на следующем этапе развития линзы мРНК, на которых транслируются те же кристаллины, как бы стабилизируются — актиномициновый блок синтеза РНК в ядрах длительное время не влияет на синтез этих белков (Stewart, Paraconstantinou, 1967; Yoshida, Katoh, 1972). Однако пропорции различных белков, синтезирующихся в культуре линзового эпителия в присутствии актиномицина, меняются, показывая тем самым, что в клетках линзы содержатся мРНК с разной стабильностью (Craig, Piatigorsky, 1973).

Печто аналогичное, хотя и без идентификации синтезируемых белков, Газарян наблюдал при дифференцировке клеток кишечного эпителия. В криптах кишечника, где происходят клеточные деления и начинается дифференцировка кишечного эпителия, актиномицин быстро снижает уровень синтеза белка. В клетках ворсинки, где дифференцировка уже завершается, синтез белка подавляется актиномицином позже и в значительно меньшей степени (Газарян и др., 1967). Если в отделах ворсинки синтезируются те же белки, то и этот случай можно рассматривать как пример стабилизации мРНК. Стабилизация мРНК миозина была показана в процессе дифференцировки мышечной ткани. В миоблестах время полужизни 26S РНК, кодирующей большую субъединицу миозина, равно 10 час., в то время как после слияния клеток в микротрубочки это время превышает 50 час. (Buckingham et al., 1974a, 1976).

О механизмах, определяющих время жизни мРНК в цитоплазме, почти ничего не известно. Прежде всего неясно, в какой степени продолжительность существования мРНК в цитоплазме зависит просто от времени или от ее функционирования, т. е. от того, сколько раз на ней происходила трансляция. Очевидно, что следует различать время жизни мРНК в маскированной и в транслируемой форме. Так, мРНК, запасенные в оогенезе, очень долго хранятся в яйце, и время их хранения может варьировать от недель до многих месяцев.

В то же время после начала развития и перехода маскируемой мРНК в транслируемую форму время ее жизни начинает измеряться часами.

Неясен сам механизм распада мРНК — происходит ли он от того, что ее структура необратимо изменяется, нарушается связь мРНК с белком или она подвергается атаке активированных рибонуклеаз. Очевидно, что только после решения этих вопросов можно будет перейти к более трудной проблеме: попытаться понять, почему одни мРНК живут меньше, а другие дольше. Независимо от механизма распада, мРНК, очевидно, должны нести в себе черты, которые или определяют время их жизни сами по себе, или позволяют отличить одну мРНК от другой тем факторам (нуклеазам?), которые вызывают их распад.

На примере миозиновых мРНК методом гибридизации было показано, что коротко (10 час.) и долго (50 час.) живущие мРНК имеют одинаковую первичную структуру (Buckingham et al., 1974a, 1976). Напротив, фрагменту полиА приписывается ведущая роль в определении времени жизни транслируемых мРНК. Так, при инъекции в ооциты лягушки глобиновых мРНК в нативном состоянии, т. е. вместе с полиА-отрезком, и при искусственном отщеплении полиА был получен различный результат. ПолиА-содержащие мРНК могут участвовать в синтезе глобиновых молекул не менее двух недель. В то же время синтез глобина на мРНК, искусственно лишенных полиА, начинается с той же

скоростью, но через несколько часов трансляция замедляется и в течение суток прекращается (Huez et al., 1974).

После процессинга, когда полиА-содержащие глобиновые мРНК выходят в цитоплазму и начинают транслироваться, длина их полиА-фрагментов постепенно уменьшается (Gorski et al., 1974, 1975). Предполагается, что уменьшение осуществляется стохастически под действием эндонуклеаз. Наименьший размер полиА-фрагментов на глобиновых мРНК был 20—35 адениловых остатков. Очевидно, что при меньшей длине полиА мРНК становится нестабильной. Это позволило предложить гипотезу механизма, определяющего среднее время жизни мРНК в цитоплазме: постепенное укорочение полиА, которое в итоге делает матрицу нестабильной (Sheiness et al., 1975).

Вместе с тем показано, что длина полиА-фрагментов определяется не только полиаденилированием в ядрах, но и присоединением адениловых остатков в цитоплазме, и размер полиА-фрагментов определяется, очевидно, соотношением скоростей этого процесса и деградации (Diez, Brawerman, 1974; Brawerman, Diez, 1975; Brandhorst, McConkey, 1975). Гипотеза о роли полиА, однако, не может пока объяснить ни различий во времени жизни разных мРНК, ни механизма деградации собственно мРНК после укорочения полиА-фрагмента, ни регуляции времени жизни мРНК, изначально лишенных полиА.

БЕЛОК

Синтезом белковой молекулы завершается тот отрезок цепи преобразований наследственной информации, который принято считать предметом изучения молекулярной биологии. После образования белка начинается следующий, значительно менее изученный этап — становление функций и возникновение новых надмолекулярных, внутриклеточных и надклеточных структур — процессов, составляющих существо морфогенеза. Если искусственно ограничиться только рассмотрением синтеза белка, то все развитие может быть описано как процесс смены белков — различных на разных стадиях развития и в разных частях зародыша. Очевидно, что эта смена белков должна отразить все процессы морфогенеза и все вновь возникающие функции, которые контролируются наследственным аппаратом. Тем не менее сведений о такой смене белков пока намного меньше, чем можно было бы ожидать.

В процессе развития появляются новые белки, но количество вновь синтезированных белков невелико относительно массы белков яйца, замена которых происходит медленно. В яйцах с неполным дроблением — у рыб и в еще большей степени у птиц и рептилий — зародыш отделен от запасных белков желтка, и его рост достаточно красноречиво свидетельствует о новообразовании белков в развитии. Проявлением такого же новообразования является и рост зародыша млекопитающих.

Среди синтезирующихся белков следует различать те виды, которые присутствовали в яйце и лишь возобновляются в ходе развития, и те, которые впервые появляются на той или иной стадии. Такое разделение не может быть слишком строгим, и многие ферменты, казалось бы, существующие на всех стадиях развития, в действительности заменяются — образуются их новые изозимы. Для многих белков очевидно, что они впервые появляются в определенных тканях и на определенных стадиях. В первую очередь это относится к таким тканеспецифическим белкам, как, например, мышечный миозин, гемоглобин, коллаген, кристаллины хрусталика. С определенными этапами развития и началом специфических функций связано появление фермента вылупления, пищеварительных ферментов поджелудочной железы, холинэстеразы и др. Общее число таких новых, известных в настоящее время белков измеряется десятками.

В то же время очевидно, что при самых заниженных оценках число функционирующих в развитии структурных генов и, соответственно, число новых белков должно измеряться тысячами, если не десятками тысяч. Особенно ценными были бы сведения о белках, специфически определяющих форму, перемещения и взаимные отношения клеток, т. е. процессы морфогенеза. То, что такие белки существуют, не вызывает сомнений — многие мутации, блокирование синтеза РНК или синтеза белка довольно быстро приводит к нарушениям или остановке морфогенеза. Однако до настоящего времени о белках морфогенеза почти ничего не известно. Первыми кандидатами в такие белки являются тубулин, образующий в клетках микротрубочки, и актиноподобный белок, образующий микрофиламенты и влияющий на форму и движение клеток.

Поразительно, что бедность наших знаний о «белках развития» сочетается со все развивающейся техникой разделения белков, успехами иммунологической техники, позволяющими, казалось бы, выделять и идентифицировать любые белки. Дело, вероятно, в том, что белки, контролирующие морфогенез, присутствуют в зародыше в незначительных количествах, сотни раз меньших, чем остальные белки. Кроме того, эти белки скорее всего нерастворимы при обычных условиях экстракции. И, наконец, главное — нам пока неизвестны специфические тесты на эти белки, позволяющие отличить их от «неморфогенетических» белков и друг от друга.

Исследование синтеза белка кажется несложным, если отождествлять его с определением включения меченых аминокислот в тотальный белок. Задача серьезно усложняется, если предметом исследования являются индивидуальные белки зародыша. Их получение в достаточном количестве и очистка от загрязнений другими мечеными белками представляют серьезные трудности, и такой подход использовали пока в немногих работах. Корректное сравнение скорости синтеза белка на разных стадиях или в разных частях зародыша ставит сложную задачу учета удельной радиоактивности аминокислотного пула.

Непосредственным предшественником молекулы белка являются активированные аминокислоты (аминоацил-тРНК), но измерение их удельной радиоактивности необходимо только в тех случаях, когда определяется действительная скорость синтеза, т. е. удлинение полипептидной цепочки за единицу времени.

Определение действительной скорости синтеза — специальная задача, в решении которой редко возникает необходимость. Значительно чаще сравнивается скорость синтеза белка на разных стадиях развития, в разных тканях, либо в нормальных тканях и после экспериментального воздействия. В этом случае сравнение правомерно только тогда, когда есть уверенность, что удельные радиоактивности активированных аминокислот у сравниваемых тканей или клеток одинаковы.

Проблему можно упростить, если принять, что скорость образования аминоксил-тРНК, т. е. активность аминоксил-тРНК-синтаза и концентрация тРНК на разных стадиях или в разных зачатках одинакова или достаточно высока. В таком случае удельная радиоактивность аминоксил-тРНК будет пропорциональна удельной радиоактивности свободных аминокислот. Однако и определение удельной радиоактивности аминокислот в целом зародыше может оказаться недостаточным, так как вполне вероятно, что состав аминокислотного пула и удельная радиоактивность его в разных частях зародыша и в разных тканях различны. То, что это реально, можно видеть из данных Дейчар (Deuchar, 1963a) (рис. 42).

В некоторых случаях, когда сравнение скорости синтеза белка проводится на двух близких по времени этапах развития, например до и сразу после оплодотворения, используют прием, который получил название «предварительной нагрузки» (preloading). Яйцо до оплодотворения инкубируют заранее с меченой аминокислотой, полагая, что после проникновения последняя образует некоторый пул, удельная радиоактивность которого и активность образования аминоксил-тРНК мало изменятся на исследуемом отрезке развития. В ряде опытов действительно было показано, что радиоактивность пула аминокислот меняется мало и ошибки, связанные с ее возможным изменением, не очень велики. Тем не менее, как это уже отмечалось, когда речь шла об исследовании синтеза РНК, помнить об источнике подобной ошибки несомненно надо и чем ответственнее или неожиданнее полученный результат, тем большее внимание должно быть уделено вопросу определения удельной радиоактивности аминокислотного пула.

О появлении новых белков или об изменении их количества можно судить не только работая с индивидуальными белками, полученными из ткани, органа или целого зародыша. Более простым способом является измерение ферментативной активности. Однако и этот широко используемый метод может привести к серьезным ошибкам, если не учитывать, что в ходе развития ферменты могут менять свою внутриклеточную локализацию, активироваться или инактивироваться.

Наиболее важным в проблеме образования белков в развитии является регуляция их синтеза на уровне транскрипции и трансляции. Корреляцию между синтезом мРНК и синтезом белка обычно установить трудно, так как методы тестирования и выделения индивидуальных мРНК значительно сложнее, чем методы определения и выделения белков. Однако использование генетических методов и избирательного ингибирования матричного синтеза РНК позволяет выявить регуляцию синтеза белка на уровне транскрипции. Изменения в характере синтеза белка, которые происходят в отсутствие генетического контроля и при его искусственном подавлении, могут рассматриваться как проявление регуляции на уровне трансляции.

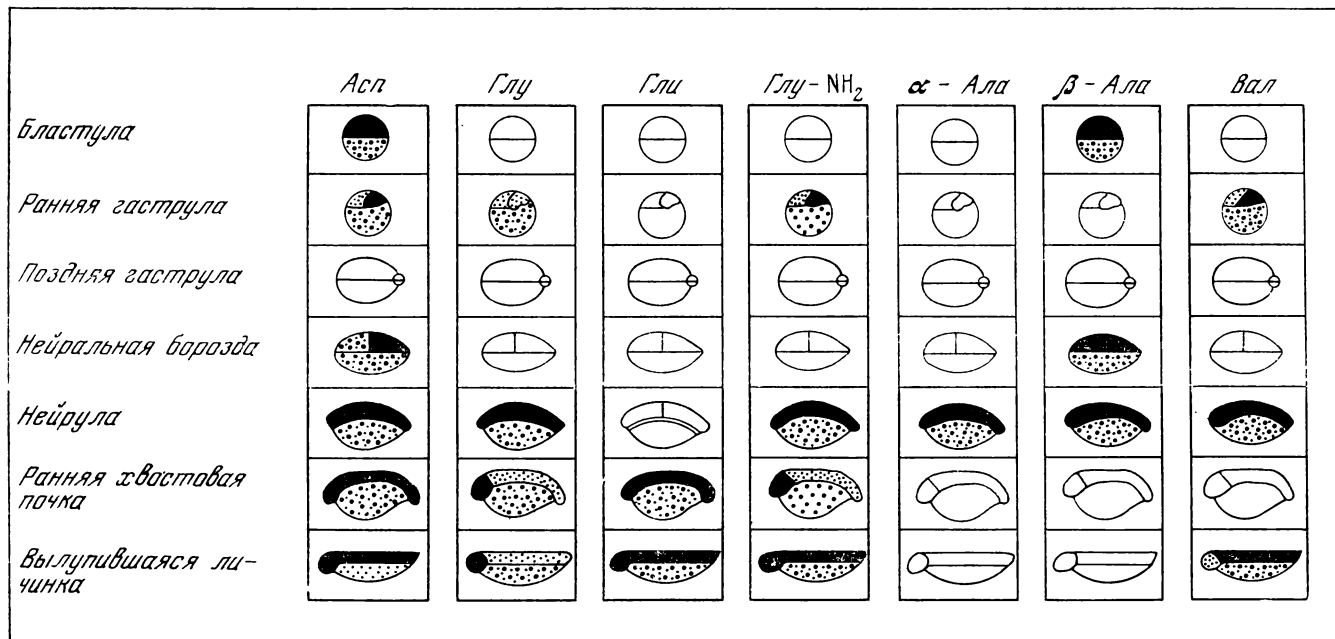


Рис. 42. Изменения концентрации и регионального распределения свободных аминокислот у зародышей ксенопуса. Черным показана высокая концентрация, белым — низкая, точки — промежуточная (Deuchar, 1963)

Образование желтка

Яйцеклетки различных животных могут различаться по диаметру в десятки тысяч раз: 7 мкм у паразитических перепончатокрылых насекомых и $22 \cdot 10^4$ мкм у одного из видов акул (Шмидт, 1951). По объему эти различия составляют 13 порядков. Размеры яиц в основном определяются количеством запасенных веществ, из которых основным является желток. Поэтому суммарный химический состав мелких яиц (яйца ос-наездников, яйца млекопитающих, яйца иглокожих и некоторых других морских беспозвоночных) должен мало отличаться от химического состава соматических клеток. Напротив, особенно большие яйца птиц, рептилий и некоторых рыб почти целиком заполнены желтком, и их суммарный химический состав близок к составу желтка.

Желток, кроме белков, содержит значительные количества нейтрального жира и фосфолипидов. Как правило, он находится в желточных гранулах (пластинках, шарах), но у некоторых рыб в конце вителлогенеза эти гранулы сливаются в одну желточную массу (жидкий желток, ихтулин). Различают желточные гранулы или желток с большим содержанием жира (жировой желток), полисахаридов (углеводный желток) или белка (белковый желток). Образование углеводного и жирового желтка, как правило, предшествует образованию белкового желтка (см. Равен, 1964). Наибольшую долю белка желточных гранул (белкового желтка) и, следовательно, белка больших яиц составляют липовителлин и фосфитин. Как следует из названия этих белков, они содержат значительные количества липидов и фосфора.

Яйца различных животных различаются не только по количеству в них желтка, но также по строению и расположению желточных гранул, что подробно описано в соответствующих разделах руководств по эмбриологии.

Относительно происхождения желточных гранул существует множество морфологических исследований, в которых образование гранул желтка связывают со специальным желточным ядром, митохондриями, аппаратом Гольджи и т. д. (Ward, 1962). Морфологическая связь с этими структурами не вызывает сомнений, но собственно синтез белков желтка может происходить в самом яйце или такие белки могут поступать в яйце извне.

Можно различать три источника желточных белков в оогенезе — синтез в самом яйце, синтез в окружающих яйцо клетках и синтез в отдаленных частях организма и поступление белков желтка в ооцит через кровь. Последний путь сейчас изучен, вероятно, наиболее полно в отношении желточных белков яиц амфибий и птиц — их липовителлина и фосфитина (см. обзоры Wallace, Bergink, 1974; Tata, 1976). Как показано на лягушке (Rudack, Wallace, 1968; Wallace, Dumont, 1968) и на птицах

(Glavert, 1953), белки желтка синтезируются в печени. Синтез этих белков сопровождается присоединением к ним кальция, фосфата и липидов, поступающих в печень из кровяного русла. В кровь поступает белок-предшественник — Са-фосфолипопротеин или вителлогенин с мол. весом $5 \cdot 10^5$, содержащий 8—13% липидов и 1,4% фосфора (Wallace, Dumont, 1968). Фосфолипопротеин аккумулируется ооцитами посредством пиноцитоза; по-видимому, это единственный путь массового прохождения белка через клеточную мембрану. В ооците, очевидно, вблизи его поверхности, фосфолипопротеин распадается на два белка — липовителлин и фосфитин, которые включаются в состав желточных гранул (Dehn, Wallace, 1973). Если вителлогенин инъецировать внутрь ооцита, он деградирует, не превращаясь в желток, как это было показано на ооцитах ксенопуса (Dehn, Wallace, 1973).

Быстрое вхождение вителлогенина в ооциты очевидно обеспечивается специфическими рецепторными местами на мембране, так как другие белки проникают в ооцит во много сот раз медленнее (Wallace, Jared, 1976). В этом процессе участвуют фолликулярные клетки и он контролируется гонадотропным гормоном (Follet et al., 1968).

Липовителлин имеет мол. вес около 190 тыс. и содержит фосфолипиды (20% липидов). Второй белок, фосфитин, имеет небольшой мол. вес, порядка 35 тыс., содержит до 10% фосфора, т. е. один фосфатный остаток приходится на три остатка аминокислот. Фосфитин содержит 56% серина (Tata, 1976). В желтке лягушки липовителлин и фосфитин находятся в весовом соотношении 10:2, а в молекулярном — 1:1. В желточных гранулах они образуют плотную кристаллическую структуру и составляют не менее 98% содержания гранулы, которая окружена тонкой липопротеиновой мембраной. В состав белков яйца входит еще один компонент — ливетин, который ранее отождествлялся с белками сыворотки крови (Jared, Wallace, 1968).

Фосфолипопротеин, который легко определить по содержанию щелочнолабильного фосфора, отсутствует в крови самцов и имеется в незначительных количествах в крови самок. После эстрадиоловой индукции он появляется у самцов и резко увеличивается его количество у самок (Wallace, Dumont, 1968; Tata, 1976). При инъекции меченых предшественников — аминокислот или ^{32}P -фосфата удельная активность фракции фосфолипопротеина у самок выше, чем у самцов, ввиду быстрого потребления этого белка ооцитами яичников. Ранее (см., например, Романов, Романова, 1959) у птиц в желтке яйца различали несколько белков; сейчас можно думать, что основную массу их также составляют липовителлин и фосфитин.

Синтез белков желтка происходит в печени не только у амфибий и птиц, где этот факт установлен экспериментально. Увеличение размеров печени перед вителлогенезом и затем ее уменьшение во время оогнеза отмечено также у рыб.

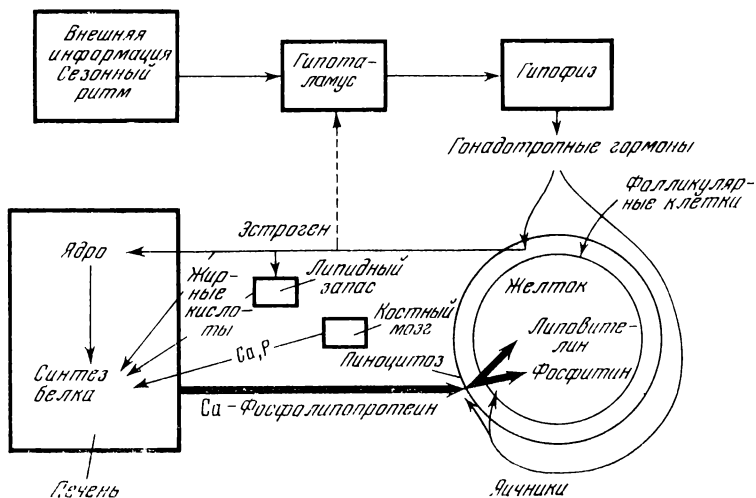


Схема 2. Вителлогенез и его регуляция у ксенопуса (Follett et al., 1968)

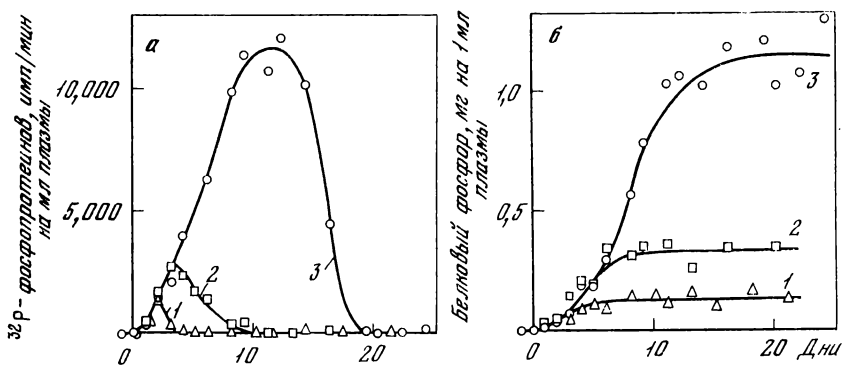


Рис. 43. Индукция эстрадиолом синтеза фосфопротеинов желтка в печени и их накопления в плазме крови у самцов ксенопуса

Самцам однократно вводили 0,1 (1); 0,25 (2); или 1 МЕ (3) 17 β -эстрадиола и через разное время определяли в крови интенсивность синтеза (а) — по включению ³²Р-фосфата в белки плазмы и количество (б) фосфопротеинов. Синтез фосфопротеинов и их накопление в крови зависят от дозы гормона (Wallace, Jared, 1968)

Имеется довольно много данных о гормональной регуляции синтеза белков яйца в печени (Follett et al., 1968; Wittliff, Kenney, 1972, a, b) (схема 2).

Под влиянием внешних факторов (температура, длина светового дня) гипоталамус активирует в гипофизе синтез гонадотропных гормонов, которые стимулируют в яичнике образование эстрогена. Эстроген активирует в клетках печени синтез предшественника желтка — Са-фосфолипопротеина, для чего использу-

ются резервы липидов в жировой ткани и фосфора и кальция — в кости. Под влиянием гонадотропных гормонов кальций фосфолипотеин проникает в ооцит путем пиноцитоза и распадается там на белки желтка — липовителлин и фосфитин. К синтезу белков яйца компетентными оказываются не только печень самки, но и самца: через 3 часа после введения самцам или самкам хориогонина или 17 β -эстрадиола в печени начинается синтез тРНК, рРНК и белков. У шпорцевой лягушки *X. laevis* (ксенопуса) синтез липовителлина в печени начинается на больших (30—40 рибосом) полирибосомах (Roskam et al., 1976) через 9—12 час. после индукции эстрогеном (рис. 43). Этому предшествует синтез богатых уридином РНК, затем рРНК (Witliff, Kenney, 1972b). Синтезированные молекулы белков желтка поступают в кровь. У самок они довольно быстро переходят в ооциты, у самцов при эстрогенной индукции они продолжают циркулировать в крови в течение длительного времени (Wallace, Dumont, 1968; Follet et al., 1968; Tata, 1976). Процесс пиноцитоза белка ооцитами идет через посредство фолликулярных клеток и контролируется гонадотропным гормоном.

У многих насекомых местом внеооцитарного синтеза белка является жировое тело, в котором образуется вителлогенин, поступающий посредством пиноцитоза в ооциты (Telfer, Melins, 1963; Roth, Porter, 1964; Telfer, 1965; Pan et al., 1969; Bell, Barth, 1971; Hausman et al., 1971).

Инициация синтеза вителлогенина в жировом теле насекомых осуществляется под контролем ювенильного гормона, который вырабатывается *corpus allatum* (Bell, Barth, 1971). Ювенильный гормон контролирует не только секрецию вителлогенина, но и избирательный захват его из гемолимфы ооцитами. Если самцам таракана *Eublaberus posticus* с лигатурой протока, идущего от *corpus allatum*, имплантировать яичники, то инъекция желтка не сопровождается вителлогенезом в ооцитах. Только введение ювенильного гормона вызывает активное накопление желтка (Bell, Barth, 1971).

Ряд представителей насекомых (отряды Neuroptera, Diptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Coleoptera) имеют нутриментарный тип оогенеза, при котором в образовании ооцитов участвуют питающие клетки. Однако и в этом случае основным источником белков желтка не являются питающие клетки, которые активны только на начальных этапах роста ооцита, и к началу интенсивного образования желтка в ооците дегенерируют (Равен, 1964).

У некоторых видов первичноротых питающие клетки участвуют в образовании желтка. Так, яичники коловраток разделены на желточник (*vitellarium*), содержащий питательные клетки (обычно 8 слившихся клеток с крупными ядрами), и участок, дающий начало собственно ооцитам. Ооциты растут за счет содержимого питающих клеток. Еще более интересны отношения при образовании желтка между питающими клетками и ооцитом

у плоских червей *Turbelaria*. Зрелые ооциты у этого объекта очень бедны желтком. Накопление желтка происходит в питающих клетках, локализованных в желточнике. При откладке яиц один или несколько ооцитов и питающие клетки окружаются общей яйцевой оболочкой. Во время развития зародыша желток питающих клеток используется так же, как у других животных используется желток, содержащийся внутри ооцита (Равен, 1964). В этом случае остается невыясненным источник белков для построения желтка питающих клеток, синтезируются ли они в них самих или поступают через кровь от какого-то иного источника.

Роль фолликулярных клеток в образовании желтка не вполне ясна. В тех случаях, когда вителлогенин синтезируется вне ооцита (в печени у амфибий, птиц или в жировом теле у насекомых), фолликулярные клетки участвуют только в переносе белков из крови в ооцит.

Но и в самих фолликулярных клетках иногда, по-видимому, может идти синтез белков желтка. У домашней мухи, например при инкубации яичников вне тела самки, включение белковой метки через 30 мин. обнаруживается в фолликулярных клетках. Через 1 час метка мигрирует в желток ооцита (Chia, Morrison, 1972). Наконец, местом синтеза белков желтка может являться и собственно цитоплазма ооцита. Это было выявлено у червей (Dumont, 1969) и особенно явно у некоторых ракообразных, в частности, у речного рака *Orconectes immunis* (Kessel, 1968; Ganion, Kessel, 1972). В ранних исследованиях было описано, что в ооцитах рака непосредственно перед вителлогенезом происходит развитие эндоплазматического ретикулума. В период формирования желтка в ретикулуме образуются гранулы, которые сначала локализуются в цистернах ретикулума, а затем транспортируются к желточным гранулам (Beams, Kessel, 1962). С помощью радиоавтографии яичников, инкубированных *in vivo* и *in vitro*, показано, что включение меченых аминокислот происходит во время вителлогенеза, причем метка сначала обнаруживается в области рибосом на эндоплазматическом ретикулуме, затем вокруг желточных гранул и, наконец, прямо над ними. В то же время при трансплантации немеченых яичников в кровяное русло рака с предварительного мечеными белками крови метка в ооциты практически не переходит. Очень небольшая метка, которая при этом обнаруживается в ооците, локализуется не над желточными гранулами. Хотя все это авторы рассматривают как доказательства синтеза основной массы белкового желтка внутри ооцита, они не исключают и экзогенный источник белка, в частности фолликулярные клетки (Ganion, Kessel, 1972). Действительно, во всех опытах использовали не ооциты, а ткань яичника, поэтому нельзя исключить поступление белка из окружающих клеток, в которых происходил активный синтез белка.

Синтез белка внутри самих ооцитов показан и у морских ежей (Piatigorsky et al., 1967; Monroy, 1967; Giudice et al., 1972b;

см. Giudice, 1973; Rinaldi, Parente, 1976). Однако в старых морфологических описаниях оогенеза (Lindahl, 1932) говорится о том, что в яичнике морских ежей имеются амебоидные клетки, фагоцитирующие остаточные ооциты. Эти клетки попадают в полость яичника и образуют синцитий, наполненный каплями липидов и гранулами. С помощью псевдоподий синцитий прикрепляется к поверхности растущего ооцита. По-видимому, содержимое синцития переносится внутрь ооцита, так как по мере увеличения последних количество гранул и капель липидов в синцитии уменьшается.

Таким образом, и в этом случае можно предполагать наличие двух источников образования белкового желтка ооцита.

Синтез белков ооцита

Помимо запасных белков типа вителлинов, в растущем ооците происходит увеличение количества различных структур и содержания различных функционально активных белков (Heideman et al., 1975). На самых ранних стадиях происходит параллельный рост ооцита и его ядра, в результате чего ядро увеличивается до размеров, во много раз превосходящих размеры обычных ядер. В таком ядре — зародышевом пузырьке — располагаются хромосомы, которые у многих видов животных принимают структуры ламповых щеток. Кроме того, часто имеется либо крупное ядрышко, по объему во много раз большее, чем ядрышки соматических клеток, или множество мелких ядрышек, образующихся вокруг амплифицированной ДНК (подробно об этом см. главу I).

Образование большего по размеру или дополнительных ядрышек несомненно требует значительного количества ядрышковых белков, которые, очевидно, синтезируются на самых ранних этапах оогенеза. Объем кариоплазмы также превышает объем обычных ядер соматических клеток. Содержание белка в ядре ооцитов лягушки равно $15-20 \cdot 10^{-7}$ г, в хромосомах — $3,5 \cdot 10^{-7}$ г. Отношение белок : ДНК в ядре равно 1060, в хромосомах — 550. Эти величины в 150—300 раз больше, чем в ядрах соматических клеток. Например, в хроматине печени рогатого скота отношение белок : ДНК равно 3 (Izawa et al., 1963b).

Синтез ядерных белков в оогенезе обнаруживается автордиографически и биохимически. Так, активный синтез белков хромосомного аппарата показан в работе Гола и Кэлана (Gall, Callan, 1962). При введении ^{14}C -фенилаланина самкам лягушек меченые белки появляются в петлях хромосом, равномерно покрывая их, уже через сутки после инъекции.

В раннем ооците белковая метка оказывается выше в ядре, чем в цитоплазме (Ecker, Smith, 1971). Это, однако, не доказывает, что синтез белка идет в ядре, а лишь может свидетельствовать о высокой скорости образования ядерных белков и относительно быстрой миграции их внутрь ядер (Feldherr, 1975; Bravo,

Allende, 1976). Однако в цитоплазме ооцита существует пул ядерных белков, которые постепенно, в течение нескольких часов, входят в зародышевый пузырек (Feldherr, Richmond, 1976).

В состав белков, накапливаемых в кариоплазме, наряду с обычными белками ядер должны входить и специализированные белки ооцита. К числу их относится, например, «фактор дробления», белковая природа которого очень вероятна. У созревающих без зародышевого пузырька яиц лягушки и севрюги после оплодотворения или активации не наблюдается правильного дробления (Детлаф и др., 1965; Скоблина, 1970). Инъекция содержимого зародышевого пузырька в энуклеированное яйцо восстанавливает его способность к дроблению (Smith, Ecker, 1969).

В зародышевом пузырьке большого ооцита содержится также «фактор синтеза ДНК» — возможно специфическая эндонуклеаза ДНК (Venbow, Ford, 1975).

Наконец, получены данные, что в ооците, в зародышевом пузырьке, к моменту созревания имеются факторы, которые определяют прохождение зародышем стадии ранней дифференцировки (гастролы, нейруляции). Хэмфри обнаружил, что яйца мексиканского аксолотля, несущие мутацию «о», способны развиваться только до стадии гастролы. Эта мутация «о» рецессивна, т. е. гетерозиготы $+/o$ не имеют каких-либо отклонений от нормального развития. Однако при скрещивании таких гетерозигот одна четвертая полученных особей представляет собой гомозиготы — o/o . Они развиваются до взрослого состояния, причем половину представляют стерильные самцы. Другую их половину составляют самки, яйца которых после оплодотворения спермой любого типа ($+/+$ или $+/o$) (Humphreys, 1966) развиваются лишь до стадии средней — поздней гастролы.

Следовательно нормальная («дикая») аллель гена «о» функционирует в оогенезе, но определяет не сам оогенез, а прохождение стадий гастрологии — нейруляции. Продукты этого гена накапливаются в зародышевом пузырьке. Если содержимое зародышевого пузырька нормальных особей ($+/+$) инъецировать в яйцо, полученное из самки o/o , то такие зародыши способны нормально развиваться (Briggs, Cassens, 1966).

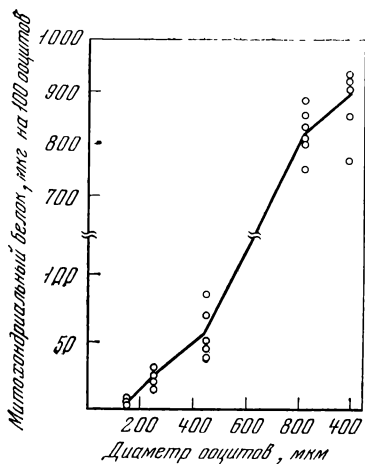
По некоторым показателям (температура инактивации, чувствительность к протеазам, осаждение в сульфате аммония и др.) этот «о»-фактор является белком. Пока существует зародышевый пузырек, он накапливается в нем (но, очевидно, синтезируется в цитоплазме), а при созревании и разрыве зародышевого пузырька выходит в ооплазму.

Таким образом, в ходе оогенеза происходит, помимо синтеза обычных ядерных белков (белков ядрышек, кариоплазмы, хромосом), синтез белков, специфических для ооцитов и используемых в последующем развитии.

В цитоплазме растущего ооцита увеличивается не только общая масса цитозоля, но и количество клеточных структур,

Рис. 44. Накопление митохондриального белка в ходе оогенеза вьюна

Из ооцитов разного размера выделяли митохондрии и определяли в них количество белка. Количество митохондриального белка увеличивается в ооцитах на два порядка (Озернюк, 1972)



таких, как митохондрии, рибосомы, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи. У рыб, например, общее количество митохондриальных белков на ооцит увеличивается в течение всего оогенеза, но особенно интенсивно этот процесс происходит в период вителлогенеза. В оогенезе вьюна в период малого роста скорость увеличения массы митохондриальных белков превышает скорость роста всего ооцита, и потому концентрация митохондрий увеличивается. Во время вителлогенеза масса митохондрий возрастает еще в 12 раз, но объем ооцита за счет отложения желтка увеличивается быстрее, и концентрация митохондрий уменьшается к моменту созревания до исходной величины (Озернюк, 1972; Озернюк, Пальмбах, 1975) (рис. 44).

Яйцо мыши содержит около 90 тыс. митохондрий (Piko, Matsumoto, 1976), что в пересчете на объем цитоплазмы вдвое выше, чем в клетках взрослой печени. Однако, так как размер митохондрий яйца намного меньше, занимаемый ими объем (2,5%) в восемь раз меньше, чем объем митохондрий в печени (20%). Митохондрии яйца увеличиваются в размерах, начиная со стадии 4—8 бластомеров (Piko, Chase, 1973).

Увеличение количества митохондрий является результатом их размножения — новообразования самих структур внутри ооцита. У насекомых, у которых важную роль играют питательные клетки, описан также процесс прямого перехода митохондрий из питательных клеток в ооцит (Равен, 1964).

В ходе оогенеза значительно увеличивается масса рибосом (см. главу II) и рибосомальных белков (Hallberg, 1974). Максимум интенсивности образования рибосом приходится на период вителлогенеза (Mairy, Denis, 1972). В период малого роста в ооцитах амфибий накапливаются также особые частицы 42S РНП, содержащие 5S рРНК и тРНК. Белковый компонент этих частиц

не относится к рибосомным белкам. Постепенное использование 5S рРНК для новообразования рибосом приводит к распаду частиц 42S и, по-видимому, к исчезновению входящего в них белка (Thomas, 1970; Mairy, Denis, 1972).

Кроме общеклеточных структур — митохондрий, рибосом, в ооците появляются такие специфические для яйца структуры, как кортикальные гранулы, пористые мембраны (Равен, 1964; Айзенштадт, 1965; Айзенштадт, Детлаф, 1972). Основным источником синтеза всей массы функционально активных белков и структур является, по-видимому, собственно цитоплазма ооцита. Точно оценить долю белков, синтезированных в ооците и поступающих в него извне, трудно, так как нет достоверных критериев для того, чтобы отличить одни белки от других.

Прямые доказательства синтеза белка в цитоплазме ооцитов приводятся в работе Голда (Gould, 1969a). В этом случае ооциты червя *Urechis caupo* извлекали и инкубировали *in vitro* с мечеными аминокислотами в отсутствие фолликулярных и питающих клеток. В таких незрелых ооцитах радиоавтографически показан интенсивный синтез белка.

Можно считать, что экзогенными являются запасные белки желтка, а эндогенными — остальные белки ооцита, хотя, как уже говорилось выше, есть животные, например, речной рак, у которого вителлогенины также синтезируются в цитоплазме самого ооцита (Ganion, Kessel, 1972).

Способность белоксинтезирующей системы ооцита амфибий к трансляции, в том числе экзогенных матриц, иллюстрируется многочисленными опытами с инъекцией различных мРНК (см. Gurdon, 1974). Высокая эффективность трансляции была показана на таких матрицах, как мРНК промелитина (Kindas-Mügge et al., 1974), что говорит об отсутствии видо- и тканеспецифичности рибосом и набора тРНК в ооците.

Доля экзогенных белков, очевидно, выше в крупных яйцах и очень мала в тех яйцах, где желтка практически нет. Вместе с тем очевидно, что в крупных яйцах больше не только желтка, но и других структур, имеющих явно эндогенное происхождение. Так, например, количество рибосом, как и количество митохондрий, пропорционально размеру яиц, и, следовательно, в крупных яйцах синтезируется рибосомных белков и белков митохондрий во много раз больше. Это же относится к белкам зародышевого пузырька. В маленьких почти лишенных желтка яйцах доля эндогенных белков составляет, вероятно, 90—95%, но и в больших также вряд ли меньше 10%.

Очень показательны в отношении роли собственного генома ооцита в синтезе белков опыты Блеклера на двух видах ксенопуса (Blackler, 1970), который пересаживал участки зародыша, содержащие гоноциты от *Xenopus tropicalis*, в нейрулу *X. laevis*. В результате этих опытов развивались нормальные лягушки *X. laevis*, в яичниках которых содержались отдельные яйцеклетки

с генотипом *X. tropicalis*. Все соматическое окружение таких яйцеклеток — фолликулярные клетки, строма яичника, эндокринные железы, печень, синтезирующая желток, — принадлежало *X. laevis*. Тем не менее по своим размерам (яйца *X. tropicalis* значительно меньше яиц *X. laevis*), пигментации и характеру развития эти яйца сохраняли все черты *X. tropicalis*. Исключение составляла их способность оплодотворяться спермой *X. laevis*. В контроле яйца *X. tropicalis*, выросшие в организме самок своего вида, оплодотворялись чужой спермой лишь в 1% случаев, в то время как яйца *X. tropicalis*, выросшие в теле *X. laevis*, оплодотворялись спермой *X. laevis* на 95%. Это объясняется, однако, скорее всего не изменением кортикального слоя яйцеклетки, а свойствами студенистой оболочки яйца, которая целиком принадлежит реципиенту — *X. laevis*, так как образуется на поверхности яйца за счет секреции клетками яйцевода при прохождении по нему яйца. Очевидно, что желток в этих яйцах также принадлежит *X. laevis*, так как синтезирован в печени животного этого вида, но количество поступающего желтка определяется генотипом ооцита, о чем говорят малые размеры ооцита, характерные для *X. tropicalis*. Было бы важно проверить видовую специфичность остальных белков яйца, так как очевидно, что метод пересадки гоноцитов позволяет различать белки экзогенного и эндогенного происхождения, если они имеют видовые отличия.

Приблизительную оценку количества видов, синтезируемых в оогенезе белков, можно получить на основании данных о числе активных генов. Самая низкая оценка (см. главу II) составляет около 1%. Если считать, что из числа работающих генов только $\frac{1}{10}$ структурные (оценка эта совершенно произвольна), то и тогда в оогенезе амфибий должно синтезироваться не менее 10^4 различных видов белка. Эта цифра не должна казаться чрезмерно большой, если вспомнить, что нам сейчас известно не менее тысячи ферментов, и большинство из них может быть обнаружено в яйцеклетках.

Для подтверждения правильности этой оценки можно привлечь и данные по конкурентной гибридизации, которые показывают, что из числа видов РНК, синтезированных в ооцитах, около одной трети расходуется целиком во время оогенеза, т. е. служит матрицами для синтеза белков яйца и уже не участвует в белковом синтезе после оплодотворения (Cipra et al., 1967).

В заключение можно привести данные из работы Беккена (Bakken, 1973), проведенной на дрозофиле, в которой рассмотрены способы проявления 98 аутосомных мутаций, приводящих к стерильности самки, т. е. так или иначе влияющих на оогенез или откладку яиц. Эти мутации нарушали строение яичника, синтез и отложение желтка, дифференцировку питающих клеток, образование хориона (оболочки яиц), овуляцию и откладку яиц или приводили зародыш к гибели на самых ранних стадиях эмбриогенеза. Из 98 мутаций, обнаруженных Беккеном, только

часть касается генов, контролирующих метаболиты в самом ооците. Однако их распределение показывает, что хотя значительная доля генов функционирует вне яйца и определяет условия прохождения оогенеза — образование фолликулярных и питающих клеток, синтез желтка — большинство генов оогенеза определяет синтез белков в самом яйце.

Накопление различных белков в яйце происходит неравномерно. Так, например, соотношение активностей ферментов гликолиза меняется довольно существенно в оогенезе вьюна (Мильман, Юровицкий, 1973). Активность тирозиназы в ооците ксенопуса индуцируется хоригонином, но эта активация особенно эффективна в ооцитах стадий III и ранней IV и меньше на стадиях II и V (Erpig, Dumont, 1974).

В ходе оогенеза создается неравномерность распределения белков в яйце. Так, антигенный состав яйца дрозофилы оказывается различным в передней и задней частях яйца (Graziosi, Roberts, 1975). Эти различия, очевидно, отражают особенности зародышевой плазмы яйца (Illmensee, Mahowald, 1976).

Синтез белка в ооцитах амфибий замедляется или прекращается к моменту завершения вителлогенеза, к окончанию периода большого роста ооцита. Синтез вновь возобновляется при созревании ооцита, и этот процесс активируется гонадотропным гормоном (Smith et al., 1966; Ecker et al., 1968). Однако у морского ежа синтез белка в ооцитах и в зрелых неоплодотворенных яйцах происходит с одинаковой скоростью, которая резко возрастает после оплодотворения (рис. 45) (Rinaldi, Parente, 1976).

Количество белков в яйце за короткое время созревания, очевидно, увеличивается незначительно, но эти белки необходимы для осуществления созревания. Ингибиторы белкового синтеза — пурамицин или циклогексимид — блокируют созревание ооцитов амфибий (Dettlaff, 1966; Brachet, 1967; Dettlaff, Skobolina, 1969), иглокожих и червей (Zampetti-Bosseler et al., 1973).

Электрофоретический спектр белков, синтезируемых в ооците лягушки при созревании, несколько отличается от спектра белков, определяемого тем же способом в яйце после оплодотворения (Ecker, Smith, 1971). Значительная часть этих белков концентрируется в зародышевом пузырьке — интенсивность автордиографической метки над ним в 6—7 раз больше, чем над цитоплазмой. Ядерные белки, синтезированные во время созревания, сохраняются в яйце и после разрыва зародышевого пузырька. По мере увеличения числа ядер в ходе делений дробления эти белки концентрируются в ядрах зародыша. Если ядра из клеток зародыша на стадии бластулы трансплантировать в яйцо, меченные при созревании белки быстро мигрируют внутрь этих ядер (Ecker, Smith, 1971). Характер синтеза и спектр синтезированных при созревании ооцитов белков не меняются, если предварительно удалить зародышевый пузырек. Это означает, что матрицы мРНК для синтеза этих белков транскрибируются и посту-

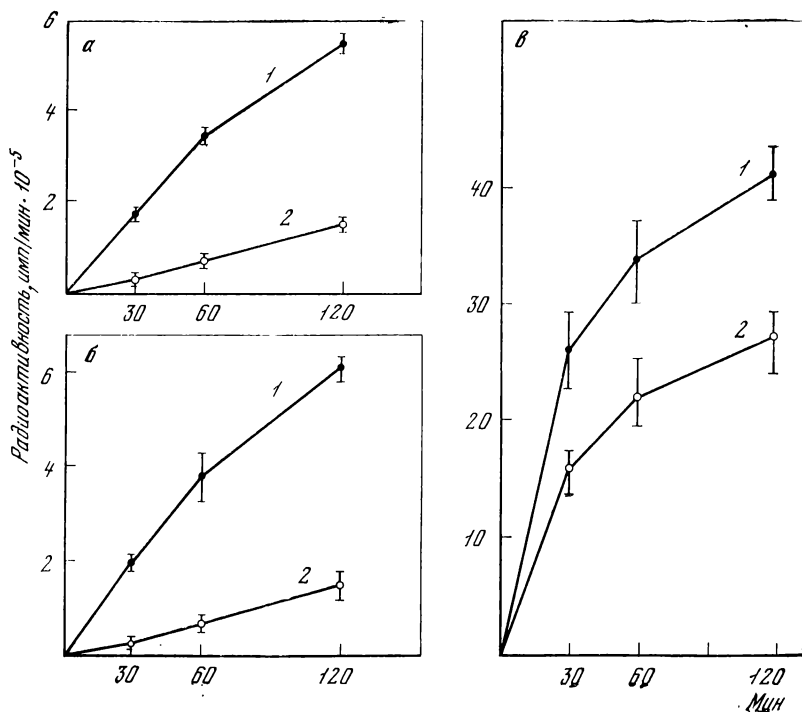


Рис. 45. Одинаковая скорость синтеза белка в ооцитах и зрелых яйцах морского ежа

Ооциты (а), неоплодотворенные зрелые яйца (б) и зародыши на стадии 16 бластомеров (в) *Paracentrotus lividus* инкубировали с ³H-лейцином и определяли включение лейцина (1) и его включение в белок (2). Лейцин одинаково проникает и включается в белки ооцитов и яиц; после оплодотворения (в) проницаемость и включение возрастают (Rinaldi, Parente, 1976)

падают в цитоплазму до начала созревания еще в растущем ооците (Ecker, Smith, 1968; 1971). Об этом же говорит и тот факт, что актиномицин Д не блокирует созревание ооцитов лягушки *in vitro*, стимулированное прогестероном (Масуи, 1972). Созревание может происходить также и в ооците, лишенном зародышевого пузырька (Скоблина, 1970).

Однако актиномицин Д подавляет созревание, если пытаться его стимулировать гонадотропным гормоном (Dettlaff, 1966), действие гонадотропного гормона опосредовано через фолликулярные клетки, в которых при этом происходит ядернозависимый синтез и выделение прогестерона, непосредственно вызывающего созревание ооцита (Masui, 1967; Масуи, 1972). Аналогичные результаты получены на ооцитах других видов амфибий (Thornton, Evernett, 1969) и рыб (Dettlaff, Skoblina, 1969).

О составе белков, синтезируемых в период созревания, известно мало. В ходе созревания в ооците амфибий появляется фак-

тор, вызывающий растворение оболочки зародышевого пузырька и стимулирующий начало мейоза. Этот фактор накапливается в анимальной зоне и связан с гнапиновой плазмой ооцита. Содержание его резко снижается к моменту оплодотворения (Masui, Markert, 1971; Масуи, 1972). Несколько позже в ооците начинает обнаруживаться цитостатический фактор, который исчезает в течение 90 мин. после оплодотворения к началу первого деления дробления (Масуи, 1972). Однако у травяной лягушки (*R. temporaria*) цитостатического фактора в ооцитах обнаружить не удалось (Детлаф, личное сообщение).

В отличие от амфибий у иглокожих фактор, ответственный за растворение оболочки зародышевого пузырька, появляется задолго до начала созревания, еще в ооцитах первого порядка. К числу белков, синтезируемых в период созревания, у морских звезд и червей относятся белки микротрубочек митотического аппарата или факторы, ответственные за его сборку, так как пуромин вызывает в ооцитах этих животных неправильное образование аппарата веретена и звезд (Zampetti-Bosseler et al., 1973).

По-видимому, не все белки, которые синтезируются в период созревания, являются собственно «белками созревания», т. е. обеспечивают этот процесс. Часть и может быть большая, используется в зародышевом развитии. Так, у морских звезд и червей ингибирование даже 50% белкового синтеза не останавливает процесс созревания (Zampetti-Bosseler et al., 1973).

Использование желтка в ходе развития

При полном дроблении яиц весь желток оказывается внутри клеток; его распределение обычно неравномерно и бластомеры на вегетативном полюсе содержат больше желтка, чем на анимальном. В ходе развития происходит постепенная резорбция желточных гранул — гидролиз их белков до аминокислот и их использование для синтеза белка зародыша и, частично, на энергетические нужды. У амфибий переполненные желтком бластомеры входят в состав энтодермы, образуют стенки кишечника и содержащийся в них желток служит на поздних стадиях запасом питательных веществ для этих клеток и для головастика.

При неполном дроблении бластомеры оказываются отделенными от желтка, хотя постепенно в ходе клеточных делений часть желточных гранул включается в состав клеток, примыкающих к желтку (Thomas, 1968). В результате постепенного гидролиза желтка образуются аминокислоты и другие низкомолекулярные соединения, которые транспортируются в клетки зародыша. На ранних стадиях развития этому транспорту способствуют пронизывающие массу желтка тяжи цитоплазмы, в которых наблюдается активное движение плазматических потоков (Tung, Tung, 1944; Oppenheimer, 1947; Светлов и др., 1962). На более поздних стадиях желточный мешок охватывает система кровеносных

сосудов. У зародышей птиц деградация овальбумина происходит во внезародышевых частях бластодермы, продукты распада поступают в эмбрион по кровеносной системе (Hassel, Klein, 1971).

Неклеточная масса желтка содержит значительную долю протеолитических ферментов зародыша (Нейфах, Давидов, 1964), а также гликолитическую систему и митохондрии. Роль протеаз сводится, очевидно, к гидролизу белков желтка до аминокислот. Функция энергетической системы желтка менее ясна, хотя у зародышей вьюна она составляет одну-две трети от всей энергетической системы яйца (Абрамова, Нейфах, 1965; Мильман и Юровицкий, 1973).

У зародышей млекопитающих основным источником аминокислот служит организм матери, у паразитических насекомых — ткани хозяина, в которые отложены яйца паразита.

У животных, зародыши которых не имеют внешних источников питания, синтез белка идет на всех стадиях эмбрионального развития, но общее количество белка в яйце на протяжении эмбрионального развития почти или совсем не меняется. Это означает, что синтез белков зародыша компенсируется распадом белков желтка. На поздних стадиях у амфибий и на ранних личиночных стадиях у рыб происходит снижение общего содержания белка. У рыб, например, снижение составляет 40% от первоначального количества белка в яйце. Эта величина характеризует долю белка, расходуемого на энергетические потребности организма. Остальные 60%, очевидно, преобразуются в клеточные белки зародыша и личинки.

О кинетике использования желтка позволяет судить работа Монроя и сотр. (Saito et al., 1965). Они вводили ^{14}C -лейцин и ^{35}S -метионин самке костистой рыбы медаки (*Ozygias latipes*). Большая часть введенной метки (90%) оказывалась в составе белков желтка, другая часть (2%) — в составе белков раннего зародыша, остальные 8% входили в пул свободных аминокислот. До стадии гастрюляции это распределение практически не менялось, т. е. белки желтка не использовались для построения белков зародыша. Затем удельная активность аминокислотного пула быстро возрастала, достигала максимума и затем снова уменьшалась. Характерно, что динамика этого процесса оказалась различной для лейцина и метионина. Параллельно происходило увеличение радиоактивности белков зародыша, причем к концу эмбрионального периода развития в белки зародыша перешло 30% меченого метионина и 60% меченого лейцина. Таким образом, заметное использование белков желтка обнаруживалось лишь после гастрюляции, и шло оно путем предварительной деградации до свободных аминокислот и миграции этих аминокислот в клетки зародыша. Различие в метаболизме двух аминокислот означает, что использование белков желтка происходит дифференцированно. Очевидно, при этом должен постепенно изменяться и состав желтка (Saito et al., 1965).

Неравномерность использования желтка косвенно показана также в работе Дейчар, в которой приводилось определение содержания свободных аминокислот в различных частях зародышей амфибий на разных стадиях развития. Концентрации аминокислот в ходе развития закономерно меняются относительно друг друга, и эти изменения специфичны для различных частей зародыша (Deuchar, 1956; 1963). В ходе использования желтка часть аминокислот подвергается взаимным превращениям. Так, например, меченый лейцин, включившийся в желток во время оогенеза ксенопуса, в зародыше частично преобразуется в пролин и в таком виде включается в белки (Deuchar, 1963b).

Утилизацию желточных гранул удается видеть и микроскопически по характеру их окрашивания сафранином (схема 3). Этим методом на зародышах ксенопуса было показано, что заметный протеолиз внутриклеточного желтка начинается со стадии нейруляции, причем только в клетках крыши первичной кишки. Несколько позже, на стадии хвостовой почки, усвоение желтка обнаруживается в клетках рано дифференцирующейся хорды. В большинстве же тканей использование желточных гранул начинается только после вылупления головастика (Selman, Pawsey, 1965).

Для амфибий и других животных с внутриклеточной локализацией желтка поддержание определенной концентрации свободных аминокислот, необходимых для синтеза белка, обеспечивается регуляцией протеолиза в тех же клетках. Механизмы такой регуляции неизвестны, но их во всяком случае можно представить. Более сложной представляется регуляция протеолиза запасных белков у животных, у которых желток расположен вне клеток, где также локализованы протеолитические ферменты.

БЕЛКИ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ

Синтез белка в начале развития

У большинства видов животных синтез белка не прекращается в конце созревания яйца. Так, у амфибий синтез белка, который замедляется в ооцитах, готовых к созреванию, после гормональной активации и растворения зародышевого пузырька усиливается в 8—10 раз и сохраняется на постоянном уровне вплоть до момента оплодотворения (Merriam, 1966; Smith et al., 1966).

После оплодотворения в эмбрионах амфибий (Ecker, Smith, 1966, 1968) уровень синтеза белка начинает постепенно повышаться только во время дробления (рис. 46).

У морского моллюска *Myanassa* оплодотворение происходит на стадии зародышевого пузырька, т. е. формально до завершения созревания. Синтез белка через 15 мин. после оплодотворения усиливается и за 2 часа возрастает в 2,5 раза (Collier, Schwartz, 1969; Mirkes, 1970, 1972) (рис. 47). Аналогичным образом усиливается синтез белка после оплодотворения в яйцах

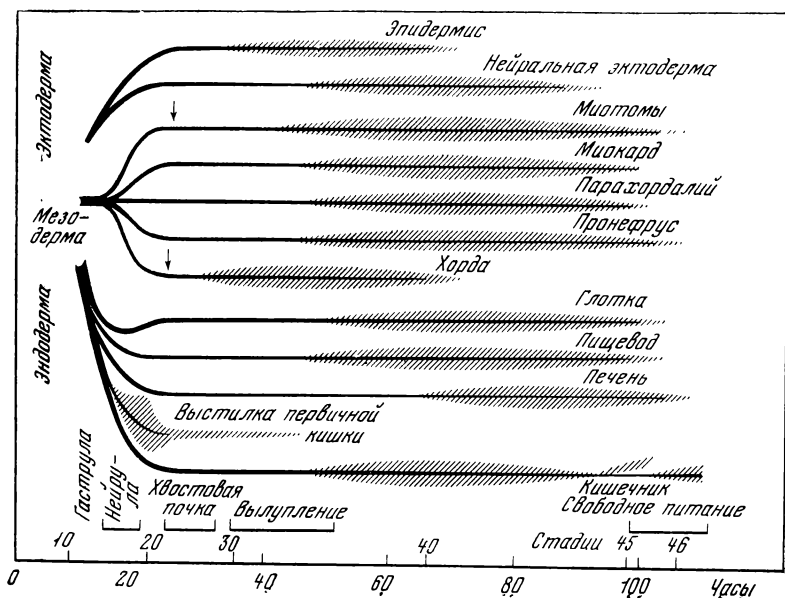


Схема 3. Усвоение желтка в разных органах зародыша и личинки ксенопуса

Гистологические препараты окрашивали сафранином, который выявлял протеолиз желточных гранул. Период протеолиза заштрихован. Использование желтка в основном начинается после вылупления и завершается только к началу собственного питания головастика (Selman, Pawsey, 1965)

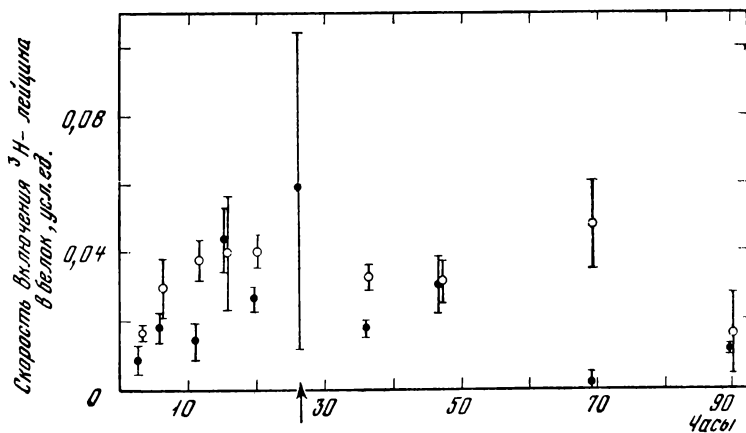


Рис. 46. Скорость синтеза белка при созревании и после оплодотворения яиц ксенопуса

Созревание ооцитов стимулировали прогестероном. У части ооцитов предварительно извлекали ядро. Через 27 час. яйца активировали (стрелка). В различное время после стимуляции в них инъецировали ^3H -лейцин и определяли кинетику включения в белок. Черные кружки — нормальные ооциты, белые — лишённые ядер. Абсцисса — время после обработки прогестероном при $19,5^\circ$. Показана ошибка измерения. Синтез белка после стимуляции возрастает вплоть до конца созревания (24 час), а затем остается на достигнутом уровне. Ядро ооцита в активации синтеза белка не участвует (Smith, Ecker, 1970)

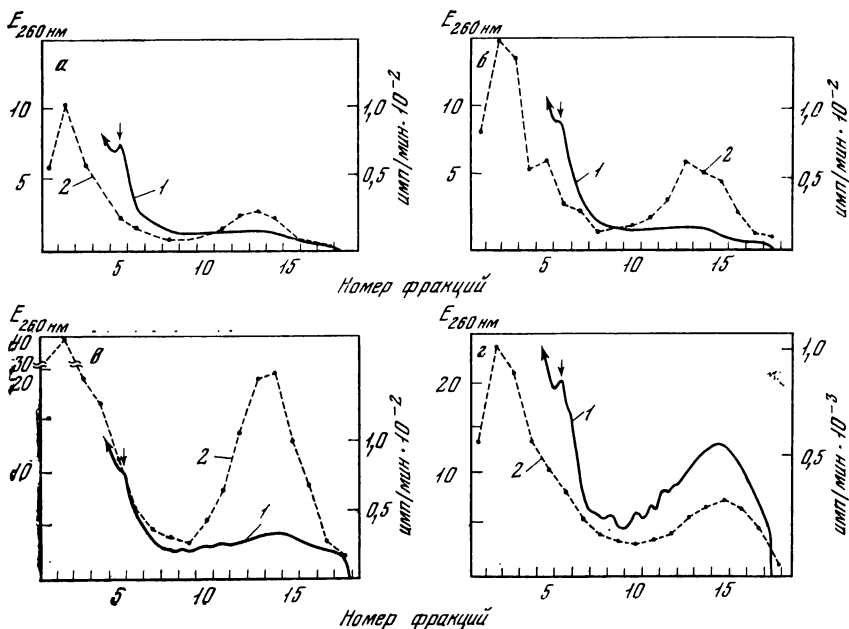


Рис. 47. Синтез белка и образование полирибосом в раннем развитии моллюска *Illyanassa*

Яйца и зародыши разных стадий инкубировали с ^{14}C -лейцином (15 мин, 20°) и гомогенат фракционировали центрифугированием в сахарозном градиенте (дно справа). 1 — оптическая плотность ($E_{260 \text{ nm}}$), 2 — радиоактивность; а — неоплодотворенные яйца; б — стадия слияния пронуклеусов; в — стадия 32—64 бластомеров; г — личинка (велигер). Синтез белка проявляется в виде пика радиоактивности в области полирибосом (фракции 10—17). Он возрастает сразу после оплодотворения (Mirceks, 1972)

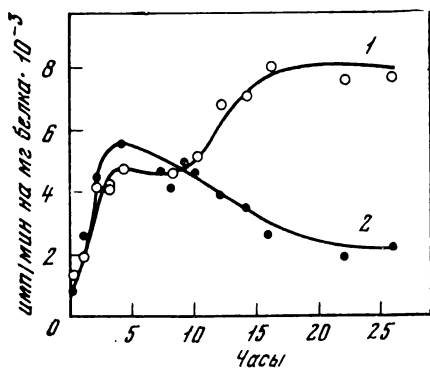


Рис. 48. Синтез белка у ранних зародышей морского ежа в норме и в присутствии актиномицина Д

Зародышей, развивающихся в нормальных условиях (1) и в присутствии актиномицина Д (20 мкг/мл) (2), помещали на 20 мин в среду с ^{14}C -валином и затем определяли его включение в белок. В первые часы развития синтез белка быстро возрастает как в норме, так и при инaktivации транскрипции актиномицином (Gross, Cousinou, 1964)

морских червей — эхиурид *Urechis caupo* (Gould, 1969b) и полихет *Sabellaria cementarium* (Wenesdorfer, 1965), моллюска *Spisula solidissima* (Bell, Reeder, 1967). У млекопитающих синтез белка после оплодотворения остается на низком уровне и повышается только со стадии 8—16 клеток (Epstein, Smith, 1973).

Яйца иглокожих представляют собой в этом отношении особый случай. Особенности биологии размножения морского ежа определяют способность зрелых и выметанных в воду яиц ожидать оплодотворения в течение многих часов до случайной встречи со сперматозоидом. В течение этого времени яйца метаболически очень мало активны и хотя сохраняют тот же темп синтеза, что в оогенезе (Rinaldi, Parente, 1976), синтез белка в них составляет незначительную долю от уровня синтеза на стадии бластулы. Он начинает повышаться уже через 5—10 мин. после оплодотворения (в зависимости от температуры и вида морского ежа) и достигает максимума через несколько часов развития на стадии ранней бластулы (рис. 48). Это увеличение скорости синтеза белка послужило объектом многих десятков работ. Такой интерес не случаен, и его нельзя объяснить только простотой работы с яйцами морского ежа и четкостью эффекта, хотя и эти обстоятельства сыграли свою роль. В пятидесятых годах, когда были начаты эти исследования, оплодотворенные яйца морского ежа с резким повышением скорости синтеза белка являлись одной из немногих удобных моделей для изучения механизмов регуляции белкового синтеза. Этот механизм и в настоящее время достаточно интересен, но, вероятно, его следует рассматривать не как общий, а как специфический случай регуляции, представляющий бóльший интерес для молекулярной эмбриологии.

Начало исследований связано с именем Хултина (Hultin, 1950; Hultin, Wessel, 1952). Основные исследования были проведены в лабораториях Монроя, Гросса, Немера, Мано и других, в которых и получены результаты, определяющие, по-видимому, нынешний уровень понимания этой проблемы (см. также обзоры Nemer, 1967; Monroy, Gross, 1967; Giudace, 1973; Stearns, 1974).

Многokратное увеличение скорости включения меченых аминокислот в белки яиц морского ежа после оплодотворения (Hultin, 1950; Nakano, Monroy, 1958; Monroy, Vittorelly, 1962; Mano, 1970) отражает действительное увеличение скорости синтеза белка. Оно не может быть объяснено ни повышением проницаемости оболочек яиц к аминокислотам, ни изменением внутриклеточного аминокислотного пула. Об этом свидетельствует единообразие результатов, полученных в работах с разными аминокислотами и другими предшественниками, а также прямыми опытами, в которых измерялась и учитывалась скорость прохождения аминокислот в яйцо, и, наконец, опытами с предварительным насыщением яйца меченой аминокислотой (прелодингом).

После оплодотворения транспорт аминокислот действительно усиливается (Tylor et al., 1966; Silver, Comb, 1966; Fry, Gross,

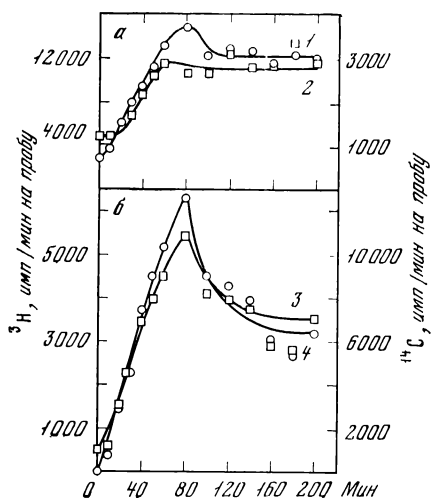


Рис. 49. Повышение проницаемости яиц морского ежа к аминокислотам после оплодотворения

Яйца *Strongylocentrotus purpuratus* в разное время после оплодотворения в течение 10 мин инкубировали (а) с ^3H -фенилаланином (1) и ^3H -лизинном (2) или (б) с ^{14}C -глицином (3) и ^3H -валином (4) и определяли радиоактивность ^{14}C и ^3H в кислоторастворимой фракции. Проницаемость к лизину и фенилаланину возрастает в несколько раз, к валину она увеличивается в десятки раз, а к глицину во много сотен раз (Erel, 1972)

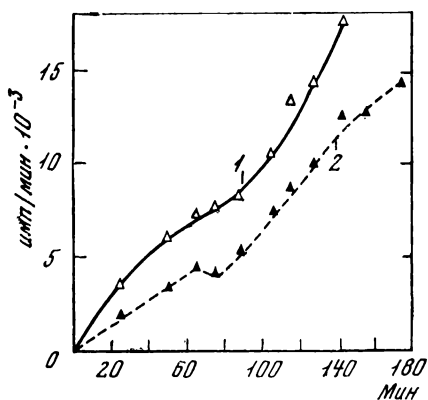


Рис. 50. Изменение проницаемости яиц морского ежа к лейцину и включение лейцина в белок после оплодотворения.

Яйца *Strongylocentrotus purpuratus* оплодотворяли и инкубировали при 18° . Их помещали на 5 мин в ^{14}C -лейцин и определяли радиоактивность кислоторастворимой фракции (вхождение ^{14}C -лейцина в яйцо) (1) и белка (2). Проницаемость к лейцину и включение в белок возрастает, но это возрастание замедляется на 60—90 мин (первое деление дробления) (Fry, Gross, 1970v)

1970a, b; Timourian, Watchmaker, 1970). По данным Эпеля в неоплодотворенных яйцах проницаемость к лизину и валину достаточно высока. После оплодотворения она возрастает всего в 8 и 21 раз соответственно (рис. 49). В противоположность этому неоплодотворенные яйца малопроницаемы к аланину и особенно глицину. После оплодотворения проницаемость к этим аминокислотам увеличивается в 290 раз (к аланину) и в 1490 раз (к глицину) (Erel, 1972).

Когда в опытах используется в качестве меченого предшественника валин или лизин, увеличения проницаемости яиц к этим аминокислотам недостаточно, чтобы объяснить рост включения метки в белок. Повышение проницаемости, например для валина, продолжается около двух часов, в то время как увеличение ско-

рости включения меченого валина в белок длится значительно дольше (EpeI, 1972). В естественных условиях в яйцах *Agracia* в процессе раннего развития поддерживается постоянный пул лейцина ($4 \cdot 10^{-8}$ мкмоль на одно яйцо), которого достаточно лишь на 5 мин. синтеза белка. При добавлении этой аминокислоты извне внутриклеточный пул лейцина быстро увеличивается в несколько раз, но в течение часа 80% этого избытка превращается в глютамин и другие аминокислоты (Fry, Gross, 1970a, b). Все это сильно усложняет расчеты действительной скорости синтеза, но тем не менее очевидно, что синтез белка начинает возрастать через 5–10 мин. после оплодотворения (Fry, Gross, 1970 b; EpeI, 1972) (рис. 50).

Увеличение скорости синтеза белка сопровождается включением свободных рибосом в состав полирибосом. Образование полирибосом не следует считать ни причиной, ни следствием увеличения скорости синтеза белка, а лишь выражением такого увеличения. Данные сравнения кинетики числа полирибосом и скорости синтеза белка у разных исследователей противоречивы. У одних авторов увеличение числа полирибосом отстает от увеличения интенсивности синтеза белка, и это приводит к принципиально важному выводу о том, что усиление синтеза белка происходит также и за счет его эффективности в расчете на одну активную (входящую в состав полисом) рибосому (Piatigorsky, Tyler, 1970; Mano, 1971a).

Хамфри приходит к прямо противоположному выводу. В своей первой публикации (Humphreys, 1969) он показывает, что эффективность трансляции (время присоединения одной аминокислоты к полипептидной цепи или скорость синтеза на одну рибосому, входящую в состав полисом) одинакова у неоплодотворенных яиц и у развивающихся зародышей. Однако из его последующих данных (Humphreys, 1971) следует, что доля рибосом, входящих в состав полирибосом на ранних стадиях, возрастает от 0,75% в неоплодотворенном яйце до 20% через два часа, т. е. в 30 раз, в то время как интенсивность синтеза белка за это время увеличивается лишь в 15 раз. Эффективность трансляции на одну рибосому уменьшается, следовательно, в два раза. Возможно, что эти разные выводы связаны с тем, что степень сохранности полирибосом при их выделении из яиц или из зародышей у разных авторов различна. Небольшие различия в количестве полирибосом из неоплодотворенного яйца уже приведут к существенным расхождениям в результатах. Характерно, что по данным Хамфри количество полирибосом вообще ниже, чем по данным других авторов. Количество свободных рибосомных субъединиц в неоплодотворенных яйцах составляет около 3% от общего числа рибосом, а после оплодотворения оно несколько снижается (на 10–25%), т. е. меняется мало (Jenkins, Denny, 1970).

В начале 60-х годов основное внимание было обращено на роль генетического аппарата яйца, так как по аналогии с бакте-

рями предполагалось, что увеличение синтеза белка должно вызываться появлением новых (короткоживущих) матриц РНК, синтезированных в ядре. Различные варианты опытов показали, что это предположение неверно. В первых таких опытах синтез белка определялся в безъядерных половинках яиц, активированных различными агентами, вызывающими партогенетическое развитие. Независимо от наличия или отсутствия ядер синтез белка практически не происходил до активации, а после активации начинался и усиливался в обеих половинах, так же как и в нормально оплодотворенных целых яйцах (Brachet et al., 1963; Denny, Tyler, 1964; Berg, 1965). Аналогичный результат был получен и при инактивации ядер актиномицином Д (Gross, Cousinou, 1964; Malkin et al., 1964) или высокими дозами радиации (Нейфах и Кригсгабер, 1968). Интенсивность синтеза белка в первые часы развития при этом оказывалась такой же, как в контроле, или даже несколько выше. Отсюда можно сделать вывод, что в яйце морского ежа содержатся все зависимые от ядра компоненты белоксинтезирующего аппарата и активация синтеза белка после оплодотворения происходит за счет механизмов регуляции трансляции.

В качестве возможных претендентов на регулирующее звено было рассмотрено три компонента, участвующих в синтезе белка: 1) мРНК, 2) рибосомы и 3) такие компоненты цитоплазмы, как тРНК, аминоацил-тРНК-синтетазы, белковые факторы синтеза (T_1 , T_2), ГТФ и аминокислоты.

Некоторые различия в активности аминоацил-тРНК-синтетаз, составе тРНК и факторах трансляции между оплодотворенными и неоплодотворенными яйцами обнаруживаются (Candelas, Iverson, 1966; Timourian, 1967; Castaneda, 1969; Metafora et al., 1971; Sharma et al., 1973). Однако их недостаточно для того, чтобы объяснить активацию белкового синтеза после оплодотворения. Большинство авторов находят, что неосаждаемая часть гомогената (клеточный сок) неоплодотворенных яиц так же хорошо поддерживает синтез белка на естественных или искусственных (полиУ-матрицах), как и из оплодотворенных (Hultin, 1961; Wilt, Hultin, 1962; Stavy, Gross, 1967, 1969; Kedes, Stavy, 1969). Выбор основного регуляционного звена, таким образом, уменьшается до двух: мРНК или рибосомы.

В ряде экспериментов с использованием рибосом, полученных из неоплодотворенных и из оплодотворенных яиц морского ежа, было показано, что различий между ними нет (Wilt, Hultin, 1962; Nemer, Bard, 1963; Stavy, Gross, 1967, 1969; Kedes, Stavy, 1969; Infante, Graves, 1971). Это доказывалось в основном в опытах *in vitro* в системе Ниренберга, где матрицами служила полиуридиловая кислота (полиУ) и измерялось включение фенилаланина.

Позже идентичность рибосом из яиц и зародышей была показана в системе, содержащей, кроме рибосом, факторы трансляции из клеток асцита Кребса и матрицы глобиновых мРНК

кролика (Clegg, Denny, 1974). В результате большинство исследователей пришли к представлению о том, что за контроль синтеза белка в раннем развитии морского ежа ответственна мРНК в особой маскированной форме (ммРНК или информосомы) (Spirin, Nemer, 1965; Taylor, 1967; Spirin, 1966, 1969; Gross, 1967; Stavy, Gross, 1969; Kedes, Stavy, 1969; Humphreys, 1971). Это предположение оставалось единственным возможным, если действительно все остальные компоненты белоксинтезирующего аппарата не отличаются друг от друга. Справедливо также и то, что, поскольку мРНК в неоплодотворенных яйцах морского ежа определенно есть (Slater, Spiegelman, 1968) и она не участвует в трансляции, мы вправе назвать ее маскированной мРНК (Spirin, 1966) или ммРНК (Tylor, 1967). По данным Мано, в неоплодотворенных яйцах значительная часть матричной активной РНК находится в гранулах, осаждаемых в присутствии Са при 12 000 g. После оплодотворения, возможно под действием протеаз, РНК из этих гранул переходит во фракцию полирибосом (Мано, Nagano, 1970; Мано, 1971). Существование такой связанной с белком мРНК было обнаружено и в полирибосомных комплексах (Ruzdisic, Glislin, 1972).

Однако основным доводом в пользу того, что активация синтеза белка в яйцах морского ежа после оплодотворения происходит за счет демаскирования мРНК, остается идентичность рибосом, выделенных из неоплодотворенных и из развивающихся яиц. Этот факт был, однако, оспорен в ряде работ, проведенных в лаборатории Монроя (Maggio et al., 1964, 1968; Monroy, Rinaldi, 1965; Rinaldi, Monroy, 1969; Metafora et al., 1971; Gambino et al., 1973). Они показали, в частности, что обработка неоплодотворенных яиц трипсином активирует в них синтез белка (Monroy, Rinaldi, 1965). Этого, конечно, еще недостаточно для того, чтобы доказать ведущую роль рибосом, так как трипсин может действовать не только на рибосомы, но и на маскированную мРНК. Более того, по другим данным, трипсин может активировать неоплодотворенные яйца к партеногенетическому развитию и стимулировать синтез белка опосредованно (Hand, 1971). Однако далее группе Монроя удалось найти некоторые небольшие различия в рибосомах, полученных из оплодотворенных и неоплодотворенных яиц. Если эти рибосомы длительное время инкубировать в среде с низкой концентрацией магния, то диссоциация рибосом из оплодотворенных яиц происходит быстрее, чем таких же рибосом из неоплодотворенных яиц. Различия исчезают, если те и другие рибосомы предварительно обработать трипсином. Это позволило предположить, что рибосомы из неоплодотворенных яиц имеют особый белок, связывающий их субъединицы и препятствующий их функции (Maggio et al., 1968). Во время оплодотворения происходит активация ряда ферментов (см. ниже), в том числе протеаз (см. Epel, 1967; Epel et al., 1969b; Vacquier et al., 1973). Протеазы разрушают белковую перемычку, активируют рибосомы

и включают синтез белка (Metafora et al., 1971). В подтверждение этого из рибосом неоплодотворенных яиц был выделен белок, отсутствующий в оплодотворенных яйцах и тормозящий синтез белка *in vitro* (Gambino et al., 1973).

Тем не менее эта гипотеза не может считаться достаточно обоснованной — остается неподтвержденным факт действия протеаз на рибосомы и механизм их активации. Против гипотезы свидетельствуют последующие исследования, где тщательное сравнение физико-химических свойств рибосом не обнаруживает различий между ними (Kedes, Stavy, 1969; Infante, Graves, 1971).

Однако и сторонники гипотезы «маскированной РНК» и ее демаскирования как процесса, запускающего синтез белка, имеют на сегодняшний день немного данных о различиях в состоянии мРНК до и после оплодотворения. (Если не считать того очевидного факта, что в первом случае она находится вне рибосом, а во втором входит в состав полирибосом.)

Из экспериментов Макинтоша и Белла следует, что процессом, непосредственно определяющим активацию синтеза, является скорость инициации. Эти авторы нашли, что ингибитор элонгации — циклогексимид — вызывает накопление полирибосом в неоплодотворенных яйцах. Очевидно, в неоплодотворенных яйцах слабый синтез белка лимитируется инициацией, а в оплодотворенных более высокий уровень синтеза ограничивается скоростью элонгации (Makintosh, Bell, 1969 a, b). Но и эти данные не могут объяснить, что усиливает инициацию — рибосомы или мРНК.

Новый подход к проблеме активации синтеза белка открывают работы, в которых исследуются события, происходящие тотчас после оплодотворения или активации яйца и предшествующие стимуляции синтеза белка. Эпель насчитывает около 30 биохимических и морфологических изменений, которые происходят в яйце морского ежа в течение первых 10 мин. после оплодотворения (Epel, 1967). Связь между этими изменениями и их отношение к стимуляции синтеза белка, как правило, неизвестны, хотя активацию протеаз принято рассматривать как один из механизмов включения рибосом. В последнее время было показано, что оплодотворение или активация яйца аммиаком приводит к характерным кортикальным изменениям, в ходе которых из яйца выделяется высокомолекулярный (гликопротеидный) компонент, который способен подавлять синтез белка (Johnson, Epel, 1975). Предполагается, что удаление этого вещества дерепрессирует репликацию ДНК и, возможно, синтез белка (Mazia et al., 1975). Оплодотворение вызывает также изменение мембранного потенциала и вследствие этого увеличение проницаемости ионов калия (Turper, 1973, 1974), которые авторы связывают со стимуляцией синтеза белка.

В ближайшие годы, вероятно, будет сделан окончательный выбор между гипотезами о демаскировании мРНК и об активации рибосом и получены более точные представления о последова-

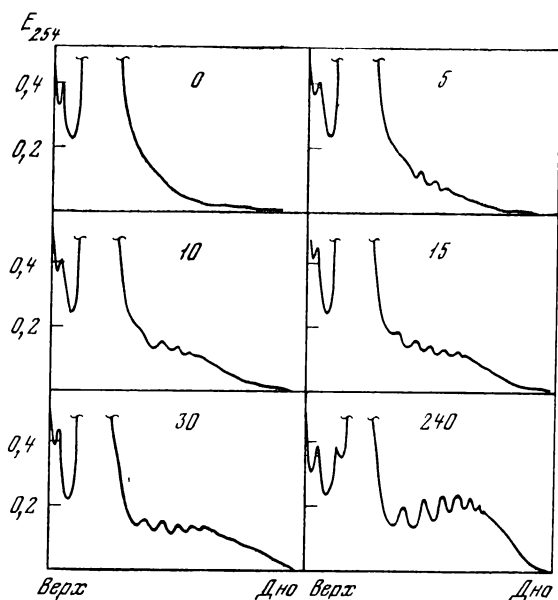


Рис. 51. Увеличение числа полирибосом после пробуждения гаструл *Artemia salina*

Сухие анабиотические цисты (гастролы) рачка *Artemia salina* пробуждались к развитию переносом в морскую воду при 30°. Через различное время их гомогенизировали и полирибосомы исследовали центрифугированием в градиенте сахарозы. Цифры на рис. соответствуют времени инкубации в морской воде (мин). Вершина пика рибосом (слева) не показана. Полирибосомы (справа) появляются уже через 5 мин. и их количество увеличивается в последующее время (Finamore, Clegg, 1969)

тельной цепи механизмов регуляции трансляции во время оплодотворения.

Моделью, во многом напоминающей яйца морского ежа, являются цисты эмбрионов рачка *Artemia salina*. Его яйца развиваются до стадии гастролы и в этом состоянии высыхают и впадают в анабиоз, который прерывается поступлением в цисты воды, активирующей в них начало синтеза макромолекул, в первую очередь белка. И хотя в этом случае нельзя говорить об активации синтеза белка «в начале развития», возникающие проблемы тут те же, что и при оплодотворении яиц морского ежа. В первых работах на этом объекте было показано, что при помещении инцистированных гастрол *Artemia salina* в воду обнаруживаются образованные вновь полирибосомы и начинается включение предшественников в белок через 15—30 мин. Если цисты были смочены при нулевой температуре, то после повышения температуры увеличение числа полисом обнаруживается уже через 3 мин. (Clegg, Golub, 1969). Это означает, что лимитирующим фактором является скорость проникновения воды в цисту,

а синтез белка стимулируется практически сразу, хотя весь процесс увеличения скорости синтеза занимает более 2 час. (рис. 51). В это время не только возрастает число рибосом, включающихся в полисомы, но и эффективность трансляции, т. е. скорость синтеза белка в расчете на одну рибосому, входящую в состав полисом (Clegg, Golub, 1969; Finamore, Clegg, 1969; Hultin, Morris, 1968). Это повышение происходит в основном не за счет увеличения количества мРНК (хотя их синтез начинается вскоре после возобновления развития), а за счет запаса мРНК, образованного до анабиоза (Nilsson, Hultin, 1972). Детальное исследование этого явления в лаборатории Очоа сначала привело к ошибочному заключению, что лимитирующим в синтезе белка у зародышей *Artemia salina* является количество мРНК (Sierra et al., 1974). Однако позже они же показали, что синтез белка у зародышей этого рачка лимитируется несколькими факторами инициации. Если эти факторы, обозначенные как IF-MP, M3, M2A и M2B, смыть с рибосом развивающегося зародыша, то они могут активировать трансляцию в системе *in vitro* из неразвивающихся яиц (Filipowicz et al., 1975, 1976).

Очевидно, системы активации синтеза белка в яйцах морского ежа и у зародышей *Artemia salina* различны, хотя в обоих случаях используются механизмы регуляции на уровне трансляции.

Скорость синтеза белка

Выражение «скорость синтеза белка» не является однозначным. Этим термином можно выражать довольно разные понятия. Наиболее точно оно означает скорость увеличения полипептидной цепи, т. е. количества аминокислотных остатков, присоединенных к этой цепи за единицу времени. Эту величину можно определить, если известны удельная радиоактивность пула той или иной меченой аминокислоты, частота, с которой данный аминокислотный остаток встречается в синтезируемых полипептидах, и, наконец, количество функционирующих рибосом, входящих в полирибосомные комплексы. Определение всех этих величин и в системе *in vitro* достаточно сложно, а для живой системы (клетки) сложности еще возрастают. Однако полученные таким путем значения абсолютной скорости синтеза представляют специальный интерес и не всегда существенны, если речь идет о синтезе белка в зародыше. Для задач биологии развития, как правило, достаточно сравнить скорость синтеза белка в зародыше на разных стадиях развития, в разных его частях или при тех или иных экспериментальных воздействиях. Для этих целей скорость синтеза белка может выражаться в количестве распадов (импульсов) метки, включенной в белок, за единицу времени в расчете на миллиграмм белка или на зародыш. Такой расчет дает относительную скорость синтеза, так как отношение количества новообразованных молекул белка к общему количеству

белка само по себе не имеет никакого смысла. Количество белка, к которому относят число импульсов, является, однако, надежным показателем массы цитоплазмы, в которой происходит измеряемый синтез. Поэтому если в ходе развития масса белков зародыша не возрастает, этот показатель в принципе отражает активность синтеза белка в расчете на одного зародыша. Однако так как в ходе подготовки препарата для определения радиоактивности могут быть потери, расчет на белок более надежен. Выше уже рассматривались возможные ошибки, обусловленные различиями проницаемости к аминокислотам-предшественникам и размеру их свободного пула в клетке. К ним можно добавить ошибки, связанные с различиями в количестве ипертного белка (желточных гранул) в разных тканях (например, эктодерме и энтодерме у амфибий) и на разных стадиях. Все это вносит значительную условность в сравнение скоростей белкового синтеза и затрудняет сопоставление данных, полученных на разных объектах.

В качестве специфических предшественников синтеза белка используются меченые аминокислоты, которые легко проникают в яйца морского ежа. В яйца амфибий их приходится инъецировать, а зародышей разрезать на части или диссоциировать на клетки. Зародыши рыб перед инкубацией с мечеными аминокислотами отделяют от желтка микрохирургически (лососевые) или центрифугированием на слое сахарозы (вьюн; Костомарова и Нейфах, 1964). Для амфибий и рыб можно также использовать в качестве предшественника белка $^{14}\text{CO}_2$, который легко проникает в целые яйца и путем карбоксилирования включается в состав различных аминокислот. Преимущество этого предшественника не только в том, что он позволяет работать с целыми яйцами, но и в том, что при его использовании практически снимается проблема проницаемости, а включение метки в разные аминокислоты делает маловероятными значительные колебания удельной активности аминокислотного пула в разных тканях и на разных стадиях развития. Впрочем, специально проведенное сравнение включения меченых аминокислот в изолированные бластомеры вьюна и $^{14}\text{CO}_2$ в целые яйца (Кригсгабер, Нейфах, 1968) показало, что оба метода дают одинаковые результаты, т. е. одинаковые относительные изменения скорости включения в ходе развития. Абсолютные значения включения метки были, естественно, различными.

У амфибий и рыб синтез белка после оплодотворения не повышается, но медленно возрастает в ходе делений дробления (Smith et al., 1966; Нейфах и др., 1968; Ecker, Smith, 1971).

У зародышей вьюна возрастание интенсивности синтеза резко увеличивается со стадии поздней бластулы (9 час. при 21°) и достигает максимума в конце периода обрастания (начало образования осевых органов, 18—20 час. при 21°). После этого интенсивность синтеза белка заметно и довольно резко уменьшается,

достигая минимальных значений на стадии появления первых сомитов (22—24 часа). Это падение сменяется новым подъемом. В разных партиях яиц эти картины несколько варьируют, но общая тенденция сохраняется довольно точно, а колебания по стадиям не превышают 2 час. (10% времени развития) и по размаху колебаний — 10—20%. Со стадии ранней бластулы (6 час.) интенсивность синтеза белка увеличивается в 6—8 раз (18—20 час.), затем уменьшается в 1,5—2 раза (22—24 часа) и снова возрастает в несколько раз (Нейфах и др., 1968).

Несмотря на все различия типа развития яиц морского ежа от рыб, форма кривых скорости синтеза белка у них довольно сходна. Отличаются они только в первые часы развития, когда синтез белка у морского ежа почти от нуля возрастает во много раз. У зародышей *Strongylocentrotus nudus* он достигает максимума на стадии ранней — средней бластулы (6—7 час. при 25°), затем снижается на 25—30% с минимумом на 11—12 час. (мезенхимная бластула) и снова повышается в ходе гастрюляции в несколько раз (Berg, 1968; Нейфах, Кригсгабер, 1968; Krigsgaber, Neufakh, 1972, см: Giudace, 1973). Абсолютные значения скорости синтеза белка были определены у зародышей морского ежа, и показано, что зародыш синтезирует $7-10 \cdot 10^{-4}$ мкг белка за 1 час, что составляет около 1% общей массы белков (Fry, Gross, 1970b; Berg, Mertes, 1970).

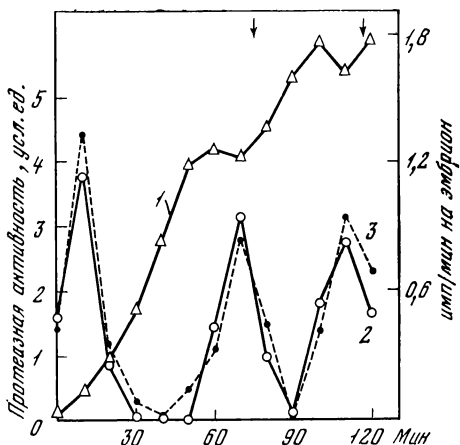
Связать изменения интенсивности синтеза белка непосредственно с процессами морфогенеза в целом не удастся. Ускорение синтеза со стадии поздней бластулы у вьюна нетрудно объяснить образованием новых белков, необходимых для гастрюляции и последующего органогенеза. Однако снижение интенсивности происходит тогда, когда завершается образование осевых органов, и перед тем как начинается образование сомитов, отделов головного мозга и т. д. Последующий подъем совпадает с сегментацией, дальнейшей дифференцировкой головы и другими органогенезами. Может быть, снижение синтеза белка можно как-то связать с неким перепрограммированием органогенеза, когда один его этап сменяется другим. Однако для того, чтобы эти рассуждения приобрели фактическую основу, следует найти какой-то количественный критерий для интенсивности дифференцировки или хотя бы сравнить интенсивность синтеза белка в развитии отдельных органов, что в принципе вполне реально, но до сих пор не сделано.

Различия в скорости синтеза белка между частями зародыша были оценены автордиографически на стадиях бластулы — ранней гастрюлы. Как и синтез РНК, на этих стадиях синтез белка интенсифицируется сначала в базальном слое бластодермы и потом распространяется по всему зародышу (Буракова, Костомарова, 1975).

У морского ежа синтез белка достигает максимума на стадии бластулы, когда образуется много новых клеточных образований — ядер, мембран и т. д. Однако на следующем этапе, когда

Рис. 52. Циклические изменения включения меченых аминокислот в белки и протеазной активности во время делений дробления яиц морского ежа

В разное время после оплодотворения яйца *Pseudocentrotus depressus* коротко инкубировали со смесью ^{14}C -аминокислот, исследовали их включение в белок (1), в параллельных пробах определяли протеазную активность с эндогенным субстратом (2) и с казеином (3). Стрелками указано время первого и второго делений дробления. Включение в белок быстро возрастает, но замедляется перед первым и вторым делением. В то же время, а также сразу после оплодотворения возрастает протеазная активность (Mano, 1970)



синтезируется фермент вылупления, образуются реснички и султан, происходит выклев и начинается выселение в полость бластулы мезенхимных клеток, синтез белка снижается и вновь увеличивается с началом гастрюляции. И в этом случае отождествлять интенсивность синтеза белка с теми или иными процессами морфогенеза было бы преждевременно.

Особо следует остановиться на колебаниях в скорости синтеза белка, связанных с делениями дробления. Такие колебания обнаруживаются при достаточно подробном исследовании коротких (импульсных) включений меченых аминокислот в дробящиеся яйца морского ежа (Gross, Fry, 1966; Sofer et al., 1966; Mano, 1968, 1969; Timourian, Watchmaker, 1970) (см. рис. 50). Амплитуда этих колебаний невелика, и они накладываются на происходящее на этих ранних стадиях общее повышение скорости синтеза. Оба эти одновременно протекающих процесса получили названия базальный рост и циклические вариации. Циклические вариации с амплитудой, составляющей 10—20% от общего синтеза, были подробно исследованы в серии работ Мано (Mano, 1968, 1969, 1970, 1971a, b) (рис. 52).

Включение меченых аминокислот в белок в каждом митотическом цикле достигает максимума на метафазе деления и минимума на анафазе — телофазе. Вследствие базального роста каждый последующий максимум выше предыдущего. То, что циклические вариации есть действительные колебания скорости синтеза белка, а не скорости включения аминокислот, Мано показал в опытах с определением проницаемости меченых аминокислот, опытах с прелодингом и, наконец, в опытах на бесклеточных системах. Он нашел, что колебания в проницаемости к аминокислотам хотя и есть, но имеют другую периодичность, чем колебания включения метки в белок, и затухают они на более ранних стадиях, чем циклические вариации белкового синтеза. При предваритель-

ном введении меченых аминокислот (прелодинге) суммарная (кумулятивная) активность возрастает не с равной скоростью и, более того, обнаруживает даже небольшие падения, свидетельствующие не только о замедлении синтеза, но и о распаде части меченых белков (см. ниже). Наконец, в гомогенатах из оплодотворенных яиц, после осаждения крупных гранул (12 000g) увеличения синтеза белка не происходит (т. е. нет базального роста), но циклические повышения и понижения скорости включения сохраняются.

Эти три варианта опытов, казалось бы, снимают проблему удельной активности аминокислотного пула и позволяют отождествить колебания включения аминокислот с колебаниями скорости синтеза белка. Однако другие группы исследователей отрицают факт подобных колебаний. В работах Фри и Гросса (Gross, 1967; Fry, Gross, 1970a, b) подтверждается само наличие колебаний включения, но они целиком объясняются изменениями проницаемости клеток зародыша к аминокислотам.

Таким образом, сам факт циклических вариаций не может считаться твердо доказанным до тех пор, пока он не будет подтвержден в других лабораториях. Кроме того, трудно объяснить данные Мано о частичной циклической деградации синтезированных белков. Действительно, на кривой кумулятивного включения (после прелодинга), представленной Мано, можно видеть отчетливые снижения активности, т. е. уменьшение не скорости синтеза, а количества меченых белков. При этом общее количество белка в зародыше не меняется, т. е. деградация части белка происходит избирательно, за счет только вновь синтезированных молекул. Этот новый факт Мано объясняет циклическими повышениями протеазной активности, которые он обнаруживает в эти же моменты.

Хотя данные Мано пока не могут считаться общепризнанными, они представлены большим циклом работ, и на них следует кратко остановиться. Кроме колебаний в целых зародышах, Мано подробно исследовал эти процессы в бесклеточных системах. Гомогенизирование яиц морского ежа в разные моменты после оплодотворения сразу останавливает дальнейшее повышение скорости синтеза (базального роста), но достигнутый уровень синтеза сохраняется и на его фоне продолжают циклические вариации. Удивительным (и парадоксальным) является характер зависимости этих колебаний от концентрации гомогената (количества белка в среде) и температуры. Так, частота колебаний понижается при повышении концентрации белка. Зато понижение температуры (от 21 до 10°) не меняет частоты колебаний (!), но уменьшает ее амплитуду. Добавление супернатанта из гомогената оплодотворенных яиц к таковому из неоплодотворенных индуцирует и в них такие колебания. Мано описывает три группы факторов, ответственных за колебания скорости синтеза белка. Один из них, макромолекулярный, но еще не идентифицированный, присутст-

вует как в оплодотворенных, так и в неоплодотворенных яйцах и определяет частоту и амплитуду колебаний (его разбавление повышает частоту). Вторым макромолекулярным компонентом являются материнские мРНК. Как уже отмечалось выше, до оплодотворения они, по данным Мано, находятся в относительно крупных гранулах, осаждаемых в присутствии ионов кальция при 12 000g. После оплодотворения гранулы разрушаются, и освобожденная мРНК включается в полирибосомы. Наконец, третьим, низкомолекулярным фактором, необходимым для циклических вариаций синтеза белка, являются АТФ и ГТФ, концентрация которых возрастает после оплодотворения. Все эти данные представляют несомненный интерес, но нуждаются в подтверждении. Авторы многих обзоров к ним относятся скептически (см., например, Giudace, 1973; Stearns, 1974).

Авторадиографическое исследование показывает, что на стадии гастрюлы у зародышей морского ежа включение меченых аминокислот в клетки эктодермы заметно выше, чем в клетки энтодермы и мезодермы. Однако при экзогастрюляции, когда энтодермальный зачаток (первичная кишка) вывернут наружу, включение метки в белки оказывается одинаковым в эктодерме и энтодерме (Karp, Weems, 1975). Можно, очевидно, заключить, что видимые различия в скорости синтеза белка между частями зародыша являются артефактом и вызваны различиями в скорости проникновения меченых аминокислот из внешней среды к клеткам, лежащим на поверхности (эктодерма) и в глубине зародыша (энтодерма).

Скорость синтеза белка в ходе раннего развития исследовали и у других видов животных, но не во всех работах проблеме проницаемости аминокислот уделялось достаточное внимание. У моллюска *Hydrobia* определяли включение аминокислот в белок с одновременным измерением скорости вхождения метки и определением аминокислотного пула. Все три величины в ходе развития менялись довольно значительно и каждая из них имела специфический характер изменений. Скорость синтеза белка, рассчитанная по этим величинам, увеличивается после оплодотворения, но затем остается неизменной вплоть до начала гастрюляции. Во время гастрюляции она возрастает во много раз и остается высокой в период органогенеза, а затем падает до исходной величины (Collier, Schwartz, 1969). Количество полирибосом в ходе развития этого моллюска до стадии велигера увеличивается в 4—5 раз, а их удельная активность, т. е. эффективность синтеза в расчете на рибосому, также возрастает в 4—6 раз. В итоге скорость синтеза белка на стадии велигера оказывается в 26 раз выше, чем в неоплодотворенном яйце. В ходе развития также несколько увеличивается и средний размер полисом (от 15 до 20 рибосом на полисому) (Mirkes, 1972).

У моллюска *Spisula* в ходе развития медленно возрастают доля полирибосом (от 10% в неоплодотворенном яйце до 60% на

стадии трохофоры), проницаемость к аминокислотам и включение их в белок. Скорость синтеза белка, если судить по числу полисом, увеличивается. Расчеты скорости синтеза, произведенные с учетом изменения проницаемости для аминокислот, также это подтверждают. Синтез белка на легких полисомах на стадии 16 бластомеров более чувствителен к актиномицину, чем на тяжелых, т. е. на ранних стадиях большие белки синтезируются преимущественно на материнских матрицах (90%), а белок меньшего размера в значительной степени (32%) транслируется на мРНК, транскрибированной в ядрах зародыша (Firtel, Mongro, 1970). У асцидий (*Ascidia nigra*) синтез белка повышается в ходе раннего развития — от оплодотворения до стадии 4 бластомеров и затем снова во время гастрюляции. Актиномицин не влияет на первый подъем синтеза, но подавляет рост синтеза белка по время гастрюляции (Smith, 1967).

У ранних зародышей мыши, для того чтобы исключить влияния проницаемости и пула и определить собственно синтез белка, использовали различные концентрации нескольких аминокислот и измеряли их вхождение в зародыш и включение в белок. Включение остается на низком уровне в течение двух дней развития, вплоть до стадии 8—16 бластомеров, после чего возрастает в 3—9 раз (в зависимости от предшественников) (Erstein, Smith, 1973; Piko, 1975). Авторы предполагают, что, поскольку на самых ранних стадиях скорость синтеза остается постоянной при увеличивающемся числе клеток, трансляция происходит на материнских матрицах, а затем, когда скорость синтеза возрастает быстрее, чем число клеток, — на новых мРНК, синтезированных в ядрах зародышей. Такое заключение имеет некоторые основания, но его трудно доказать простым сравнением скоростей синтеза и количества делений дробления.

В недавней работе Бринстера и сотрудников (Brinster et al., 1976) у ранних зародышей мыши измеряли не только включение ^3H -лейцина в белок, но также скорость вхождения ^3H -лейцина в зародыш и величину лейцинового пула. Это позволило точно рассчитать скорость синтеза белка и показать, что в неоплодотворенном и оплодотворенном яйцах и на двухклеточной стадии скорость синтеза низка и постоянна ($7-8 \cdot 10^{-13}$ молей лейцина в час на яйцо). Она становится значительно выше на стадии бластоциста ($56 \cdot 10^{-13}$ моля). Скорость распада белков в бластоцисте также выше, чем в яйце.

У кролика синтез белка также значительно усиливается, но на несколько более поздних стадиях (Manes, Daniel, 1969; Karp et al., 1973). По мнению Мане, это увеличение связано с активным синтезом тРНК на самых ранних стадиях развития млекопитающих и на стадии бластулы с появлением новых рибосом (Manes, 1975).

Подводя итог этому разделу, можно, очевидно, заключить, что скорость синтеза белка по мере развития увеличивается у всех

видов. У многих из них синтез сильно замедляется в конце роста ооцита и стимулируется с началом созревания и овуляции (рыбы, амфибии). У червей и моллюсков, у которых созревание (разрыв зародышевого пузырька) происходит после осеменения, синтез белка также усиливается с началом созревания — оплодотворения, возрастая в несколько раз. Наиболее резко оплодотворение активирует синтез белка в яйцах морских ежей, которые оплодотворяются, уже пройдя созревание и деления мейоза.

В ходе раннего дробления синтез белка у большинства видов увеличивается очень медленно (амфибии, рыбы, млекопитающие, моллюски, черви). У илгокожих, однако, на эти стадии приходится активация белкового синтеза почти от нулевого уровня. Увеличение скорости синтеза белка у большинства видов связано с началом дифференцировки — поздней бластулой, гастрულიцей, органогенезом.

Повышение скорости синтеза белка всегда выражается в увеличении доли рибосом, входящих в состав полисом, а в некоторых случаях сопровождается и усилением эффективности трансляции. Механизмы, определяющие увеличение скорости синтеза, как правило, неизвестны, и у разных видов они могут быть различны. Предполагается, что на поздних стадиях скорость синтеза возрастает преимущественно за счет появления новых мРНК, а на ранних — в основном за счет большего использования запасенных матриц.

Состав синтезируемых белков

Для того, чтобы судить о составе синтезируемых белков, их необходимо отделить друг от друга. В белковой химии сейчас разработано много методов, позволяющих разделить практически все белки. Эти методы основаны на различиях в молекулярном весе (ультрацентрифугирование, молекулярные сита — сефадексы, биогели и др.), растворимости в солевых растворах (высаливание в сульфате аммония), в заряде (электрофорез), избирательной абсорбции на ионообменных смолах, изоэлектрической точке (изофокусировка), иммунных свойствах (преципитация в геле, иммунофорез) и др. Однако для исследования белков зародышей наибольшее применение получил электрофорез, позволяющий на очень небольшом материале получить до пятидесяти — ста фракций. Двумерный форез позволяет увеличить это число до четырехсот. Тем не менее данные, полученные этими методами, пока позволили установить только различия между стадиями и констатировать увеличение разнообразия белков в ходе развития. Более обещающим кажется сочетание различных методов, в частности, применение «коэлектрофореза» — совместного электрофоретического разделения искусственной смеси белков из разных органов, с разных стадий и меченных различно — ^3H - и ^{14}C -аминокислотами. Отношение между ^3H - и ^{14}C -метками в одной фрак-

ции позволяет судить о количественных различиях в содержании или синтезе того или иного белка на различных стадиях, в частях зародыша и т. д. Однако даже при наилучшем электрофоретическом разрешении из белков зародыша удается выделить лишь фракции, которые присутствуют в зародыше в наивысших концентрациях. Это соответствует лишь немногим процентам от числа активных генов и, очевидно, числа транслируемых полипептидов. В это число могут не попасть как раз наиболее специфичные белки и неудивительно, что появление новых видов белков в ходе развития обычно регистрируется с трудом. Большинство работ такого рода проведено на яйцах морского ежа, где получение большого количества предварительно меченных белков на разных стадиях развития не представляет значительных трудностей.

В 50-х годах, когда современные методы разделения белков только создавались, большие надежды возлагались на иммунохимические методы. В эти годы были получены данные о появлении в ходе развития нескольких новых антигенов (Perlmann, 1953; Ranzi, 1957). Особенно интересными казались работы, где в гибридных зародышах находили антигены отцовского вида, что явно свидетельствовало о синтезе новых белков под генетическим контролем зародыша (Harding et al., 1954). Работы эти, однако, дали очень небольшой материал. Их воспроизводимость также невелика. Так, некоторыми авторами уже в недавних исследованиях гибридов морских ежей не удалось достоверно обнаружить ни новых антигенов в ходе развития, ни появления антигенов отцовского вида (Badman, Brookbank, 1970). Тем не менее закономерное появление новых антигенов, их локализация в клетках и в разных типах клеток и, наконец, зависимость их появления от активности ядер были описаны у зародышей морского ежа в работах Вестина (Westin, 1969, 1972; Westin, Perlmann, 1972).

Начиная с 60-х годов широкое распространение получают методы хроматографического и электрофоретического разделения белков. В одной из первых работ такого рода Монрой и сотрудники (Monroy et al., 1961) метили растворимые белки морского ежа ^{35}S -метионином на разных стадиях и фракционировали на колонках с ДЕАЕ-целлюлозой. Профиль белков, при довольно малом разрешении метода, не изменялся от стадии к стадии, и представлял интерес лишь некоторые различия в радиоактивности (скорость синтеза), которые свидетельствовали об изменении состава синтезируемых белков.

В аналогичной более поздней работе (Spiegel et al., 1965) использовали электрофорез в полиакриламидном геле, который давал лучшее разрешение смеси белков. Это позволило выделить семь четких типов радиоактивности. Авторы нашли аналогичное распределение на стадиях 16 бластомеров и гастрюле. Более того, в присутствии актиномина Д с самого начала развития синтезируются те же самые (в пределах разрешения) виды белков. Авторы отмечают ограниченность своего метода. Они использова-

ли только растворимые белки, а разрешение определялось толщиной срезов, на которые разрезался полиакриламидный гель.

При разделении белков на ДЕАЕ-сефадексе число пиков было больше (Ellis, 1966), но среди них лишь несколько пиков воспроизводилось четко. По мере развития на этот раз было обнаружено постепенное увеличение числа пиков радиоактивности, т. е. синтез новых видов белка, отсутствующих в яйце. Актиномицин почти не влиял на профиль радиоактивности на ранних стадиях, но подавлял начало синтеза новых белков на стадиях гастрюлы.

Электрофоретическое разделение основных (растворимых в кислоте) белков позволило обнаружить ранние изменения в составе белков яйца амфибий и морских ежей после оплодотворения: исчезновение одних и появление других фракций в период раннего дробления и на стадии гастрюлы (Silver, Comb, 1967; Spiegel et al., 1970).

Большее разрешение было получено в том случае, когда после электрофореза меченых белков полиакриламидный гель не нарезали, а прикладывали к фотопленке, экспонировали, и радиоактивность регистрировали автордиографически (Terman, Gross, 1965). Сравнение содержания белка на том или ином участке геля (по фотометрии окраски геля) с его радиоактивностью (по фотометрии приложенной к этому же участку фотопленки) показало, что скорость синтеза различных белков не пропорциональна их содержанию в зародыше: удельная активность, т. е. скорость обновления одних фракций, намного больше, чем других. Профиль радиоактивности меняется в ходе развития, особенно на стадиях бластулы-гастрюлы. При добавлении актиномицина картина мало меняется на ранних стадиях, но отличия становятся значительными на стадии гастрюлы. Существенно, что некоторые изменения профиля белков происходят в ходе развития и в присутствии актиномицина, что доказывает независимость этих изменений от непосредственного ядерного контроля.

В поздней работе Терман (Terman, 1970) использовал еще более эффективный метод, сравнивая электрофоретическую подвижность белков, различно меченных на двух стадиях — сразу после оплодотворения (^{14}C -лизин) и на стадии бластулы (^3H -лизин). Если обе метки вводить одновременно, то их отношение остается постоянным во всех фракциях, так как естественно, что включение лизина во все белки не зависит от того, каким изотопом он был помечен. Это отношение было принято за единицу. Однако при электрофорезе смеси белков, полученных из зародышей, меченных на двух стадиях (зигота и бластула), отношение $^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ многих фракций отличалось от единицы, т. е. одни белки интенсивнее синтезировались в начале развития, а другие на стадии бластулы (Terman, 1970). При сравнении этим же методом синтеза белков в нормальных и анимализированных зародышах было показано, что средний молекулярный вес синтезируемых белков по мере развития уменьшается и что анимализация, существенно

нарушающая нормальный ход морфогенеза, относительно слабо сказывается на профиле синтезируемых белков (Carroll et al., 1975).

Исследование меченых (вновь синтезированных) антигенов показало, что новые виды белков появляются у зародышей морского ежа только после выклева, на стадии мезенхимной бластулы (Westin, 1969, 1972): один меченый антиген появляется заново и один, который до этой стадии присутствовал, начинает метиться, т. е. обновляться. Актиномицин блокирует эти предгастрюляционные изменения.

Метод иммунофлуоресценции позволяет не только обнаружить антигены, но и установить их локализацию в клетках и частях зародыша. У зародыша морского ежа два таких антигена (один в цитоплазме, другой в наружной мембране) постепенно уменьшаются в ходе развития и исчезают до начала гастрюляции. Третий антиген присутствует в яйце в очень небольших количествах, но его концентрация нарастает по мере развития, и после выклева он оказывается локализованным в мезенхимных мигрирующих клетках (Westin, Perlmann, 1972).

Иной подход к оценке состава синтезируемых белков был предложен в лаборатории Спигелмана (Slater, Spiegelman, 1968). У зародыша морского ежа на разных стадиях развития выделяли РНК, фракционировали в градиенте сахарозы, и затем исследовали матричную активность фракций в системе *in vitro*. За время развития — от неоплодотворенного яйца до стадии гастрюлы — матричная активность РНК практически оставалась неизменной (несмотря на значительные изменения в скорости процесса трансляции в зародыше). Матричная активность фракций РНК качественно не менялась (РНК в этих опытах делилась по размерам на семь фракций), но можно было отметить, что в яйце преобладает синтез на легких матрицах, а на стадии гастрюлы — на тяжелых.

У амфибий электрофоретическое разделение меченых белков позволяет обнаружить первое появление новых видов белка уже на стадии 64 бластомеров (Malacinski, 1971), т. е. задолго до начала активации синтеза РНК (рис. 53). В последующем развитии эти различия возрастают. К стадии средней — поздней бластулы синтезируется около 30% белков, которые не синтезировались в только что оплодотворенном яйце. Яйца мутантов с дефектным оогенезом имеют несколько иной профиль радиоактивности, и часть заново синтезирующихся белков у них не появляется. Это обнаруживается уже на стадии поздней бластулы, т. е. до начала функции генов зародыша.

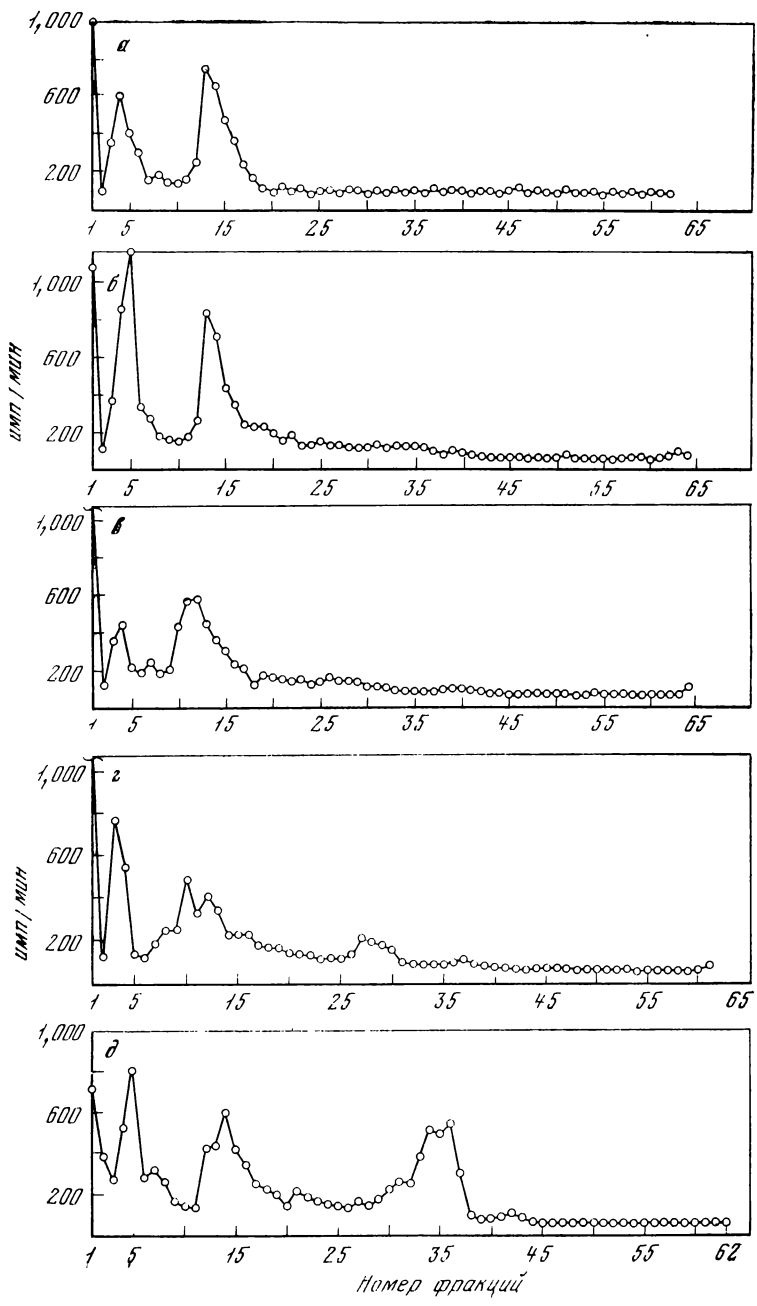
В аналогичной работе (Spiegel et al., 1970) электрофоретическое разделение нерадиоактивных белков целого гомогената позволило выявить в печени и в яичнике взрослой лягушки 28 и 14 полос соответственно, что свидетельствует о сравнительно низком разрешении метода. Тем не менее при сравнении белков

яйца и зародышей уже на стадии 8 бластомеров было замечено появление новой полоски, которая исчезла на стадии ранней бластулы, и еще одной полоски, появившейся на стадии ранней гастролы и сохраняющейся в течение всего последующего развития. У амблистомы тем же методом было замечено появление трех новых полос на стадии гастролы. Так как в данном случае измерялось не включение меченого предшественника, а изменение состава белков, то появление новой полосы свидетельствовало о синтезе заметных количеств нового белка или о значительном накоплении одного из ранее существующих.

Региональные различия в интенсивности синтеза белка не всегда можно надежно установить, так как они могут быть связаны не с собственно интенсивностью, а с разным количеством балластного белка желточных гранул. Однако у зародышей вьюна в бластомерах базального слоя, прилегающих к желтку и содержащих больше желточных гранул, чем клетки наружных слоев, включение меченых аминокислот выше (Буракова, Костомарова, 1975). Эти различия коррелируют с большей концентрацией рибосом в этих клетках (Костомарова, Нечаева, 1970).

Качественные отличия в составе синтезируемых белков были обнаружены на ранних стадиях развития моллюска *Myanassa* (Donohoo, Kafatos, 1973). На стадии двух бластомеров (AB и CD) их отделяли друг от друга и выращивали в течение нескольких часов отдельно в присутствии аминокислот, меченных по ^{14}C или ^3H . После этого зародышей, полученных из обеих половинок, гомогенизировали совместно и их белки фракционировали электрофоретически — прямо или после предварительного разделения с помощью сульфата аммония (рис. 54). Если каждый из бластомеров выращивали в присутствии аминокислоты с обеими видами метки, то отношение меток (^{14}C и ^3H) во всех фракциях оставалось постоянным (в данных опытах — 1,3), так как в каждый белок одинаково включалась аминокислота, меченная как той, так и другой меткой. Если же бластомеры AB инкубировали с ^{14}C -аминокислотами, а бластомеры CD с ^3H -аминокислотами, то результат был иной. Отношение меток в каждой из этих фракций оказывалось равным 1,3 только тогда, когда белки данной фракции в производных обоих бластомеров синтезировались в равном количестве. Если же бластомеры различались по скорости синтеза тех или иных белков, то изменялось и отношение. Оно было больше, чем 1,3, если данный белок синтезировался быстрее в производных бластомера AB, и меньше, чем 1,3, если эта фракция быстрее синтезировалась в производных бластомера CD.

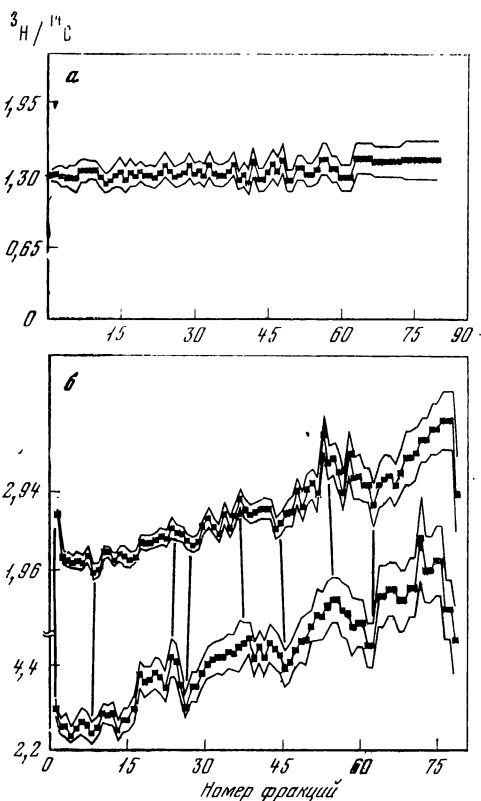
Эти результаты очень четко показывают, что в период раннего дробления белки, синтезируемые в половине зародыша, выращиваемого из одного бластомера, по меньшей мере количественно отличаются от белков, синтезируемых в потомстве второго бластомера. Полнакриламидный гель, в котором проводили электрофорез, резали в этой работе на 40 дисков, т. е. все растворимые



номер фракций

Рис. 54. Различия в составе белков, синтезируемых в зародышах, выращенных из АВ и CD бластомеров моллюска *Hymanassa*

В контроле (а) зародышей выращивали в среде с ^3H - или с ^{14}C -лейцином, смешивали и белки разделяли электрофоретически. В опытах (б) зародышей на стадии двух клеток разделяли на АВ и CD бластомеры, выращивали с ^{14}C - и ^3H -лейцином соответственно, белки подвергали совместному электрофоруезу и определяли распределение в геле отношения ^3H и ^{14}C радиоактивностей. В контроле отношение $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ одинаково во всех фракциях, в опытах это отношение меняется, отражая различие состава белков, синтезируемых в зародышах, выращенных из АВ и CD бластомеров (Donohoo, Kafatos, 1973)



белки делили на 40 фракций. Это означает, что в состав каждой фракции могло входить несколько видов белков в различных количественных соотношениях. Вполне возможно, что в действительности бластомеры отличались друг от друга по составу синтезируемых белков не только количественно, но и качественно. Например, большее включение ^{14}C -аминокислот в данную фракцию могло означать не то, что в бластомерах АВ синтезируется больше тех же самых белков, а то, что синтезируются и с большей скоростью совсем другие белки со сходной электрофоретической подвижностью.

Рис. 53. Изменение состава синтезируемых белков в раннем развитии аксолотля

На разных стадиях развития в зародыши инъецировали ^3H -лейцин и через 2—10 час. меченые белки разделяли электрофоретически. а — оплодотворенное яйцо; б — первое деление; в — стадия 16 бластомеров; г — стадия 64 клеток; д — стадии средней — поздней бластулы. На стадии 64 клеток возникает отсутствующий ранее новый белок (фракции 27—32) (Malacinski, 1971)

Морфогенетические различия бластомеров АВ и СD у мозаично развивающихся яиц *Xenopus laevis* обнаруживаются уже на самых ранних стадиях, так как в бластомере СD образуется так называемая полярная лопасть — вырост, определяющий последующую дифференцировку, в основном, в мезодермальные структуры. Удаление полярной лопасти приводит к образованию дефектного зародыша, имеющего только эктодермальный покров с ресничками и энтодермальные производные. Синтез белка у таких дефектных зародышей с самого начала отличается от нормального — он намного ниже и его усиление во время гаструляции наступает позже и достигает меньших величин (Colliger, 1961).

Сравнение состава синтезируемых белков у нормальных зародышей и зародышей, лишенных полярной лопасти, методом двойной метки показывает существенные различия, которые возникают через 24 часа после оплодотворения, еще до начала органогенеза (Newrock, Ruff, 1975). Эти различия частично сохраняются и в присутствии актиномицина, т. е. влияние полярной лопасти сказывается и на уровне трансляции.

Электрофоретическое исследование состава белков в раннем развитии млекопитающих (мышь и кролик), проведенное в последние годы, позволило обнаружить изменения профиля синтезируемых белков на тех стадиях, на которых еще не происходит видимой дифференцировки (Van Blerkom, Manes, 1974; Epstein, Smith, 1974; Manes, 1975). В работах Мане на эмбрионах кролика высокое качество электрофореза и контактной ауторадиографии гелей позволило выявить около 100 фракций синтезируемых белков на всех, даже самых ранних стадиях развития. Качественные и количественные изменения в составе синтезируемых фракций были обнаружены уже на стадиях 8 бластомеров (1,5 суток развития) и затем перед образованием бластоцисты (3,5 суток развития). При этом не только появлялись новые полосы, но частично исчезали старые. Авторы отмечают, что даже выявление 100 полос не позволяет говорить о том, что каждая из них является гомогенной и представлена одним белком.

На ранних зародышах мыши использован метод двойной метки для сравнения разных стадий. Однако разрезание геля на конечное число дисков и определение в каждом из них радиоактивности по обонм изотопам (^{14}C и ^3H) позволили сравнить всего 25 фракций (Epstein, Smith, 1974). Оказалось, что в трех фракциях наблюдалось увеличение скорости синтеза, а в двух — его падение. Эти изменения происходят между первыми и вторыми сутками развития, на стадиях от 2 до 8 бластомеров. Существенно, что эти изменения происходят до общего увеличения скорости синтеза белка, которое начинается после стадий 8—16 клеток.

Большее разрешение (свыше 400 фракций) было получено, когда белки зародышей мыши разделяли на двумерной хроматограмме (карте) изоэлектрической фокусировкой в одном направлении и электрофорезом (с додецилсульфатом натрия или без

него) — в другом. Этот метод показал, что на 9-й день развития исчезает около 40% белков большого молекулярного веса, а в период с 9 по 14 день появляется множество новых белков. В ходе дальнейшего развития в разных органах постепенно возрастает число транспецифических белков (Klose et al., 1976).

Таким образом, и для млекопитающих оказалось, что многие изменения состава транслируемых белков не определяются морфологическими процессами, а скорее предшествуют им и происходят под контролем собственного «часового механизма».

Фракционирование гомогенатов позволяет исследовать синтез белка в разных клеточных фракциях зародыша. На зародышах морского ежа (Kedes et al., 1969a) и вьюна (Krigsgaber et al., 1971) было показано, что на ранних стадиях развития особенно высокая удельная активность обнаруживается в ядрах (синтез ядерных белков рассматривается в следующем разделе). Удельная активность митохондрий и гялоплазмы (цитозоля) мало отличается от таковой общего белка.

Митохондрии. Количество митохондрий в ходе эмбрионального развития рыб (Абрамова, Васильева, 1973; Нейфах и Абрамова, 1974), амфибий (Chase, Dawid, 1972) и иглокожих (Gustafson, Lencique, 1952, 1955; Shaver, 1956; Gustafson, 1965) почти или совсем не увеличивается. У ксенопуса — шпорцевой лягушки *X. laevis* — количество митохондриального белка начинает увеличиваться после вылупления (стадия 38) и удваивается к началу самостоятельного питания головастика (стадия 45) (Chase, Dawid, 1972). Активность цитохромоксидазы точно соответствует количеству митохондриального белка. Синтез ДНК в митохондриях, однако, начинается у лягушки раньше и резко возрастает между стадиями 30 и 32, но количество митохондриальной ДНК удваивается только к стадии 45. В то же время в митохондриях довольно рано начинается синтез РНК, в частности, рРНК. Скорость синтеза возрастает в 8 раз уже на стадии 10 (ранняя гастрюла), т. е. до того, как начинается синтез рРНК в ядрах лягушки. Независимость этого синтеза от ядерного очевидна еще и из того, что синтез митохондриальной рРНК идет в нормальном темпе и у безъядрышковых мутантов. Тем не менее количество митохондриальной рРНК растет медленно и удваивается к стадии 45 (Chase, Dawid, 1972). У вьюна количество митохондриальной ДНК в ходе эмбрионального развития почти не меняется, а синтез ее начинается на стадии позднего органогенеза (Гаузе, Михайлов, 1973).

Все эти данные позволяют отдельно рассматривать два процесса — обновление митохондриальных белков и увеличение их количества. Синтез митохондриальных белков идет, очевидно, с ранних стадий развития, причем частично или полностью это происходит в самих митохондриях, о чем свидетельствует относительно высокое содержание в них рРНК и их ранний синтез. Данные о митохондриальных ферментах у гибридов показывают, что образование новых молекул энзимного белка (контролируемо-

го отцовским генотипом) начинается раньше, чем начинается увеличение количества митохондрий, — у амфибий уже на стадии 19 (биение сердца) (Wright, Moyer, 1966; Wright, Subtelny, 1971), у вьюна — на стадии 14 час. (Абрамова и др., 1977).

Можно, очевидно, сделать вывод, что на протяжении всего эмбрионального развития происходит синтез митохондриальных белков, который уравнивается их распадом. Судя по тому, что относительно рано начинается и синтез митохондриальной ДНК, в эмбриогенезе может происходить не только замена отдельных молекул белка, но и целых митохондрий. На поздних стадиях развития уровень синтеза превышает распад, и количество митохондрий начинает увеличиваться. У амфибий это совпадает с началом заметного использования желтка, т. е. увеличения массы активной цитоплазмы. Таким образом, в зародыше поддерживается относительно постоянная концентрация митохондрий (Нейфах, Абрамова, 1974).

Рибосомы. Количество рибосом у амфибий, рыб и иглокожих также остается постоянным в течение большей части эмбриогенеза и начинает медленно увеличиваться в его конце. У вьюна количество РНК (рибосом) на стадии личинки всего в 1,5 раза больше, чем в начале развития (Тимофеева, Кафиани, 1964).

Однако относительно ранний синтез рРНК (см. выше) показывает, что уже в первой половине эмбриогенеза происходит замена всех рибосом. Очевидно, при этом заменяются и рибосомальные белки. По данным лаборатории Брауна (Hallberg, Brown, 1969), синтез рибосомальных белков происходит координированно с синтезом рРНК и отсутствует у безъядрышковых мутантов. Если это так, то синтез этих белков должен начинаться у рыб и амфибий в конце гастрюляции, а у морского ежа несколько раньше. Однако в литературе появляется все больше данных о функциональном обмене части рибосомальных белков, и в этом случае их синтез может предшествовать новообразованию рибосом (Kaulenas, Unsworth, 1974). У вьюна слабое включение в белки рибосомной фракции обнаруживается уже на стадии бластулы, но синтез рибосомальных белков надежно обнаруживается только со времени органогенеза (Кригсгабер и др., 1976).

Согласно более новым данным, при избирательном подавлении синтеза рРНК синтез рибосомальных белков продолжается, т. е. их координация может быть и не жесткой (Craig, Perry, 1971; Kaulenas, Unsworth, 1974).

В ходе развития увеличивается количество мембранных белков. Нетрудно рассчитать, что площадь поверхности клеточных оболочек в ходе делений дробления возрастает, как кубичный корень от числа клеток. Это означает, что к стадии ранней — средней бластулы у амфибий и рыб и к стадии гастрюлы у морского ежа (около 1000 клеток) количество этих белков должно увеличиться в 10 раз. Возможно, что часть белков клеточной мембраны в какой-то форме запасена в оогенезе, но более вероят-

но, что синтез этих структурных белков начинается с самых ранних стадий развития (см. Чугуев и др., 1976). Так, увеличение включения меченого холина — предшественника липопротеинов мембран и фосфорилирования холина в ходе делений дробления яиц морского ежа — приблизительно параллельно увеличению площади клеточных мембран (Pasternak, 1973). Однако значительного увеличения активности ферментов клеточной мембраны в ходе делений дробления яиц морского ежа обнаружить не удалось (Trams et al., 1974). По мере цитодифференцировки в клетках существенно возрастает площадь внутриклеточных мембран — эндоплазматический ретикулум, структуры аппарата Гольджи и т. д. Если все они образуются в ходе развития, то удельная активность этих белков на ранних стадиях должна быть намного выше активности общего белка. Некоторые изменения в белках эндоплазматического ретикулума в ходе онтогенеза действительно были обнаружены (Black, Bresnick, 1972).

Таким образом, в ходе раннего развития происходит интенсивный синтез белков, но только часть этих видов белков отсутствует в яйце и появляется в ходе развития впервые. По массе доля этих новых видов белков на ранних стадиях невелика, но их число в принципе должно быть значительным. Используемые до сих пор методы позволяют пока говорить о немногих видах таких белков, но их число будет возрастать по мере усовершенствования техники или более широкого применения уже существующих методов разделения к эмбриональным объектам.

О количестве видов синтезируемых белков можно судить по количеству видов информационных РНК, находящихся в полисомных комплексах. Такое измерение было проведено в лаборатории Давидсона и Бриттена (Galau et al., 1974) на стадии гастрюлы морского ежа, где избыток мРНК, извлеченных из полисом, гибридизировался с уникальными последовательностями ДНК. По количеству связываемой РНК и исходя из средних размеров мРНК для одного белка авторы рассчитали, что на стадии гастрюлы морского ежа синтезируется 14 тыс. видов белка. Это число кажется чрезмерно большим, так как доля активных генов на стадии гастрюлы вряд ли превышает 10% общего числа генов, которое у иглокожих, судя по количеству ДНК и по аналогии с дрозофилой, по-видимому, не превышает одного-двух десятков тысяч. Тем не менее очевидно, что количество видов синтезируемых белков в зародыше измеряется многими сотнями, если не тысячами, в то время как доступные нам сейчас методы позволяют говорить лишь о десятках таких белков.

Ядерные белки

Во время делений дробления количество ядер возрастает в геометрической прогрессии и после десяти синхронных делений (амфибии, рыбы) их число достигает тысячи. У морского ежа

число синхронных делений меньше, но у всех животных в ходе раннего развития число ядер быстро увеличивается и, соответственно, возрастает общая масса ядерных белков. Масса цитоплазмы при этом практически не изменяется, и, следовательно, доля ядерных белков увеличивается в сотни и тысячи раз. Точный расчет этих величин затрудняется тем, что на ранних стадиях по мере развития уменьшается размер ядер, изменяется состав белков, а на более поздних стадиях может несколько увеличиваться масса цитоплазмы (за счет желтка).

Выше уже говорилось, что меченые белки зародышевого пузырька, синтезированные во время созревания, после начала развития обнаруживаются в ядрах бластомеров (Ecker, Smith, 1971). В зрелом яйце эти меченые белки находятся в цитоплазме, но быстро концентрируются в ядрах, образующихся в ходе дробления или искусственно трансплантированных в яйцо (Merriam, 1969; Gurdon, 1970; см. Gurdon, 1974).

В то же время при инкубации ранних зародышей морского ежа с мечеными аминокислотами удельная активность ядерных белков оказывается значительно выше, чем тотального белка. По данным лаборатории Гросса, часть ядерных белков у ранних зародышей морского ежа транслируется на РНК, синтезированных в ядрах 2—8-клеточного эмбриона (Kedes et al., 1969a, b; Shutt, Kedes, 1974). Расчет показывает, что мРНК ранних полирибосом не менее чем на 85% состоит из РНК, предшествующей в яйце (Humphreys, 1971).

Количество ядерных белков в ходе раннего развития увеличивается за счет двух источников — белков, синтезированных в оогенезе и хранящихся в цитоплазме яйца, и белков, синтезированных на ранних стадиях развития зародыша. В свою очередь последние можно разделить на белки, которые транслируются на матрицах РНК, транскрибированных в оогенезе, т. е. на ДНК материнского генома, и белки, которые синтезируются на новообразованных РНК, транскрибированных в ядрах самого зародыша (Gross et al., 1973a, b; Ruderman, Gross, 1974).

В ядрах различают белки хроматина, относительно прочно связанные с ДНК, и белки карิโอплазмы. При обычных методах изоляции ядер часть белков карิโอплазмы (до 30% всех белков ядер) может теряться. Белки хроматина состоят из основных, кислоторастворимых белков — гистонов и кислых, негистоновых белков. Гистоны, очень тщательно исследованные в последнее десятилетие, сейчас хорошо систематизированы и охарактеризованы. Современная классификация различает пять основных и две дополнительных фракции гистонов: богатые лизином гистоны — H1, H2a и H2b, а также H5 (ранее f1, f2a, f2b, f2c) с соотношением лизин : аргинин соответственно: 2,2; 2,5 и 2,0, и богатые аргинином гистоны — H3 и H4 (ранее f3 и f2a1) с отношением лизин : аргинин 0,8 и 0,7. Каждая из этих фракций при электрофорезе может разделяться на 2—3 полосы, возможно, отражающие моди-

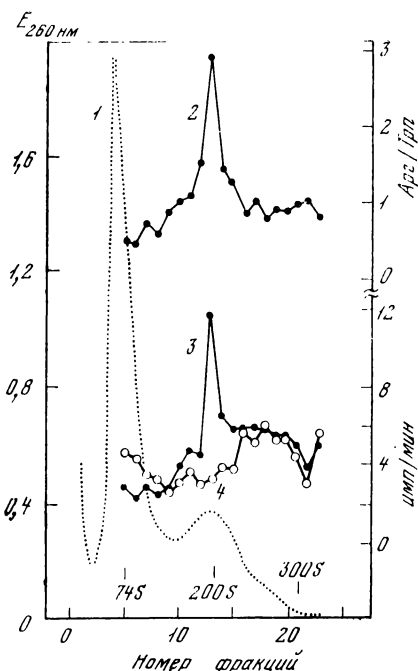
Рис. 55. Синтез гистонов на легких полисомах морского ежа

Зародыши *Strongylocentrotus purpuratus* на стадии морулы 5 мин инкубировали со смесью ^{14}C -аргинина и ^3H -триптофана. Гомогенат исследовали центрифугированием в сахарозном градиенте и во фракциях определяли активность ^3H и ^{14}C

1 — оптическая плотность ($E_{260 \text{ нм}}$);
2 — отношение включения аргинина к триптофану;

3 — включение аргинина;

4 — включение триптофана. Показаны значения констант седиментации для рибосом 74S и для тяжелых и легких полирибосом. Большее включение аргинина, чем триптофана, в области легких полирибосом (200S) отражает синтез значительной доли гистонов (Nemer, Lindsay, 1969)



фикацию гистонов — их ацетилирование, фосфорилирование и т. д. Некоторые фракции гистонов (например H1), вероятно, существуют в виде нескольких субфракций, различающихся по первичной последовательности, т. е. кодируемые разными генами.

Однако на самых ранних эмбриональных стадиях, когда получение достаточного количества высокоочищенных ядер представляет сложную техническую проблему, обычные методы разделения ядерных белков в разных лабораториях приводили к неодинаковым результатам. Так, отождествление кислоторастворимых белков и гистонов не всегда признается правомерным, и даже электрофоретическая идентификация кажется недостаточной (ср. Hnilica, Johnson, 1970; Johnson, Hnilica, 1971; Evans, Ozaki, 1973).

После инкубации зародышей с мечеными аминокислотами удельная активность суммы ядерных белков у ранних зародышей морского ежа в четыре раза выше, чем белков цитоплазмы, а также нехроматиновых белков ядра (Silver, Comb, 1967; Thaler et al., 1970). Последнее означает, что белки хроматина синтезируются быстрее остальных белков ядра более чем в четыре раза. Несмотря на то, что объем ядер на ранних стадиях во много раз меньше объема цитоплазмы, синтез ядерных белков у морского ежа составляет не менее 40—60% общего синтеза белка, причем 25% приходится на гистоны (Kedes et al., 1969a; Nemer, Lindsay, 1969) (рис. 55).

У зародышей вьюна удельная активность ядерных белков на стадии бластулы — ранней гастролы в 3—3,5 раза выше, чем удельная активность общего белка (Krigsgaber et al., 1971). При этом размер ядер и содержание в них сухого вещества медленно уменьшаются (Маршак, Нейфах, 1973). Зная число ядер на разных стадиях развития (Ротт и Шевелева, 1967) и содержание в них белка, нетрудно рассчитать природу массы ядерных белков и оценить их долю в общем синтезе, которая у вьюна на стадиях бластулы — гастролы составляет 6—15% (Маршак, Нейфах, 1973).

Вопрос о месте синтеза ядерных белков в эмбриогенезе до сих пор иногда дискутируется, хотя определенно преобладает та точка зрения, что ядерные белки синтезируются только в цитоплазме, а затем мигрируют в ядра (Sevaljevic, 1974; Feldherr, Richmond, 1976). Однако в отдельных работах, в том числе и на изолированных ядрах зародыша морского ежа, как будто бы демонстрируется включение меченых аминокислот прямо в белки ядер (Løvtrup-Rein, 1972). Возможно, что в этой, как и в других подобных работах, речь идет о синтезе белка на рибосомах, лежащих на наружной поверхности ядерной мембраны.

Очень тщательное исследование, проведенное недавно, показало, что в ядрах морского ежа на стадии бластулы если и синтезируется, то не более 0,2% всех новых белков, и, вероятнее всего, синтез белка в них совсем не происходит (Allen, Wilt, 1976).

В большинстве лабораторий гистоновые белки в ядрах морского ежа обнаруживаются на всех стадиях развития, в том числе и в ядрах неоплодотворенного яйца (Thaler et al., 1970; Evans, Ozaki, 1973; и др.). Особое место занимают работы Хнилицы и Джонсона, которые в ряде сообщений отрицают наличие гистоновых белков до стадии бластулы или хотя бы до стадии 32—64 бластомеров.

Затем ими (Johnson, Hnilica, 1971) было найдено, что уже на стадиях 32—64 бластомеров синтезируется один из гистонов — H3, который, однако, включается в состав хроматина ядер лишь спустя несколько делений. Наконец, в последних работах этих авторов (Johnson et al., 1973a, b) уже не повторяется так категорично утверждение об отсутствии гистонов в ядрах дробящегося яйца морского ежа. На стадии 32—64 бластомеров обнаруживают «ядерные основные белки», которые электрофоретически движутся вместе с фракциями гистонов. На этих стадиях происходит ацетилирование основных белков — в большей степени тех, которые мигрируют в электрическом поле вместе с богатыми аргинином гистонами H3 и H4, и в меньшей степени богатых лизином H1, H2B и H2A. Скорость синтеза гистонов H4, H2B и H2A на последующих стадиях развития, согласно данным этой работы (Johnson et al., 1973b), вдвое опережает скорость синтеза ДНК, т. е. часть гистонов способна обновляться без одновременной репликации ДНК. По-видимому, можно заключить, что и, по

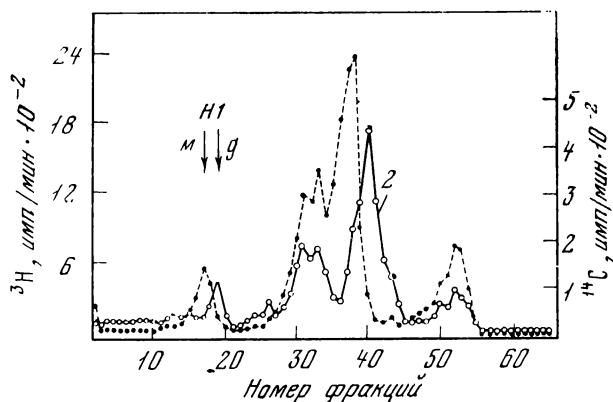


Рис. 56. Изменения синтеза гистонов в ходе развития морского ежа

Зародыши *Lytechinus pictus* на стадии морулы инкубировали с ^3H -лейцином (1) или на стадии плутеуса с ^{14}C -лейцином (2). Гистоны выделяли и фракционировали электрофоретически. Стрелки показывают субфракции H1m и H1g. Состав гистонов в развитии несколько меняется, в частности, фракция H1m заменяется на H1g (Ruderman, Gross, 1974)

данным группы Джонсона — Хнилица, гистоны появляются в ядрах зародыша морского ежа на достаточно ранних стадиях.

Другими авторами уже из ядер неоплодотворенных яиц морского ежа — пронуклеусов — были выделены гистоны, отличающиеся по составу от гистонов более поздних стадий (Thaler et al., 1970). Соотношение богатых лизином и аргинином гистонов у них равно 0,9, в отличие от сперматозоидов и зародышей на стадии гастрюлы, где эти цифры соответственно равны 1,4 и 1,3. Содержание гистонов в неоплодотворенных яйцах очень невелико, порядка 30 мкг на 10^8 яиц, что составляет 30—40% от количества ядерной ДНК. Их электрофоретический профиль отличается от такового гистонов более поздних стадий и содержит особые фракции, обнаруживаемые только в женских пронуклеусах (Evans, Ozaki, 1973). Таким образом, и согласно данным других исследователей на самых ранних стадиях развития соотношение гистоны : ДНК в ядрах оказывается меньше, чем это обычно обнаруживается в хромосомах (1 : 1). В более поздней работе было, однако, показано, что уже на стадии бластулы отношение гистоны : ДНК равно 1,4 и только после гастрюляции достигает окончательного соотношения — 1,0 (Rossia, Hinegardner, 1975).

Изменения в составе гистонов в ходе развития морского ежа были обнаружены в ряде работ (рис. 56). Синтез различных гистонов происходит с различной скоростью, и различной оказывается их зависимость от ядерного контроля. Так, гистоны H2B и H3 на стадии гастрюлы включают меченый валин в 50—70 раз быстрее, чем гистоны H1 и H2A. В присутствии актиномицина включение в H1 почти полностью прекращается, а в H2A, напротив, уси-

ливается, т. е. уменьшение трансляции на короткоживущих РНК (для Н1) компенсируется ее ускорением на долгоживущих матрицах (для Н2а) (Thaler et al., 1970).

Бентинен и Комб на стадии 32 бластомеров обнаружили все фракции гистонов, но их соотношение меняется в ходе развития за счет повышения доли богатых аргинином фракций. В цитоплазме зародышей гистоны они не обнаружили, и, следовательно, увеличение их общей массы и изменение состава происходит целиком за счет синтеза (Benttinen, Comb, 1971).

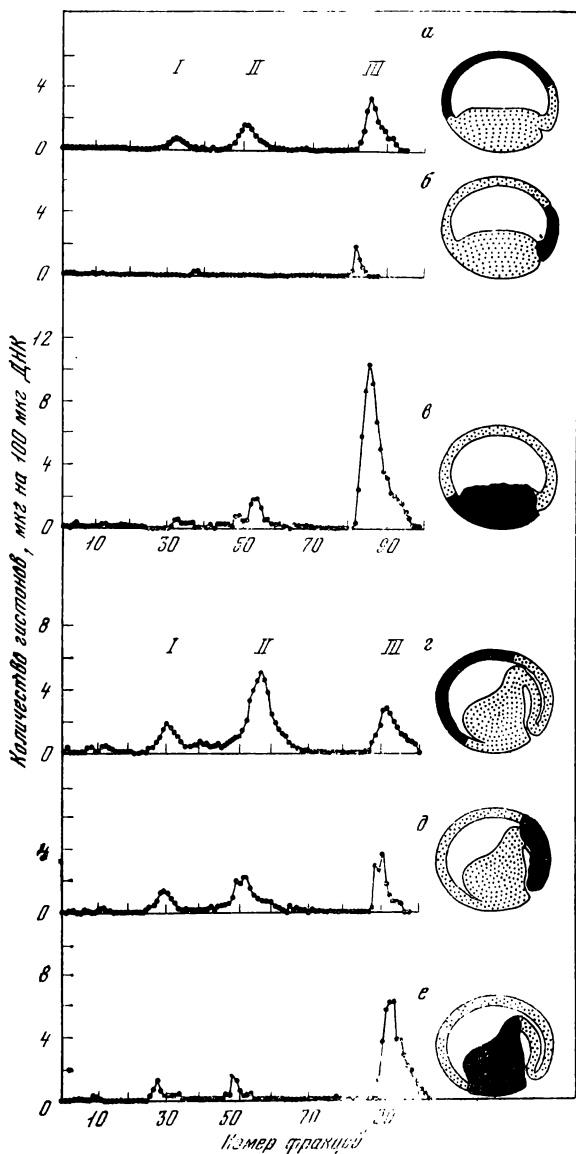
В работах Сила и Аронсона было показано, что на самых ранних стадиях развития морского ежа в ядрах содержится небольшое количество только богатых лизином гистонов — Н2А и Н2В. Со стадии 16 бластомеров в ядрах появляются богатый лизином гистон Н1а и богатый аргинином гистон Н3. Позже, на стадии мезенхимной бластулы, появляется гистон Н1б, и его содержание постепенно возрастает. На всех стадиях развития, от стадии 16 бластомеров до стадии плютеуса, происходит синтез всех гистонов, за исключением Н1а, синтез которого прекращается на стадии гастролы (20—30 час.), и Н1б, синтез которого начинается в это же время. Гистон Н1а, тем не менее, сохраняется в ядрах личинки до поздних стадий. Общее количество гистонов на единицу веса хроматина, по данным этой работы, в ходе развития постепенно снижается, возможно, за счет увеличения доли негистоновых белков (Seale, Aronson, 1973b). В последующей работе по гистонам зародышей морского ежа также показано постепенное замещение одной субфракции Н1 на другую, причем фактически ранняя субфракция — Н1m не вытесняется, а просто разводится поздней субфракцией — Н1g, которая на стадии бластулы составляет 50% всех гистонов Н1, а на стадии личинки — 99% (Rossia, Hinegardner, 1975).

Электрофоретическое разделение гистонов в присутствии детергента тритона X-100 позволяет разделить гистоны морского ежа Н2А и Н2В на несколько субфракций и показать, что их синтез меняется в ходе эмбрионального развития. Так, на стадиях до мезенхимной бластулы синтезируются одни из них, а позже — другие. Некоторые мидорные фракции образуются только в короткий период до стадии 16 бластомеров. Субфракции, синтезирующиеся позже, присоединяются в ядрах к тем, которые образовались раньше, и этим увеличивают общее разнообразие состава гистонов в ядрах (Cohen et al., 1975).

У зародышей амфибий, по данным Асао, общее содержание гистонов по отношению к ядерной ДНК возрастает от 0,4—0,6 на стадии бластулы до 1,0 на поздних эмбриональных стадиях (Asao, 1969, 1970). В отличие от морского ежа это повышение происходит в основном за счет богатых лизином гистонов (Н1А и Н2). На зародышах амфибий изменение состава гистонов было исследовано в разных зачатках, и при этом были обнаружены четкие региональные отличия (рис. 57). Отношение гисто-

Рис. 57. Региональные различия в содержании гистонов у зародышей тритона

Зародыши на стадиях ранней (а, б, в) и средней (г, д, е) гастролы микрургически разделяли на зачатки, из них выделяли гистоны и фракционировали на ДЕАЕ-целлюлозе. Представлен анализ гистонов зародышей стадии ранней гастролы из презумптивных эктодермы (а), хордомезодермы (б) и энтодермы (в); на средней гастроле — из эктодермы (г), хордомезодермы (д) и энтодермы (е). Используются участки на схемах показаны черным. Соотношение гистонов различается в разных частях зародыша и на разных стадиях развития (Asao, 1970)



ны : ДНК в первую очередь, уже на стадии поздней бластулы, начинает повышаться в клетках эктодермы и к стадии поздней гастролы достигает 0,8, причем доля богатых лизинном гистонов составляет 60—65%, а на стадии нейрулы — 80—83% (доля богатого аргинином гистона НЗ соответственно падает). В ядрах мезодермальных клеток этот процесс идет значительно медленнее — на стадии поздней гастролы отношение гистоны : ДНК еще очень

низко — 0,3, а доля гистона H3 составляет 67%. На стадии нейрулы эти значения соответственно равны 0,7 и 24%. Еще медленнее изменяется состав гистонов в энтодерме (Asao, 1969, 1970).

Синтез гистонов у ксенопуса обнаруживается уже во время дробления (Byrd, Kasinsky, 1973) и составляет на этих стадиях около 8% всех синтезируемых белков (Hallberg, Brown, 1969). На стадии бластулы у зародыша тритона был обнаружен возрастающий синтез всех основных фракций гистонов, причем синтез четырех из них (H3, H2B, H2A и H4) происходит параллельно с синтезом ДНК. Синтез гистона H1 резко возрастает до стадии гастрюлы, но затем остается на постоянном уровне, отставая от синтеза ДНК. И в скорости синтеза и в относительном содержании гистона H1 у зародышей тритона обнаруживаются региональные различия (Imoh, Kawakami, 1973). В то же время Касинский и сотрудники не обнаружили заметных различий в составе синтезирующихся гистонов на стадиях дробления и у плавающего головастика (Касинский и др., 1973). Наиболее обстоятельной следует, очевидно, считать работу Адамсона и Вудланда, которые исследовали синтез гистонов в ооците и на ранних стадиях развития ксенопуса. Важным достоинством этой работы является очень строгая идентификация гистонов по целому ряду параметров (включение лизина и аргинина, отсутствие включения триптофана, двумерный коэлектрофорез с чистыми препаратами гистонов, и, наконец, пептидный анализ для гистона H4) (Adamson, Woodland, 1974). Они показали, что синтез четырех видов гистонов идет на всех стадиях развития, кроме гистона H1, синтез которого начинается со стадии поздней бластулы. Синтез гистонов и их запасание происходят в оогенезе, когда синтеза ДНК нет, и продолжают после оплодотворения, когда суммарный синтез ДНК очень небольшой. По данным Адамсона и Вудланда, в яйце содержится запас гистонов, эквивалентный содержанию в 500 ядрах. К стадии 7 (бластула), когда зародыш содержит приблизительно 300 ядер, запас гистонов ставится эквивалентен 3500 ядрам, но к стадии 9 (15 тыс. ядер) он уже целиком исчерпывается, и дальнейший синтез ДНК и гистонов происходит, очевидно, координированно. Синтез гистонов в ооцитах и ранних зародышах амфибий был исследован также Маласинским (Malacinski, 1974).

Поздние стадии дифференцировки, в частности, терминальные дифференцировки, такие, например, как эритропоэз, также связаны с некоторыми изменениями состава гистонов. В первую очередь это относится к субфракциям гистона H1, для которых показана видо- и тканеспецифичность, хотя пока точно неизвестно, определяются ли они разными генами или модификациями одного полипептида. При дифференцировке эритроцитов у птиц в ядрах происходит гетерохроматинизация и падение синтеза РНК. Это сопровождается синтезом гистонов и негистоновых белков (Sadgoral, Kabat, 1969) и особенно специфического для эритроцитов гистона H5 (f2c), доля которого возрастает от 13% в раннем

эритропоэзе до 21% у взрослых животных (Moss et al., 1973). Роль этого гистона в подавлении синтеза РНК была показана в опытах Газаряна с солевой экстракцией гистонов из хроматина: удаление фракции H5 восстанавливает исходную матричную активность (Gasaryan, Andreeva, 1972).

Особым случаем дифференцировки, сопровождающимся, очевидно, полной заменой ядерных белков, является спермиогенез. Вслед за гистохимическими исследованиями этого процесса (см., например, Das et al., 1964) на ряде объектов биохимически было показано замещение гистонов ядра специфическими протаминоподобными гистонами или протаминами, что происходит на последних стадиях спермиогенеза, на фоне ранее остановленного синтеза РНК (см. Ling, Dixon, 1970; Brasiello, 1971; Vaughn, Thomson, 1972; MacMaster-Kaye, Kaye, 1976).

Состав негистоновых ядерных белков в дифференцирующихся системах исследован значительно хуже, прежде всего потому, что в эту группу попадает множество различных белков, методы идентификации которых пока почти не разработаны. Тем не менее на зародышах морского ежа показано, что эта гетерогенная группа белков содержит три главных пика и десять минорных (Gineitis et al., 1976). Эти белки качественно и количественно изменяются в ходе развития (Seale, Aronson, 1973a). Темп синтеза этих белков мало меняется на всех исследованных стадиях от стадии бластулы до плютеуса, но происходит не параллельно синтезу ДНК. Наибольший темп синтеза наблюдается на стадии бластулы (20 час.). По данным Сила и Аронсона, негистоновые белки синтезируются в цитоплазме и образуют в ней пул, из которого они медленно проникают во вновь образующиеся ядра и включаются в состав хроматина. Короткая инкубация с мечеными предшественниками с последующим прослеживанием судьбы синтезированных белков (метод чейза) показала, что белки, образованные еще на стадиях дробления, продолжают включаться в состав хроматина вплоть до гастрюляции.

Общее количество негистоновых белков в зародыше возрастает на всем протяжении развития, но до стадии мезенхимной бластулы значительная их часть (около половины) находится в цитоплазматическом пуле. Начиная с гастрюляции они включаются в состав хроматина (Seale, Aronson, 1973a).

Несколько ранее на зародышах морского ежа были показаны различия электрофоретического профиля негистоновых белков на стадиях 16 бластомеров, бластулы и плютеуса (Cognetti et al., 1972).

Аналогичное исследование на зародышах ксенопуса также показало, что распределение негистоновых ядерных белков по молекулярным весам (электрофорез в додецилсульфате) остается постоянным до стадии 18, но с началом движений (стадия 26) начинает изменяться, и эти изменения увеличиваются ко времени вылупления личинки (Theriault, Landesman, 1974) (рис. 58).

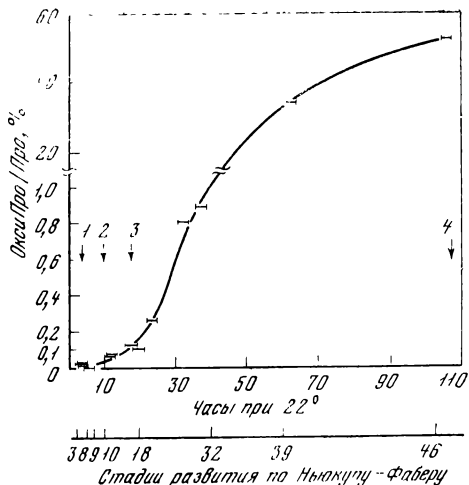
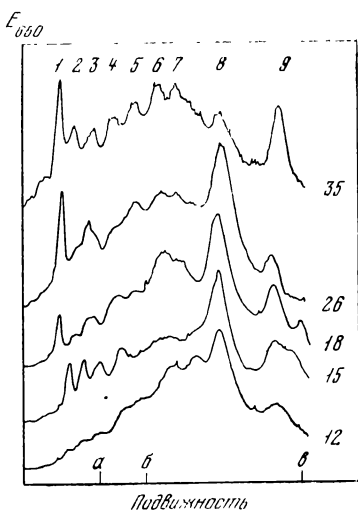


Рис. 58. Изменение состава кислых ядерных белков в развитии ксенопуса

Кислые белки извлекали из ядер на разных стадиях (цифры справа у кривых), фракционировали электрофоретически с SDS и количество измеряли денситометрией окрашенных гелей. Вверху приведены номера фракций; а, б, в — положение маркерных белков: сывороточного альбумина, овальбумина и цитохрома с. Спектр негистоновых белков в ходе развития обогащается за счет фракций большего молекулярного веса (фракции 1—5) (Theriault, Landesman, 1974)

Рис. 59. Синтез коллагена в эмбриогенезе ксенопуса

Зародышам на разных стадиях вводили ^3H -пролин и через 3 часа определяли в белке содержание ^3H -пролина и ^3H -оксипролина. Скорость синтеза коллагена выражали как процент пролина, превращенного в оксипролин (ордината). Стрелками указаны стадии развития: 1 — дробление; 2 — гастрюла; 3 — нейрула; 4 — свободное питание. Синтез коллагена впервые обнаруживается уже на стадии гастрюлы и далее значительно увеличивается (Green et al., 1968)

Изменения в скорости синтеза негистоновых белков отмечены также в эмбриогенезе клопа *Oncopeltus fasciatus* (Teng, 1974). Темп синтеза достигает максимума к 45 час. развития, а к 70 час. в зародышах создается максимальное отношение кислых ядерных белков к ДНК, которое затем снижается до постоянного соотношения к 12 час. Очевидно, и в этом случае синтез негистоновых белков не координирован с синтезом ДНК, а созданный на ранних стадиях запас используется в последующем развитии. Состав ядерных белков по мере развития становится более разнообразным (Teng, 1974).

Можно заключить, что из-за методических трудностей исследование синтеза и особенно содержания ядерных белков на ранних стадиях развития только сейчас позволяет получать относительно надежные данные. По-видимому, достоверно показано, что гистоны и негистоновые белки могут накапливаться в ооцитах и

клетках ранних зародышей и постепенно входит в состав хроматина по мере увеличения числа ядер. Однако формы хранения гистонов в цитоплазме неизвестны. Дальнейшей проверки и уточнения требуют и данные об изменениях соотношения гистоны : ДНК и содержании разных гистонов в хроматине на ранних стадиях развития. Эти изменения плохо согласуются с представлениями о стабильном соотношении между гистонами в нуклеосомах хроматина и в ближайшие годы, очевидно, должно быть установлено, отличается ли структура хроматина и, в частности, нуклеосом на ранних стадиях развития от хроматина более поздних стадий и клеток взрослого организма, или же полученные до сих пор данные о соотношении ДНК и гистонов в хроматине ранних зародышей являются артефактом.

СИНТЕЗ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

В этом разделе мы остановимся на нескольких белках, которые почти или совсем отсутствуют в яйце и появляются только в определенных тканях зародыша в ходе его развития. Таким образом, эти белки можно рассматривать как типичные белки дифференцировки, хотя в них скорее надо видеть не причину дифференцировки, а ее проявление. В то же время многие из рассматриваемых белков, такие, как тубулин, коллаген, миозин или кристаллин линзы, являются структурными белками и в значительной мере определяют форму клеток и их взаимное расположение, т. е. морфогенез. Эти белки объединяет то, что они выделяются и определяются как самостоятельные химические вещества. Этим они отличаются от отнесенных в следующий раздел ферментных белков, о количестве которых, как правило, судят косвенно, по их энзиматической активности.

Коллаген

Коллаген как белок, связанный с относительно поздними этапами дифференцировки — в основном дифференцировки соединительной ткани и хряща, — обычными методами обнаруживается относительно поздно (Edds, 1958; Deuchar, 1964).

Однако определение радиоактивного оксипролина — аминокислоты, встречаемой только в коллагене и эластине, позволяет обнаружить синтез коллагена на более ранних стадиях. Меченый пролин инъецировался зародышам ксенопуса на разных стадиях развития, а через 3 часа белки гидролизировались и в них определяли отношение радиоактивности оксипролина к радиоактивности пролина, которое отражало долю вновь синтезированного коллагена среди других белков (Green et al., 1968) (рис. 59). Коллаген не образуется вплоть до стадии бластулы, но четко выявляется уже на стадии ранней гаструлы, и далее его синтез быстро ускоряется вплоть до стадии питающегося головастика. Оксипролин

образуется в результате действия специфического фермента коллагенгидроксилазы на определенные аминокислотные остатки пролина, входящие в состав только что образованной полипептидной цепи — протоколлагена. Оказалось, что этот фермент, необходимый для образования коллагена, уже присутствует в неоплодотворенном яйце, но, очевидно, не функционирует вплоть до начала гастрюляции, когда начинается синтезироваться предшественник коллагена — протоколлаген и путем гидроксилирования части пролиновых остатков превращается в проколлаген.

Протоколлагеновая мРНК была выделена из эмбрионального зачатка кости. Она седиментирует при 30S, что соответствует приблизительно цепи в 4900 нуклеотидов, и может кодировать полипептид из 1600 аминокислот. Это значительно больше, чем действительный размер цепи протоколлагена — 1250 аминокислотных остатков (Boedtker, et al., 1974). Можно предполагать, что или мРНК коллагена имеет такую конфигурацию, что седиментирует быстрее, чем, например, рРНК, или что действительный размер полипептида сразу после синтеза еще больше, чем это до сих пор принималось.

Кроме оксипролина, в молекуле коллагена при участии соответствующей гидроксилазы образуется оксилизин, к которому затем присоединяются остатки сахаров, что делает этот белок гликопептидом. Молекула коллагена образуется из одинаковых или различных ($\alpha 1$, $\alpha 2$ и др.) субъединиц. Их комбинации определяют образование пяти известных сегодня различных типов коллагена. Таким образом, синтез коллагена контролируется несколькими генами, определяющими синтез самих полипептидов и модифицирующих их ферментов.

Формирование коллагеновых волокон включает еще один важный этап: субъединицы в составе проколлагена имеют молекулярный вес на 20 тыс. дальтон больше, чем в составе коллагена. Перед выходом проколлагена из клетки или сразу после этого происходит специфический протеолиз, отрезающий лишние последовательности и дающий тем самым возможность образовать окончательную четвертичную структуру коллагена.

Таким образом, образование коллагена контролирует еще один структурный ген, кодирующий эту специфическую протеазу.

Сократительные белки

К этому классу относят три основных белка — миозин, актин и тропомиозин, а также несколько миозиноподобных минорных белков, присутствующих в мышечных волокнах в небольших количествах. Молекула миозина состоит из двух одинаковых больших субъединиц (мол. вес 220 тыс.) и двух малых (мол. вес 15—30 тыс.). Актин не делится на субъединицы (мол. вес. 60—70 тыс.). Тропомиозин образован двумя субъединицами с мол. весом по 30—35 тыс. В соответствии с размерами этих молекул

синтез миозина происходит на очень больших полирибосомах, состоящих из 50—70 рибосом, актина — 15—25 рибосом и тропомиозина — 5—9 рибосом (см. Young, 1970). В состав мышечных волокон эти три вида сократительных белков входят в эквимольных количествах, но, естественно, сильно различаются по весовому содержанию.

Определенные, иногда значительные, количества миозина и актина обнаружены во многих видах клеток: фибробластах, миобластиках, в том числе в яйцеклетках (Mabuchi, 1976). Однако по своему молекулярному весу, антигенным свойствам, времени полужизни, количественным соотношениям эти сократительные белки отличаются от аналогичных белков мышц (Chi et al., 1975; Rubinstein et al., 1976). Их обнаруживают даже в составе негистоновых белков хроматина (Douvas et al., 1975). При мышечной дифференцировке неспецифические миозин и актин миобластов замещаются специфическими мышечными сократительными белками. Предполагается, что разные миозины контролируются разными генами (Chi et al., 1975; Rubinstein et al., 1976; Storti, Rich, 1976).

Синтез сократительных белков мышц начинается достаточно рано. У зародыша цыпленка это происходит прежде всего в зачатке сердца, которое начинает сокращаться уже в конце вторых суток инкубации. Синтез миозина обнаруживается на самых ранних этапах миогенеза обычно сразу после слияния миобластов в мышечные трубки. В последние годы этот процесс успешно исследуется не в зародыше, а в тканевой дифференцирующей культуре миогенных клеток (Coleman, Coleman, 1968; Schubert et al., 1973; Delain, Wahrmann, 1975; Rubinstein et al., 1976 и др.).

В отношении порядка синтеза сократительных белков литературные данные до последнего времени были несколько противоречивы. В ряде работ отмечается, что прежде всего синтезируется актин, затем миозин и, наконец, тропомиозин (см. Young, 1970). Электронно-микроскопические наблюдения также раньше обнаруживают в миобластиках короткие нити актина (50—60 мкм), а затем уже более длинные нити миозина (140—160 мкм) (Fischmann, 1970).

Однако наиболее чувствительным методом определения миозина является его обнаружение по связыванию с флуоресцентными антимиозиновыми антителами (Herrmann, 1970). Таким путем миозин выявляется тогда, когда в клетке накапливается около 10^5 молекул этого белка. Использование этого метода позволяет обнаружить миозин еще в период пролиферации миобластов в зачатке грудной мышцы цыпленка уже на 50—55 часу развития, а в зачатке конечностей на 4-й день, т. е. намного раньше, чем другими методами.

Согласно этим данным, синтез сократительных белков всех трех типов начинается одновременно и сразу в эквимольных

количествах, т. е. координированно. Координированность синтеза сократительных белков надежно показана в культурах мюогенных и немюогенных клеток (Rubinstein et al., 1976).

В ходе дифференцировки в культуре скорость синтеза мюозина возрастает от 1% от общего синтеза белка в делящихся мюобластах до 7% в мышечных трубках (Schubert et al., 1973). Концентрация мюозина в ходе эмбриогенеза увеличивается от 4% общего белка в мышцах 11-дневного цыпленка до 12% в мышцах взрослой курицы (Young, 1970). Эта относительно небольшая концентрация объясняется тем, что сам мюозин составляет около половины всех сократительных белков, и тем, что в составе белков мышцы значительную часть составляют ферменты, количество которых быстро нарастает во время мюогенеза. Экспериментальный анализ роли слияния мюобластов в индукции синтеза сократительных белков и специфических мышечных ферментов показал, что искусственное ограничение слияния клеток с помощью веществ, связывающих кальций, не останавливает синтеза специфических мышечных макромолекул (Delain, Wahrmann, 1975; Emerson, Becker, 1975; Moss, Strohman, 1976; Vertel, Fishmann, 1976; Turner et al., 1976).

Переход делящихся мюобластов к прекращению пролиферации и слиянию в микротрубочки стимулируется пептидными гормонами — инсулином и соматотропином (Naba et al., 1966). У зародышей птиц эти гормоны содержатся в яйце и стимулируют мюогенез задолго до начала секреции гормонов собственными железами.

Стимулирующим агентом мюогенеза является также характерный для мышц метаболит энергетического обмена — креатин (Ingwall et al., 1974). Его добавление активизирует синтез мюозина, но не общего белка.

Одновременно с сократительными белками в дифференцирующихся мышцах синтезируется множество специфических мышечных ферментов — креатинкиназа, мюокиназа, гликогенфосфорилаза, альдолаза А и другие, а также белки клеточной мембраны (Schubert et al., 1973; Delain, Wahrmann, 1975; Turner et al., 1976) — аденилатциклаза, ацетилхолиновый рецептор и ацетилхолинэстераза (Wahrmann et al., 1973; Prives, Paterson, 1974).

Синтез мюозина крысы продолжается и после гибридизации мюобластов крысы и фибробластов мыши; синтез мюозина мышц мыши при этом, однако, не обнаруживается (Buckingham et al., 1974b).

Количественные измерения скорости синтеза тяжелых цепей мюозина до и после слияния мюобластов были проведены по включению в них меченых лейцина и валина с одновременным измерением удельной радиоактивности пула. Со времени слияния скорость синтеза мюозина возрастает в 50—100 раз. Такое же возрастание происходит и в неслившихся мюобластах (в присутствии ЭДТА или уменьшенной концентрации сыворотки и эмбриональ-

Рис. 60. Увеличение доли полирибосом, синтезирующих миозин, в развитии эмбриона цыпленка

Миозинсинтезирующие полисомы, содержащие 50—70 рибосом, выделяли как наиболее тяжелые из общего профиля полисом (Herрман et al., 1970)

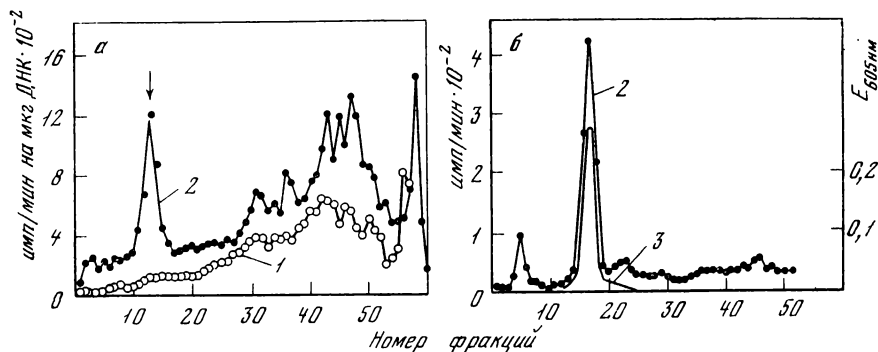
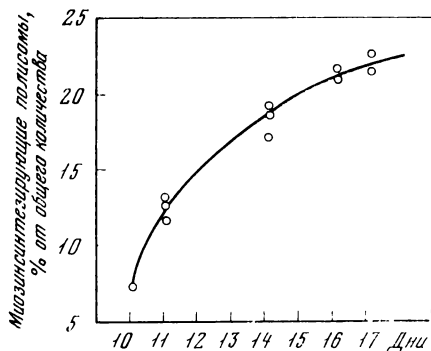


Рис. 61. Стимуляция синтеза миозина после слияния миобластов

Делящиеся (2 дня культивирования) и слившиеся (6 дней) миобласты инкубировали с ³H-лейцином. Тотальный белок (а) и очищенный миозин (б) фракционировали электрофоретически с SDS, вместе с маркерными тяжелыми цепями миозина; 1 — белки из делящихся миобластов; 2 — из слившихся в миотрубочки; 3 — маркерный миозин. Синтез миозина (фракции 12—16) активен в миотрубочках и очень мал в миобластах (Emerson, Becker, 1975)

ного экстракта) (Emerson, Becker, 1975). Большие цепи миозина (220 000) синтезируются на полирибосомах, состоящих из 50—75 рибосом (рис. 60). Время синтеза одной молекулы миозина — 5—10 мин., т. е. на одной нити мРНК транслируется 5—15 молекул миозина в минуту. При времени полужизни миозина 6 дней на одно ядро должно синтезироваться 30 тыс. молекул миозина в минуту (Emerson, Becker, 1975) (рис. 61).

В образовании субъединиц белков только собственно сократительного аппарата, включая и минорные компоненты, участвует 7—10 структурных генов. Их активация начинается на самых ранних этапах миогенеза, но значительно усиливается на завершающих этапах дифференцировки мышц.

Все больше данных накапливается о другом белке — актине. Кроме непосредственной сократительной функции в составе акто-

миозина в мышцах, он образует микрофиламенты и потому обнаруживается почти во всех типах клеток, где достигает концентрации 5—10% от числа всех белков. Его содержание в немышечных клетках особенно повышается в период дифференцировки нервных клеток, кожи, печени и др. (Santerre, Rich, 1976). Можно думать, что, входя в состав микрофиламентов, он определяет клеточные движения в морфогенезе. Но относительно высокая доля актина (3—5%) сохраняется и во взрослых тканях, где он выполняет, очевидно, какую-то другую функцию.

Кристаллины

Кристаллины принадлежат, вероятно, к числу наиболее хорошо изученных структурных белков. По их растворимости, подвижности в электрическом поле, молекулярному весу и иммунным свойствам различают α -, β - и γ -кристаллины, а у птиц и рептилий еще также δ -кристаллины или FISC (First Important Soluble Crystalline). Каждый из этих белков состоит из нескольких субъединиц. Следовательно, в образовании структуры линзы участвует не менее двух-трех десятков различных полипептидных цепей, которые, очевидно, кодируются соответствующим числом генов.

Дифференцировка линзы начинается с того, что над зачатком глаза (глазным пузырем) эктодермальный эпителий утолщается и втягивается в полость глаза, образуя линзовую плакоду. Далее это втягивание образует замкнутый эпителиальный пузырек, который отделяется от эктодермального эпителия. Клетки задней, утолщенной стенки пузырька удлиняются еще больше и заполняют всю его полость, образуя вытянутые прозрачные клетки линзового волокна, а передняя его стенка — линзовый эпителий. В экваториальной области можно видеть постепенный переход клеток эпителия в линзовые волокна. Рост линзы и образование новых волокон происходят за счет эпителия: его клетки в экваториальной зоне делятся и постепенно передвигаются назад, где они вытягиваются и превращаются в клетки линзовых волокон.

Таким образом, и после образования глаза на ранних стадиях эмбрионального развития в линзе отмечены последовательные этапы дифференцировки от мало специализированных эпителиальных клеток и до необратимо дифференцированных и высокоспециализированных линзовых волокон.

Первые кристаллины у зародышей цыпленка появляются уже в клетках линзовой плакоды через 56 час. инкубации. Эти кристаллины принадлежат к классу FISC (δ). На 80 часу инкубации их много и в эпителии и в волокнах линзы. Электрофоретический анализ показывает, что через 96 час. состав δ -кристаллинов в эпителии и волокнах различен — в первом содержатся первая и пятая субъединицы, а во вторых — третья и четвертая. К 15 дню развития FISC-кристаллины исчезают из эпителия, но

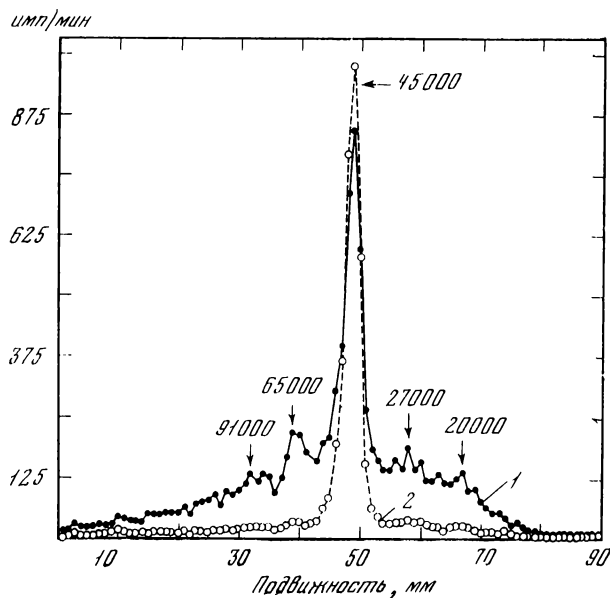


Рис. 62. Кристаллины эпителия и волокон линзы эмбриона цыпленка

Линзы из 6-дневных зародышей метили 4 часа *in vitro* ^3H - или ^{14}C -валином, разделяли на эпителий и волокна. ^3H -меченые белки эпителия (1) подвергли совместному электрофоруезу в SDS с ^{14}C -белками волокон (2). Над пиками приведено значение мол. весов. В состав линзового эпителия входит много белков различного размера, но преобладает (37%) FISC-кристаллин с мол. весом 45 000. В волокнах он составляет 80% всех белков (Piatigorsky et al., 1972)

сохраняются у взрослой курицы в волокнистой части линзы, составляя значительную часть ее белков (Zwaan, 1968; Clayton, 1970).

α -Кристаллины появляются в волокнах ранней линзы (80 час.), а затем и в эпителии. К 18 дню развития в их составе к двум субъединицам добавляется новая. Следы β -кристаллинов появляются на стадии плакоды и затем во всех клетках линзы. По мере развития число субъединиц этого типа увеличивается.

Электрофоретический анализ состава и синтеза линзовых белков, проведенный Пятигорским и сотрудниками (Piatigorsky et al., 1972), показывает, что в линзе 6-дневного эмбриона цыпленка преобладает белок с мол. весом 45 тыс. (рис. 62). Однако в линзовом эпителии его меньше, чем в волокнах линзы. За счет этого в эпителии имеется больше белков с другим молекулярным весом, в том числе с мол. весом 30 тыс. и 65 тыс., которые почти отсутствуют в волокнистой части линзы. Данные о синтезе белков подтверждают это распределение — в клетках линзовых волокон в этот период синтезируется 80% белка с мол. весом

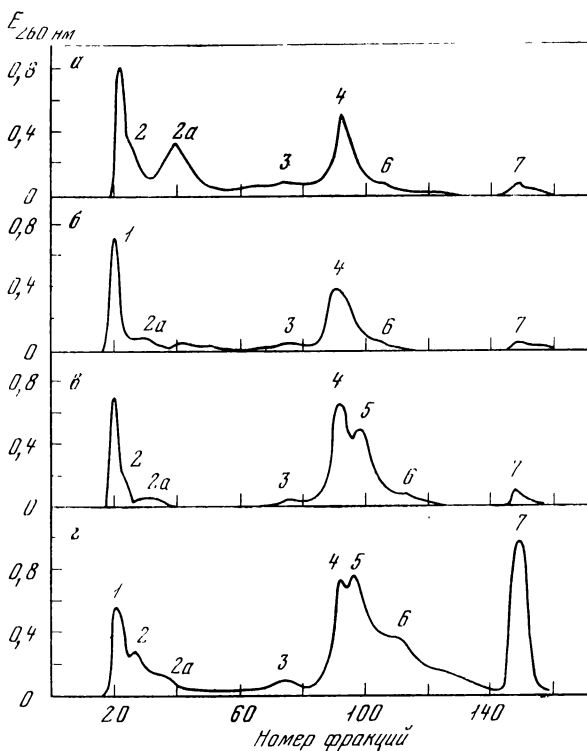


Рис. 63. Изменение состава субъединиц α -кристаллинов в развитии теленка α -Кристаллины выделяли из линз 4-(а) и 4,5-месячного зародыша (б), теленка (в) и из кортикальных волокон линзы взрослого быка (г) и разделяли на субъединицы хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе. Номера над пиками — обозначение субъединиц. С развитием фракция 2а уменьшается; появляется фракция 5 и увеличиваются фракции 6 и 7 (Palmer, Papaconstantinou, 1968)

45 тыс., который является δ -кристаллином (FISC). В эпителии его синтез составляет только 35% общего синтеза, но здесь синтезируется еще ряд белков в широком спектре — от 20 тыс. до 200 тыс. с пиками в области 20 тыс., 27 тыс., 65 тыс. и 91 тыс. При помещении кусочков линзового эпителия в культуральную среду, содержащую бычью сыворотку, ее клетки начинают быстро удлиняться, что напоминает процесс образования линзовых волокон. И действительно, спектр синтезируемых белков в ней в течение суток изменяется от характерного для линзового эпителия до характерного для линзовых волокон, хотя синтез FISC-кристаллинов (мол. вес. 45 тыс.) достигает 50%, а не 80%, как в волокнах нормальной линзы (Piatigorsky et al., 1972). Эта работа показывает, что в растущих и делящихся мало специализирован-

ных клетках линзового эпителия происходит синтез многих белков, хотя и тут уже значительную их часть составляет специфический линзовый белок. По мере продвижения клеток через экваториальную зону в область линзовых волокон изменяется их белковый состав — исчезают белки с мол. весом 30 тыс. и 65 тыс. и почти прекращается синтез всех белков, кроме FISC-кристаллина. Аналогичные процессы, хотя и в меньшей степени, происходят и при культивировании линзового эпителия в условиях, способствующих его терминальной дифференцировке. Синтез линзовых белков и удлинение клеток линзового эпителия некоторое время могут происходить и в присутствии актиномицина, т. е. без функции генов за счет регуляции синтеза белка на предварительно транскрибированных матрицах (Craig, Piatigorsky, 1973).

У амфибий порядок появления разных кристаллинов описан для нормального развития и для процесса регенерации линзы из радужины (Yamada, 1967). Характерные для амфибий γ -кристаллины появляются в клетках, образующих волокна, сохраняясь на более поздних стадиях развития. Кроме кристаллинов, клетки линзового эпителия синтезируют коллаген, образующий оболочку линзы.

У млекопитающих в линзе у 4-месячного зародыша, у теленка и у взрослого быка происходят закономерные изменения состава субъединиц α -кристаллинов. По мере развития вдвое уменьшается относительное содержание первой субъединицы (ранее элюируемой с ДЕАЕ-целлюлозы), почти вдвое возрастает содержание второй и в несколько раз увеличивается содержание третьего минорного компонента (Palmer, Parasconstantinou, 1968) (рис. 63). При инъекции в ооциты амфибий 14S РНК, полученной из полисомной фракции линзы быка, в них начинается синтез α -кристаллинов, который не требует, следовательно, специфического аппарата трансляции (Berns et al., 1972).

Кристаллины, по-видимому, не единственные белки, определяющие развитие линзы. Первое их появление обнаруживается на стадии линзовой плакиды, т. е. уже тогда, когда линза детерминирована и ее морфогенез осуществляется. Однако синтез кристаллинов — хорошая модель для изучения общих закономерностей синтеза, накопления и смены тканеспецифических белков.

Гемоглобины

Гемоглобин образуется в кроветворных клетках, проходящих в процессе своей дифференцировки целую цепь превращений, в которой морфологически различают 6—7 этапов (гемобласт — проэритробласт — базофильный эритробласт — полихроматофильный эритробласт — нормобласт — ретикулоцит — эритроцит).

Выше уже описано, что синтез мРНК и ее выход в цитоплазму прекращается на стадии полихроматофильных эритробластов,

в то время как синтез гемоглобина начинается и происходит с наибольшей интенсивностью в базофильных эритроблестах, снижается в четыре раза в полихромобильных эритроблестах, но продолжается (в 20 раз медленнее, чем в базофилах) еще и в ретикулоцитах. Эмбриональное кроветворение обычно происходит в иных органах, чем кроветворение у взрослого организма: у зародыша цыпленка это кровяные островки, расположенные во вне зародышевой части, у головастика это зачаток почки, у рыб это кровяные островки, расположенные над желточным мешком, но не вне зародыша. Наконец в эмбриональном развитии млекопитающих происходит сложная смена органов кроветворения — сначала эритроциты образуются в желточном мешке (у мыши на 9—13 сут.), затем в печени и, наконец, после 15—16 дня — в селезенке и костном мозге. Эмбриональный эритропоэз всегда происходит в клетках мезодермального происхождения, но для своей детерминации обычно нуждается в контакте с энтодермой (Wilt, 1967).

На более поздних стадиях у млекопитающих происходит замена эмбрионального гемоглобина (F), состоящего из двух α - и двух γ -цепей, на гемоглобин взрослого организма (A) с двумя α - и двумя β -цепями. Гемоглобин F отличается от гемоглобина A большим родством к кислороду, что позволяет в плаценте осуществляться переносу кислорода от крови матери к крови зародыша.

У амфибий во время метаморфоза происходит аналогичный переход от диффузии кислорода из воды в жабры к дыханию воздухом через легкие. В этот период у головастика осуществляется смена гемоглобинов, причем общая интенсивность их синтеза снижается. Образование эритроцитов в почках в это время прекращается и начинается дифференцировка «взрослых» эритроцитов, содержащих «взрослый» гемоглобин A.

У цыпленка биологический смысл замены гемоглобинов также связан с переходом от потребления кислорода сосудами желточного мешка, окруженного жидкой белковой оболочкой, к контактирующим с воздухом сосудам хориоаллантоиса, выстилающим снаружи скорлупу (7-й день инкубации), а от них к дыханию легкими (17—18-е дни инкубации).

Смена типов гемоглобина у зародышевой цыпленка происходит в период относительно раннего эмбрионального развития. Электрофоретический анализ позволяет выявить не менее двух типов гемоглобина в период эмбрионального развития и не менее трех — во взрослом состоянии. Каждый тип образован двумя α -цепями и двумя цепями других классов. Гемоглобин A обнаруживается уже у пятидневного зародыша. На 7-й день эмбриональный и взрослые типы присутствуют в равных количествах, а к 11 дню развития смена типов завершается (Wilt, 1967).

У человека на самых ранних стадиях эмбрионального развития образуется ϵ -гемоглобин, который рано заменяется γ -цепями, т. е. F-гемоглобином, образование которого продолжается некото-

рое время и после рождения ребенка. Синтез гемоглобина А начинается еще до рождения, но полная замена завершается у 6—8-месячного ребенка. Однако и у взрослых людей в норме сохраняется до 1% фетального гемоглобина.

Предполагается наличие двух механизмов смены типов гемоглобина — путем репрессии генов γ и включения генов β в тех же самых клетках и путем замены клеток, синтезирующих F-гемоглобин, клетками, в которых активны гены β и синтезируется только гемоглобин А.

В пользу существования первого механизма говорит обнаружение методами спектрофотометрии и цитохимии в отдельных эритроцитах обоих типов гемоглобина (Matioli et al., 1962). Однако фактически преобладает второй механизм, так как время активности генов глобина при образовании эритроцитов у человека существенно короче, чем период замены типов гемоглобина, и в крови плода преобладают эритроциты, содержащие гемоглобин F, а после рождения постепенно увеличивается доля эритроцитов, содержащих гемоглобин А.

Эмбриональный синтез гемоглобина в кровяных островках цыпленка подробно исследован в серии работ Уайнрайта, показавшего, что начальным регулирующим звеном в эритропоэзе является синтез одной из аланиновых тРНК, которая лимитирует трансляцию фермента — синтетазы δ -аминолевулиновой кислоты. Синтез этой кислоты и образование из нее гема, в свою очередь, лимитирует синтез глобинов (Wainwright et al., 1972a, b). Роль геминовой группы в регуляции синтеза глобинов недавно исследована вновь, и было показано, что не само по себе отсутствие гема блокирует трансляцию глобинов, а посредством появления специфического ингибитора трансляции. В состав этого ингибитора входит одна из протеинкиназ, способная фосфорилировать гистоны и активироваться цАМФ (Levin et al., 1975). Предполагают, что этот ингибитор действует на 40S-рибосомную субъединицу и препятствует инициации синтеза белка, подавляя ее связывание с мет-тРНК.

При инъекции глобиновых мРНК (9S) кролика в ооциты и яйца лягушки трансляция глобина может продолжаться до двух недель, одинаково в разных частях развивающегося зародыша (Lane et al., 1971; Gurdon, 1974). В отличие от данных лаборатории Хейвуда (Rourke, Heywood, 1972; Heywood et al., 1974) эти результаты показывают, что трансляция глобиновых мРНК не требует тканеспецифических факторов и может происходить на рибосомах другого вида и в различных (см. Lodish, Jacobson, 1972) клетках. Соотношение α - и β -полипептидов, транслируемых в ооците, сильно отклоняется от эквимолярного (1:5), но это отношение приближается к единице, если вместе с глобиновыми мРНК в ооцит инъектировать и гем (Gurdon, 1974).

Таким образом, в образовании гемоглобина как тканеспецифического белка участвует несколько неаллельных структурных ге-

нов, ответственных за синтез α -, β - и γ -цепей. Кроме того, в мышечных клетках образуется миоглобин, имеющий мономерное строение и по своему аминокислотному составу сильно отличающийся от всех гемоглобинов эритроцитов. Тем не менее все они явно имеют общее филогенетическое происхождение и образовались путем дупликации генов (см. Оно, 1973) и их дивергентной эволюции. Однако важно, что наряду с эволюцией самих структурных генов происходила и эволюция регуляторных генов, определяющих включение структурных генов в разных типах клеток и в разное время.

Тубулин

В некоторых клетках тубулины составляют десятки процентов белков растворимой фракции (Vamburg et al., 1973), хотя в ранних зародышах их намного меньше. Специфический метод выделения тубулинов основан на их способности связываться с колхицином и осаждаться вибластином. Тубулин формирует в клетках микротрубочки, образующие такие важные структуры, как нити веретена, реснички и жгутики, и, по-видимому, играет существенную роль в определении формы клеток. Это последнее свойство и позволяет рассматривать их как «белки морфогенеза», хотя данные об этой их функции только накапливаются.

Определенные трудности в понимании их функции связаны с их невысокой видовой и тканевой специфичностью, которая плохо согласуется с тем, что они участвуют в таких разных процессах, как расхождение хромосом, образование сложно организованных структур клетки, например ресничек, и определение формы клеток разного типа. Может быть, правильнее рассматривать их пока как малоспецифичные белки, образующие опорные структуры, взаимное и специфическое расположение которых определяется не ими самими.

Молекула тубулина состоит из двух нетождественных субъединиц с мол. весом 57 тыс. и 52 тыс. (Ruff, Kaumeyer, 1973). Сравнение этих субъединиц в тубулине такого разного происхождения, как нервные клетки и жгутики хламидомонады, показало, что одни из субъединиц являются в этих клетках одинаковыми, а другие различаются (Olmstead et al., 1971).

В эмбриональном развитии синтез тубулина начинается сразу после оплодотворения яйца морского ежа, и скорость синтеза циклически меняется, достигая максимума на метафазе и минимума на телофазе (Meeker, Iverson, 1971) (рис. 64). Авторы показали, что удельная активность тубулина на ранних стадиях выше активности остальных белков, и его синтез составляет существенную часть общего синтеза белка. Можно предполагать, что тубулин, синтезирующийся на определенных фазах первых делений дробления, используется для формирования митотического аппарата. Однако синтез тубулина происходит и на последующих

Рис. 64. Синтез тубулина на ранних стадиях развития морского ежа

Яйца *Lytechinus variegatus* в разное время после оплодотворения инкубировали 5 мин со смесью ^{14}C -аминокислот, осаждали тубулин вишблатином и определяли его количество по связыванию с ^3H -колхицином. Синтез тубулина начинается после оплодотворения и циклически меняется в ходе деления дробления (Meecker, Iverson, 1971)

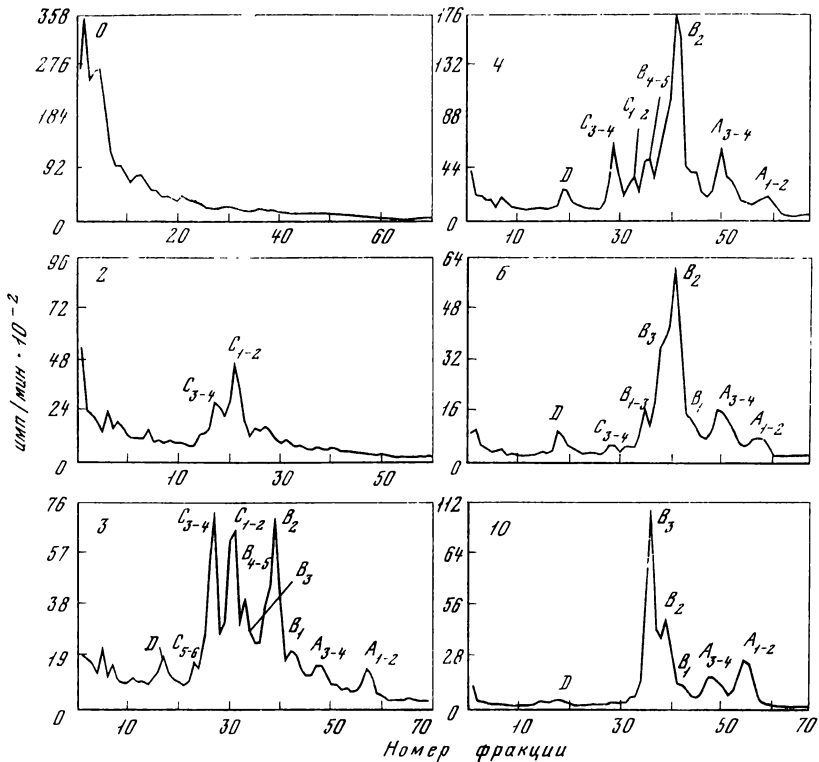
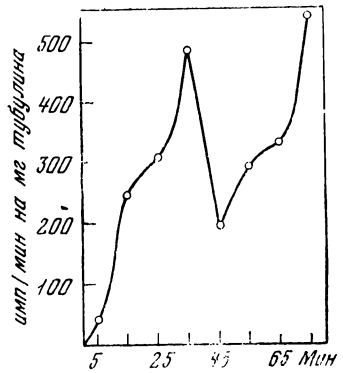


Рис. 65. Смена белков хориона яйца, синтезированных фолликулярными клетками в оогенезе павлиноглазки

Ооциты на разных стадиях образования хориона инкубировали 2 часа с ^3H -лейцином, хорион отделяли и его белки разделяли электрофоретически. В левом верхнем углу графика указан номер ооцита в яичнике, соответствующий стадии его развития; над пиками обозначены белки хориона. По мере оогенеза фолликулярные клетки последовательно синтезируют различные белки оболочки яйца (Paul et al., 1972)

стадиях развития морского ежа и от стадии 16 blastomeres до стадии гастрюлы увеличивается в четыре раза (Hynes et al., 1972a). Этот тубулин, вероятно, используется в процессах морфогенеза, в частности, в образовании ресничек.

В серии работ Рафа также было показано, что синтез тубулина в яйцах морского ежа начинается с самых ранних стадий и постепенно увеличивается вплоть до позднего плютеуса (Raff et al., 1971, 1972).

Белки хориона яйца

В заключение рассмотрим специфический синтез белков в фолликулярных клетках павлиноглазки (Silkmoth) — системе, найденной и исследованной группой Кофатоса (Paul et al., 1972). У самки этого мотылька одновременно имеются десятки ооцитов, находящихся на разных стадиях развития и лежащих в яйцнике в один ряд в строгой возрастной последовательности. Каждый ооцит окружен слоем фолликулярных клеток. В зависимости от возраста ооцита фолликулярные клетки выполняют различные функции, проходя вместе с ростом и созреванием ооцита последовательные ступени дифференцировки. Функция фолликулярных клеток молодых ооцитов состоит в трансфузии желтка и затем воды из лимфы в ооцит. На следующей стадии развития те же фолликулярные клетки образуют вещество вителлиновой мембраны, и, еще позже, они же синтезируют несколько белков наружной оболочки яйца — хориона. Число этих белков, как показывает электрофоретическое разделение, равно 6—8, и каждый из них синтезируется на определенном отрезке оогенеза (рис. 65). По мере дифференцировки фолликулярных клеток в них прекращается синтез всех остальных белков и один за другим начинают синтезироваться белки хориона, различающиеся по электрофоретической подвижности, молекулярному весу и аминокислотному составу. Фолликулярные клетки являются, таким образом, прекрасной моделью последовательного синтеза нескольких белков. Как показывают опыты с актиномицином, регуляция этих упорядоченных по времени синтезов происходит на транскрипционном уровне, т. е. состоит в последовательном включении разных генов. Аналогичные исследования начаты и на генетически более удобной модели — синтезе белков хориона дрозофилы (Petri et al., 1976).

Можно привести еще несколько примеров синтеза специфических неэнзимных белков дифференцировки: фиброина — в шелкоотделительной железе, казеина — в молочной, муцина — в слюнной и т. д. И каждый раз, как это показано на примере синтеза простого опорного белка — коллагена, мы видим, что в его образовании участвует несколько структурных генов, отвечающих за синтез соответствующих полипептидов, а также ряд генов, контролирующих синтез модифицирующих ферментов гидролаз, специфических протеаз и др. В такой, казалось бы, простой системе

дифференцировки, как образование линзы, где кристаллины выполняют механическую или скорее физическую функцию — создание плотного тела с определенными оптическими свойствами, — участвуют десятки белков и, соответственно, десятки генов. При этом остаются необнаруженными белки, присутствующие в минорных количествах и определяющие форму линзы, последовательность процессов ее образования, т. е. собственно белки морфогенеза.

Нет сомнений, что синтез каждого из полипептидов, участвующих в одной дифференцировке, определяется особой нуклеотидной последовательностью ДНК, причем эти гены часто расположены в разных хромосомах (например, гены гемоглобина). Тем не менее в дифференцирующихся клетках поддерживается строгое взаимное соответствие их синтеза, обеспечивающее количественное постоянство концентраций каждого из видов белка или закономерную и постепенную замену одного вида белка другим. Это проявляется в эквимоларности синтеза субъединиц, таких, например, как глобиновые α и β или большой и малой субъединиц миозина. Координация также обнаруживается в синтезе разных белков, образующих впоследствии общий функциональный комплекс — например, миозина, актина и тропомиозина. Очевидно, что на трансляционном уровне существуют механизмы регуляции, которые трудно представить без обратной связи, т. е. без тормозящего влияния избытка конечного продукта. Такой избыток может создаваться, если, например, α - и β -цепи глобина образуются не в равных количествах и после образования четвертичной структуры один из полипептидов остается в клетке неиспользованным. Аналогичным образом сократительные белки в свободном состоянии в клетке почти не существуют, а сразу же формируют миофибриллы. В этом случае даже небольшие различия в скорости синтеза белков приведут к резкому увеличению концентрации одного из них в клетке. Поэтому должен существовать механизм, обеспечивающий прекращение или замедление синтеза того белка, который накапливается в клетке в свободном состоянии.

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

В этом разделе рассматривается активность ферментов безотносительно к их роли в цепи биохимических превращений, а лишь как специфический показатель наличия определенного вида белковых молекул, позволяющий оценить их количество в зародыше в ходе развития.

Говоря о ферментах, можно независимо рассматривать три количественных показателя: 1) энзиматическую активность, определенную *in vitro*, в условиях, которые мы нашли оптимальными или, во всяком случае, стандартными; 2) количество ферментного белка в весовых или молярных единицах, которое удастся опре-

делить только в отдельных случаях; 3) действительную активность фермента в клетке, т. е. не максимально возможную, а реально проявленную. Все эти три величины связаны между собой, но связь эта не прямая, а коэффициенты пропорциональности зависят от многих условий и, как правило, неизвестны. Определенные действительной скорости реакций в клетке — чрезвычайно трудная задача, и ее корректное решение осуществляется в немногих случаях. Тем не менее значительное повышение активности фермента, определенное *in vitro*, позволяет ожидать, что возросла и скорость катализируемых им реакций в клетке. В некоторых случаях это очевидно. Так, повышение активности ацетилхолинэстеразы в развитии по времени совпадает с началом деятельности нервно-мышечных синапсов и, следовательно, отражает и действительную функцию энзима — гидролиз ацетилхолина, выделяемого при передаче нервного импульса. Повышение активности фермента вылупления, как правило, отражает начало выполнения им функции переваривания зародышевой оболочки. Однако все это справедливо лишь в первом приближении. В действительности фермент должен образоваться до того, как он начнет действовать, и, например, повышение у зародышей мыши на 12—16-й день беременности активности ферментов поджелудочной железы явно предшествует их действительной функции, которая начинает осуществляться только после рождения.

Если изменение активности фермента позволяет хотя бы косвенно судить о его функционировании, то отсутствие таких изменений еще ни о чем не говорит. Так, в ходе эмбрионального развития выюна интенсивность дыхания зародыша (действительная и прямо измеряемая величина) возрастает в 7—8 раз (Нейфах, 1960б). В то же время активность митохондриальных ферментов, которые этот процесс обеспечивают, почти или совсем не меняется (Абрамова, Нейфах, 1965; Абрамова, Васильева, 1973), т. е. действительная функция возрастает при постоянной активности, что было бы очень трудно установить, если бы не было способа прямо измерить интегральный процесс — дыхание в целом зародыше.

Значительные различия между максимальной активностью и действительной функцией объясняются тем, что в клетке ферменты обычно имеют определенную локализацию, так как связаны с внутриклеточными структурами. Этим обеспечивается пространственное разобщение (компартиментализация) внутриклеточных процессов и ограничивается контакт ферментов с субстратами. Концентрация субстратов в клетке обычно значительно ниже, чем в искусственно созданной оптимальной среде. Наконец, в клетке активность фермента регулируется различными метаболитами, состав и концентрация которых в искусственных средах, как правило, иные.

Все эти проблемы составляют важные аспекты биохимии, в том числе биохимии развития. Однако они мало связаны с во-

просом об изменении в ходе развития качественного и количественного состава ферментных белков. В этом смысле более существен вопрос о связи первого и второго параметров, т. е. в какой степени активность фермента, определенная в искусственно созданных оптимальных условиях, отражает содержание в клетках зародыша ферментного белка. Решение этого вопроса стало возможным благодаря иммунохимическому методу — определению количества ферментного белка путем его титрования специфической антисывороткой (Murison, 1969).

В принципе следует считать, что при прочих равных условиях активность фермента пропорциональна его содержанию. В целом ряде работ, часть которых приводится ниже, это соответствие не вызывает сомнений и не обсуждается. Однако именно вследствие того, что линейная пропорциональность обычно принимается без обсуждения, следует остановиться на некоторых, может быть, не слишком редких, исключениях.

При определении активности ферментов в процессе развития не всегда можно оценить значение различных факторов. Сравнивая разные стадии развития или даже разные части зародыша, нельзя быть уверенным, что ферментные молекулы имеют такую же локализацию или ту же концентрацию небелковых метаболитов, влияющую на активность. При этом мы не рассматриваем такие явные артефакты, которые вызваны, например, различиями в полноте гомогенизирования ранних зародышей, состоящих из немногих легко разрушаемых крупных клеток и поздней личинки, мелкие клетки которой могут остаться неразрушенными. Активность фермента, определенная *in vitro*, может в значительной степени зависеть от того, как он связан с внутриклеточными структурами и насколько доступен субстратам. Так, например, при широко распространенном методе определения активности цитохромоксидазы (Smith, 1955) спектрофотометрически измеряется окисление восстановленного цитохрома *c*. При сравнении этого показателя на разных стадиях развития вьюна можно обнаружить повышение скорости окисления, как будто бы свидетельствующее об увеличении в ходе развития активности и, следовательно, количества фермента (Нейфах и Донцова, 1962). Однако если митохондрии, в которых локализован фермент, предварительно разрушить дезоксихолатом, то скорость окисления значительно повысится, но останется постоянной на всех стадиях развития (Абрамова, Васильева, 1973). Очевидно, что в действительности в ходе развития количество ферментного белка не меняется. Повидимому, у митохондрий, выделенных из разных стадий, доступность к добавленному извне субстрату, восстановленному цитохрому, увеличивается и соответственно наблюдается кажущееся возрастание активности.

Аналогичным примером может служить изменение активности β -1,3-глюканазы (Е.С.3.2.1.39) в только что оплодотворенных яйцах морского ежа (рис. 66). Этот фермент отщепляет глю-

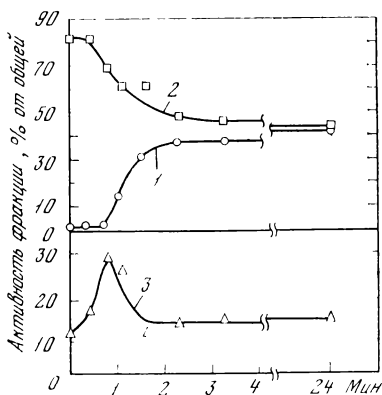


Рис. 66. Переход глюкоказы в растворимую форму и выход из яиц при оплодотворении у морского ежа

В разное время (через каждые 30 сек.) после оплодотворения яиц определяли активность β -1,3-глюкоказы в окружающей среде (морской воде) (1), осадке гомогената после 28000 g (2) и супернатанте (3). Уже в первые 1—2 мин половина фермента выходит из гранул сначала в растворимую фазу, а затем в окружающую среду (Erel et al., 1969a)

козу от гликопротеидов. Через 2 мин. после оплодотворения его активность в гомогенате увеличивается в 2,5 раза. При дифференциальном центрифугировании обнаружено, что активность этого фермента немного возрастает в крупных гранулах (3000 g, 7 мин.), не меняется в частицах, осажденных после центрифугирования при 28 000 g (15 мин.), но почти в 3,5 раза увеличивается в супернатанте (Erel et al., 1969a). В неоплодотворенном яйце этот энзим связан с кортикальными гранулами и после обычного гомогенизирования обнаруживается лишь частично. Однако после добавления в среду детергента — лаурилсульфата — гранулы разрушаются, и активность гомогенатов неоплодотворенных яиц возрастает более чем в 5 раз, а оплодотворенных — почти в 2,5 раза и таким образом оказывается одинаковой. Общее количество ферментного белка в процессе оплодотворения, следовательно, не меняется.

Включение ^3H -холина в фосфолипиды целых яиц морского ежа значительно ускоряется после оплодотворения. Это могло бы свидетельствовать об активации холинкиназы, однако дальнейшее исследование показало, что повышается не активность фермента, а проницаемость яйца к холину (Byrd, 1975).

Фермент в зародыше может находиться в активной и неактивной формах, и соотношение этих форм может меняться в ходе развития. Так, фосфорилаза в яйцах вьюна находится в активном состоянии лишь частично — значительная ее доля, локализованная преимущественно в желтке, неактивна в обычных условиях определения и может быть выявлена лишь в присутствии высоких концентраций сульфата аммония, но может также частично активироваться АТФ и ионами магния (Мильман, Юровицкий, 1973).

В заключение, можно привести еще один пример, когда механизм изменений активности фермента не установлен, но очевидно, что он не связан с распадом и синтезом ферментного белка, т. е.

с изменением его количества. У зародышей морского ежа активность аспаратаминотрансферазы периодически меняется в начале развития, и характер этих изменений не соответствует ритму делений дробления. Пуромицин в концентрациях, полностью подавляющих синтез белка и блокирующих деление дробления, не влияет на эти изменения активности, и они происходят синхронно с изменениями в нормально развивающихся яйцах той же партии (Ботвинник, Нейфах, 1969).

Амплитуда этих изменений несколько уменьшается при добавлении избытка кофермента — пиридоксальфосфата или, напротив, при отмывании белков от низкомолекулярных компонентов путем гель-фильтрации. Можно предполагать, что активность аспаратаминотрансферазы определяется каким-то прочно связанным с ней компонентом, но механизм и биологический смысл этого явления остаются неясными. Очевидно только, что его нельзя объяснить синтезом и распадом ферментного белка, так как в присутствии пурамицина синтез был бы невозможен (Абрамова и Нейфах, 1971).

Приведенные примеры показывают разнообразие реальных ситуаций, с которыми может встретиться энзимолог, работающий с эмбриологическими объектами.

Активность ферментов можно выражать в расчете на зародыш или на миллиграмм белка, азота, сухого веса. Как и при расчете синтеза РНК (см. рис. 14), оба способа имеют свой смысл. Так, для иглокожих, амфибий, рыб расчет активности на целого зародыша или на миллиграмм белка почти равнозначен, так как количество белка в ходе развития почти не изменяется. Однако у многих рыб зародыш может быть отделен от желтка, и тогда количество белка в нем медленно увеличивается в ходе развития.

Если объектом исследования является эмбриональное развитие птиц или млекопитающих, то расчет на зародыш в значительной степени теряет смысл — эмбрион быстро растет, и в нем увеличивается количество всех белков. В этом случае рационально определять только удельную активность фермента (на 1 мг белка) и таким путем установить, происходит ли синтез данного белка быстрее или медленнее синтеза остальных белков.

Расчет на клетку (или на ДНК) оправдан только в отдельных случаях, так как если размер клеток в ходе развития изменяется, то меняется и объем цитоплазмы, в которой локализован фермент. Однако если речь идет только о вновь появившихся молекулах, то имеет смысл выражать изменения активности фермента в расчете на клетку, ядро или количество ДНК, так как эта величина позволит судить об активности соответствующих генов. Этот редко применяемый тип расчета используется, например, в работах Раттера (Rutter et al., 1968) на зачатках поджелудочной железы.

Активность ферментов во время оплодотворения

Изменения ферментной активности во время оплодотворения исследованы в основном на яйцах морского ежа не только потому, что этот объект наиболее удобен. Эти исследования были связаны с попытками найти механизмы активации белкового синтеза, которые происходят у морских ежей после оплодотворения. Наиболее полны в этом отношении работы группы Эпеля (Epel, 1967; Epel et al., 1969) (схема 4). При относительно низкой для морского ежа температуре развития -17° первые события обнаруживаются уже через 45 ссек. Они состоят в изменении мембранного потенциала, разрушении кортикальных гранул и повышении протеазной активности. Еще через 3 ссек. (48 ссек. после оплодотворения) возрастает активность НАД-киназы (Epel, 1964a). Сразу вслед за ней активизируется глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и начинается резкий подъем скорости дыхания, которая за 15—25 ссек. возрастает приблизительно в пять раз (Epel, 1964b). Характерно, что концентрация известных метаболитов дыхания — аденозинфосфатов (АМФ, АДФ, АТФ) при этом не меняется. Через 2 мин. или раньше обнаруживается значительное повышение активности β -1,3-глюканазы, о котором уже говорилось выше. Этот фермент выходит из кортикальных гранул в перевителлиновое пространство, где, очевидно, отщепляет глюкозу от гликопротеидов оболочки оплодотворения, способствуя ее упрочнению (Epel et al., 1969a). Аналогичную роль, по-видимому, играет и частичное выделение в перевителлиновое пространство протеаз (Vacquier et al., 1973).

Только через 7—10 мин. после оплодотворения начинает увеличиваться проницаемость к аминокислотам (Epel, 1972) и резко возрастать скорость синтеза белка (Epel, 1967; Epel et al., 1969b). Изменение проницаемости к определенным аминокислотам также, вероятно, связано с активностью соответствующих мембранных трансфераз и АТФаз.

Увеличение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, а также 6-фосфоглюконатдегидрогеназы в яйцах морского ежа еще до Эпеля описал Бекстрём (Backström, 1959, 1963), который нашел, что рост активности продолжается с некоторыми колебаниями вплоть до выхода подвижной бластулы из оболочек.

Таким образом, увеличение активности целого ряда ферментов начинается или даже завершается еще до того, как происходит стимуляция синтеза белка. Все это позволяет достаточно надежно утверждать, что при оплодотворении происходит не синтез, а активация предсуществующих ферментных молекул. Активность тимидинкиназы, если судить по фосфорилированию ^3H -тимидина в целых яйцах морского ежа, резко возрастает после оплодотворения. Однако в гомогенатах оплодотворенных и неоплодотворенных яиц активность фермента оказывается одинаковой.

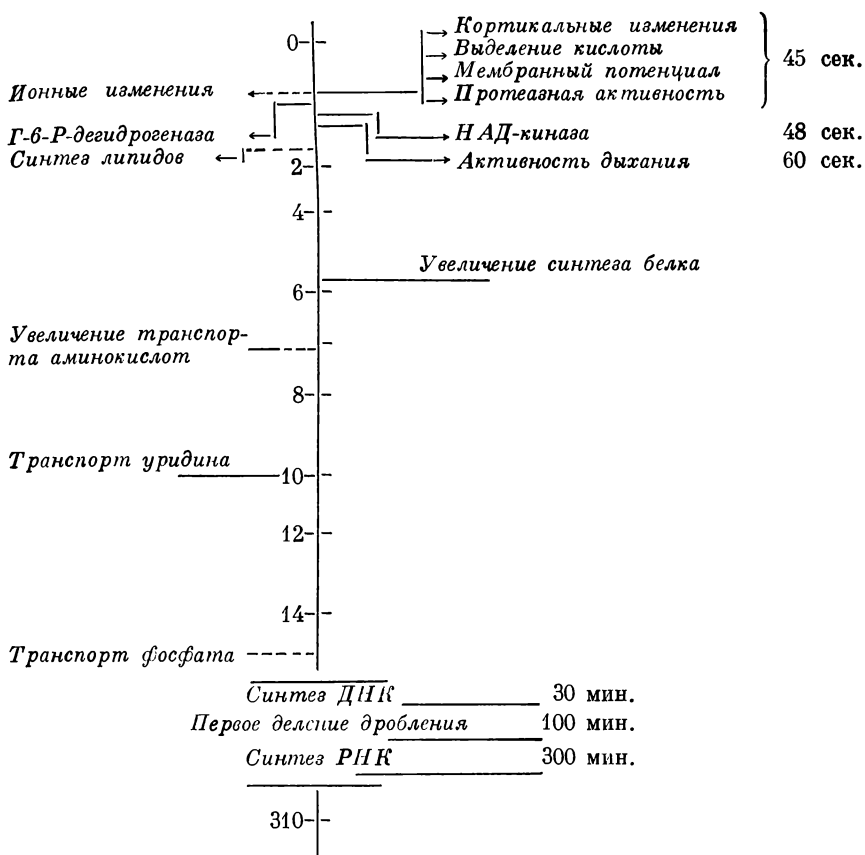


Схема 4. Первые события, происходящие в яйце морского ежа после оплодотворения (сверху вниз — время в мин) (Eipel et al., 1969b)

Авторы заключают, что при гомогенизации происходит такая же активация, как и при оплодотворении (Nonaka, Terauama, 1975). Аналогичные факты показаны также для гликогенфосфорилазы (Bergani et al., 1968) и некоторых гидролаз (Grossmann et al., 1973a, b).

Такой механизм не установлен для других ферментов — протеаз и дегидрогеназ. Активность протеаз продолжает периодически изменяться в течение делений дробления, а активность дегидрогеназ увеличивается не однократно, а периодически в течение длительного времени. Поэтому механизм их активации может быть принципиально иным. В начальный период он может быть связан лишь с активацией или изменением локализации уже существующих молекул белка. Возможно, что этот механизм действует лишь в первые минуты после оплодотворения, и дальней-

ший многочасовой рост активности глюкозо-6-фосфат- или 6-фосфоглюконатдегидрогеназ определяется их действительным синтезом. Колебания активности протеаз совпадают с периодом делений дробления, и, по мнению Мано (Mano, 1970, 1971b), это как-то связано с механизмом периодических колебаний синтеза белка, преимущественным распадом вновь синтезированных белков и т. д.

Итак, появление активности ряда ферментов в первые секунды и минуты оплодотворения в яйцах морского ежа не связано с новообразованием специфических ферментных белков, а определяется их активацией. Тем не менее среди белков, синтезируемых на самых ранних стадиях, вероятно, есть и ферментные белки. Однако до сих пор таких данных не получено, и среди первых синтезируемых белков идентифицированы только структурные — гистоны и тубулин.

Активность ферментов в раннем развитии морского ежа

В ранних исследованиях на яйцах морского ежа были обнаружены две группы ферментов: активность которых практически не меняется и активность которых начинает повышаться со стадии гастрюлы (см. Gustafson, 1954).

В первую группу попали ферменты цитозоля — альдолаза, фенилсульфатаза, каталаза и другие. Во вторую — в основном митохондриальные ферменты: сукцинат- и малатдегидрогеназы, глутаминазы и др.

В цитозоле яиц морского ежа находятся также изозимы аспартат- и аланинаминотрансферазы, активность которых значительно колеблется, но не обнаруживает тенденции к росту или падению (Абрамова, Нейфах, 1971). Выше уже отмечалось, что эти колебания активности не связаны с синтезом фермента.

Иначе ведут себя глюкозо-6-фосфат- и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы, активность которых начинает расти после оплодотворения, продолжает увеличиваться до начала гастрюляции, а затем постепенно, но значительно снижается (Backstrom, 1959, 1963). Нам неизвестны сейчас ни значение, ни механизм этих изменений, т. е. объясняются ли они деградацией и синтезом фермента или инактивацией и реактивацией тех же молекул белка.

В ходе развития морского ежа обнаружено закономерное снижение активности одного из ферментов пучлеипового обмена — дезоксицитидилатаминогидролазы. От момента оплодотворения до плютеуса эта активность уменьшается в четыре раза (Scarano, Maggio, 1959). Снижение активности этого фермента является генетически контролируемым процессом, так как оно может быть остановлено актиномицином (Scarano et al., 1964a, 1968).

У зародышей морского ежа значительно колеблется активность орнитин- и S-аденозил-l-метионин-декарбоксылазы, которые

ответственны за синтез полиаминов — путресцина, спермидина и спермина (Manen, Russell, 1973). Активность этих ферментов меняется синхронно с циклом первых делений дробления (максимумы активности орнитиндекарбоксилазы приходятся, например, на S-фазу первого и второго делений). Соответственно меняется в течение первых часов развития и концентрация путресцина и спермидина — продуктов реакций, катализируемых ферментами этой цепи. Интерес к этим ферментным системам объясняется тем, что хотя точная метаболическая функция данных полиаминов неясна, они скорее всего играют важную роль в синтезе РНК и белка и их концентрация, как правило, коррелирует со скоростью синтеза этих макромолекул. Резкий характер колебаний активности этих энзимов может объясняться крайней их неустойчивостью — период полураспада орнитиндекарбоксилазы в печени крысы не превышает 10—20 мин. (Russell, Snyder, 1969).

Для понимания механизмов регуляции синтеза ДНК и РНК важны данные об активности соответствующих полимераз. В развитии зародышей морского ежа тотальная активность ДНК-полимеразы возрастает медленно, однако ее внутриклеточная локализация за это время меняется очень значительно, и к стадии вылушления она из цитоплазмы почти целиком перемещается в ядра (Loeb et al., 1969; Fansler, Loeb, 1969; Loeb, Fansler, 1970). Очевидно, способность ядер связывать ДНК-полимеразу имеет некоторый предел, определяемый скоростью синтеза ДНК или просто количеством хроматина. ДНК-полимераза, запасенная в оогенезе и частично синтезированная в ходе развития, хранится в цитоплазме и переходит в ядерную фракцию по мере того, как количество ядер в зародыше возрастает настолько, чтобы связать весь фермент.

Функция дезоксирибонуклеазы не очень ясна, но можно думать, что этот фермент входит в систему репарации ДНК. В яйцах морского ежа ДНКазы локализованы преимущественно в ядрах и в митохондриях, где ее удельная активность в четыре-пять раз выше, чем в целом зародыше (De Petrocellis, Parisi, 1973a). Активность ДНКазы в ходе развития меняется параллельно скорости синтеза ДНК — постоянна до стадии бластулы и снижается в начале гаструляции (De Petrocellis, Parisi, 1972), что может указывать на связь этого фермента с синтезом ДНК. Изменение активности ДНКазы мало зависит от функции ядер, так как малочувствительно к актиномицину (De Petrocellis, Parisi, 1973a, b).

Аналогично с локализацией ДНК-полимеразы меняется и локализация РНК-полимеразы (см. Roeder, Rutter, 1970b). В расчете на клетку активность РНК-полимеразы в ходе развития снижается: на стадии бластулы (400 клеток) она не более чем в 1,5—2 раза выше, чем в неоплодотворенном яйце. В то же время в яйце она почти целиком локализована в цитоплазме, а на стадии бластулы переходит в ядра (Maroun, 1973). Этот переход мо-

жет быть связан как с активацией синтеза РНК, так и с тем, что в неоплодотворенном яйце запасенный в оогенезе фермент лишь частично может быть связан единственным гаплоидным ядром.

О тканеспецифических ферментах у зародышей морского ежа известно немного. На стадии раннего плютеуса, когда у личинки дифференцируется кишка, в зародыше появляются полностью отсутствующие до того энзимы, расщепляющие полисахариды: β -1,3-глюкопегидролаза или — глюканаза, гидролизующая, отщепляющая глюкозу от полисахарида водорослей — ламинария, β -амилаза и мальтаза (Vacquier, 1971; Vacquier et al., 1971). Сравнение их с аналогичными энзимами взрослых животных показывает, что в кишке плютеуса появляются личиночные изозимы, отличающиеся от взрослых по целому ряду характеристик.

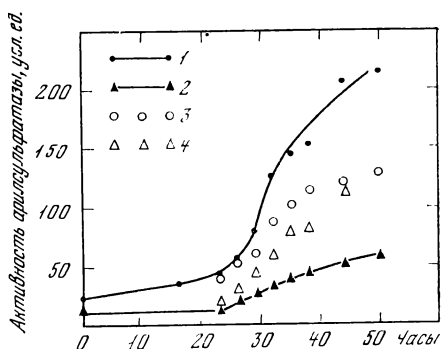
О транскрипционном контроле над синтезом ферментов у яиц морского ежа судили по чувствительности к актиномицину или в немногих опытах на межвидовых гибридах по появлению отцовского фермента. На примере только что упомянутой β -1,3-глюкопегидролазы было показано, что актиномицин ограничивает повышение активности этого фермента, но с довольно большим латентным периодом. Так, инактивация ядер в момент начала повышения активности (19 час. развития) останавливает увеличение активности глюконазы на уровне 28—30 час., а такая же инактивация на стадии 28 час. не препятствует росту активности до уровня 35 час. (Vacquier, 1971). Это означает, что биохимическая дифференцировка кишки плютеуса определяется активностью генов самого зародыша, но уже транскрибированные матрицы РНК способны обеспечить последующий синтез ферментного белка в течение 7—10 час.

Активность арилсульфатазы у зародышей *Strongylocentrotus purpuratus* начинает повышаться со стадии мезенхимной бластулы и до стадии плютеуса возрастает в 30 раз (рис. 67). У другого вида морских ежей — *Alloccentrotus fragilis* — этот подъем начинается позже, и активность увеличивается всего в 10 раз. Гибриды между этими видами обнаруживают кривые изменения активности арилсульфатазы, отличающиеся от таковых зародышей родительских видов. Определенные отличия друг от друга имеются и у реципрокных комбинаций. Расчет показывает, что к ферменту, находящемуся в яйце, добавляется фермент, синтезированный под контролем генов обоих родителей. Количество вновь синтезированного фермента в гибридах согласуется с предположением о независимом функционировании обоих аллельных генов (Fedeska-Bruner et al., 1971).

Новый прием исследований фосфатаз в яйцах у зародышей морского ежа был использован Вестиним. Он выявлял различные фосфатазы гистохимически в геле после двумерного иммунофореза (Westin, 1975). Это позволяло ему отождествлять активность ферментов с их антигенной природой. Оказалось, напри-

Рис. 67. Активность арилсульфатазы у двух видов морских ежей и их гибридов

Активность арилсульфатазы измеряли на разных стадиях зародышей *Strongylocentrotus purpuratus* (1), *Alloccentrotus fragilis* (2) и их гибридов: *S.p.* (♀) × *A.f.* (♂) (3) и *A.f.* (♀) × *S.p.* (♂) (4). Влияние отцовских геномов начинает сказываться на 22 час. развития, а различия реципрокных гибридов (материнский эффект) исчерпываются к 45 час. (Fedesca-Bruner et al., 1971)



мер, что пуклеозидфосфатазы, локализованные в гранулярной фракции и в цитозоле, не являются двумя изозимами, так как в обеих фракциях представлены одним антигеном. В то же время кислые фосфатазы в яйце представлены 10 антигенами, число которых в ходе развития уменьшается до 5. Вестин нашел также, что в неоплодотворенном яйце содержатся антигены щелочной фосфатазы, хотя активность этого фермента проявляется только на последующих стадиях (Westin, 1975). Активность щелочной фосфатазы при ее определении в гомогенате зародыша на стадиях от неоплодотворенного яйца до стадии плутеуса постепенно увеличивается в 10 раз. Однако при обработке гомогената бутанолом активность фермента возрастает в несколько раз и подъем активности становится не так велик. Это говорит о том, что часть увеличения активности в ходе развития обусловлена переходом фермента из связанного неактивного состояния в свободное (Pfohl, 1965). Вместе с тем рост активности этого фермента контролируется и генетически. Так, у гибридов между видами *Strongylocentrotus purpuratus* и *Dendraster excuticus*, которые сильно различаются по кинетике роста активности щелочной фосфатазы, на поздних стадиях наблюдается промежуточное положение уровня активности (Flickinger, 1957). Позже было показано, что в развитии зародыша последовательно появляются два изозима щелочной фосфатазы — ранний и поздний (Pfohl, 1971).

В сходной гибридной комбинации, но с другим энзимом результат оказался иным: l-малатдегидрогеназа у зародышей морского ежа на две трети сконцентрирована в митохондриях и на одну треть — в гиалоплазме. В ходе развития активность этого энзима равномерно повышается. У родительских видов *Strongylocentrotus* и *Dendraster* этот фермент отличается электрофоретически. Гибриды между этими видами доживают лишь до стадии гастрюлы. Активность малатдегидрогеназы у гибридов тем не менее возрастает, но целиком за счет фермента материнского типа, а гены отцовского генотипа никак себя не проявляют (Ozaki, Whiteley, 1970). Такой результат можно объяснить тем, что по-

повышение активности малатдегидрогеназы до стадии гастротрофы генетически непосредственно не контролируется и происходит, например, на матрицах РНК, синтезированных в оогенезе. Может, однако, оказаться и так, что в данной гибридной комбинации отцовская аллель малатдегидрогеназы остается неактивной.

Независимым от генетического аппарата зародыша является, по-видимому, и фермент вылупления, появляющийся на короткое время перед выклевом бластулы. У двух близких видов *Strongylocentrotus purpuratus* и *S. franciscanus* фермент вылупления различается по чувствительности к ионам марганца. Оказалось, что реципрокные гибриды между ними строго наследуют материнский тип фермента (Barrett, Angelo, 1969). Это означает, что синтез фермента вылупления происходит на материнских мРНК, запасенных в оогенезе.

Активность ферментов в ходе развития амфибий

У зародышей лягушки *Rana pipiens* Уоллесом (Wallace, 1961) исследовано изменение активности 12 ферментов. Активность большинства ферментов в расчете на зародыш остается постоянной до вылупления, а затем начинает увеличиваться. Это относится к альдолазе, лактатдегидрогеназе (ЛДГ) и малатдегидрогеназе, аспартат- и аденинамипотрансферазам, НАДН-редуктазе и пируваткиназе. Повышение их активности по времени совпадает с началом активного использования желтка и соответственного увеличения массы клеточных белков зародыша. В связи с тем, что у зародышей амфибий желток имеет внутриклеточную локализацию, данные Уоллеса можно интерпретировать различным образом. Так как активность фермента в расчете на зародыш возрастает, можно определенно говорить о синтезе ферментных белков. Однако в расчете на единицу массы собственно цитоплазмы роста ферментной активности может и не быть. Согласно более новым данным, активность ЛДГ у трех изученных видов амфибий остается постоянной только до стадии начала мышечных сокращений (стадия 26), а затем медленно возрастает (Faulhaber, Luga, 1975).

Активность НАД-цитохром с-редуктазы, в отличие от активности других ферментов, вплоть до стадии поздней личинки остается постоянной. Это показывает, что соотношение активностей ферментов энергетического обмена может меняться в ходе развития. Об этом же свидетельствует обнаруженное Уоллесом ранее (со стадии нейрулы) увеличение активности четырех дегидрогеназ: глюкозо-6-фосфат-, 6-фосфофлюконат-, β -глицерофосфат- и изоцитратдегидрогеназы.

Изменения тотальной активности фермента в гомогенате целых зародышей могут не отражать действительной картины синтезов, осложненной сменой изозимов, дифференцирующихся ор-

ганов. Так, например, в ходе развития лягушки ее изозимный состав ЛДГ существенно обогащается (Claycomb, Villee, 1971; Faulhale, Lyra, 1975). В неоплодотворенном яйце и в раннем зародыше обнаруживается только четыре электрофоретически разделяемых изозима. Во время дифференцировки мышц появляется пятый и затем шестой, с началом биения сердца — еще два изозима ЛДГ и, наконец, при переходе головастика к свободному питанию — девятый. Образование такого спектра изозимов должно контролироваться работой по крайней мере трех генов. Определение активности митохондриальных ферментов, локализованных в матриксе и мембране, показало, что в ходе эмбрионального и личиночного развития изменение активности происходит в основном в ферментах матрикса (например, глутаматдегидрогеназа), и это в меньшей степени выражено в ферментах мембраны (дегидрогеназы, глицерофосфата и оксималяной кислоты). Эти изменения происходят различно в печени личинки и в мышцах хвоста (Kistler, Weber, 1974) (рис. 68). Это означает, что в ходе развития происходят стадио- и тканеспецифичные изменения соотношения ферментных активностей в митохондриях, т. е. их дифференцировка.

Активность ферментов, синтезирующих полиамины, быстро меняется в раннем развитии амфибий, но иначе, чем в яйцах морского ежа (Russell, 1971). Орнитиндекарбоксилаза (4.1.1.17) катализирует превращение орнитина в путресцин. Ее активность быстро и равномерно возрастает от стадии двух бластомеров до стадии ранней бластулы в 10 раз и от стадии ранней бластулы до стадии головастика еще в 10 раз. Следующий энзим в этой метаболической цепи — S-аденозил-1-метиониндекарбоксилаза — метилирует путресцин S-аденозилметионином, образуя спермидин. Активность этого фермента низка и не увеличивается до стадии гастролы, но затем возрастает в 40 раз. Концентрация продуктов этих реакций — путресцина и спермидина — также увеличивается в ходе развития амфибий, хотя и не так резко, как активность ферментов. Об их функции косвенно свидетельствует сравнение активности ферментов и продуктов у безъядрышковых мутантов (Russell, 1971). В отличие от дегидрогеназ активность S-аденозил-1-метиониндекарбоксилазы у безъядрышковых мутантов на стадии 24 отсутствует (до этой стадии летальных безъядрышковых мутантов нельзя отличить от гетерозиготных фенотипически нормальных зародышей). Активность орнитиндекарбоксилазы у мутантов также сильно подавлена, и концентрация путресцина и спермидина намного ниже контроля. Автор предполагает, что эти полиамины связаны с синтезом рибосомальной РНК. Об этом свидетельствует и то, что вновь синтезированный ^3H -путресцин сначала концентрируется в ядрышке, а потом, как и РНК, перемещается в цитоплазму. Очень резко, в 1000 и более раз, возрастает активность ксантиндегидрогеназы и уриказы на стадии 18—20, что, очевидно, совпадает

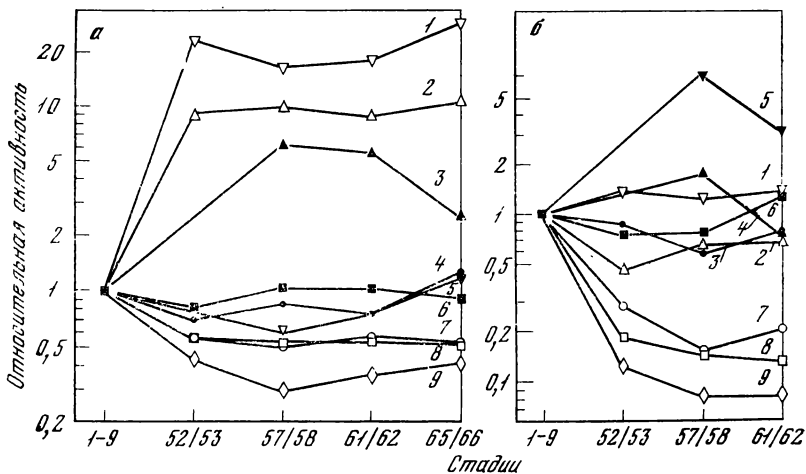


Рис. 68. Изменение активности митохондриальных ферментов в личиночном развитии ксилопса

Активность митохондриальных ферментов определяли в печени (а) и мышцах хвоста (б) и выражали как отношение к активности в митохондриях раннего зародыша. 1 — глутаматдегидрогеназа; 2 — глицерофосфатдегидрогеназа; 3 — дегидрогеназа оксималяной кислоты; 4 — цитохром *aa*₃; 5 — глюкозофосфатдегидрогеназа; 6 — сукцинатдегидрогеназа; 7 — малатдегидрогеназа; 8 — аспаратаминотрансфераза; 9 — 3-оксиацил-КоА-дегидрогеназа. Черные значки — ферменты мембран, белые — ферменты матрикса (Kistler, Weber, 1974)

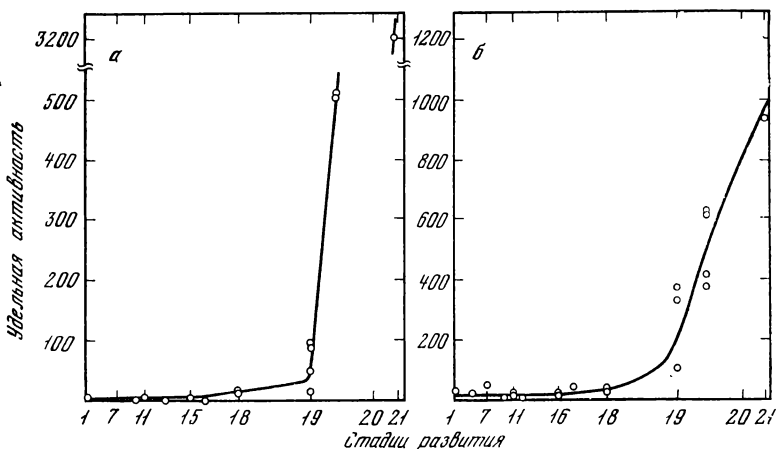


Рис. 69. Повышение активности ксантиндегидрогеназы (а) и уриказы (б) в развитии лигушки

Резкое повышение активности ферментов совпадает по времени с началом биения сердца (Barrett, 1964)

с дифференцировкой печени и почек (Barrett, 1964) (рис. 69). Активность РНК-полимеразы начинает увеличиваться уже со стадии дробления, возрастая от яйца до стадии морулы в два раза, а всего до стадии выклева в три-четыре раза (Lievens, Brachet, 1970). Активность РНК-полимеразы увеличивается монотонно и никак не коррелирует с изменением скорости синтеза РНК. На стадиях бластулы — гастролы, когда синтез РНК увеличивается в десятки раз, активность РНК-полимеразы возрастает в лучшем случае на 25%. С другой стороны активность этого фермента, может быть, правильнее рассчитывать не на зародыш, а на ядра, в которых он функционирует. Простой расчет показывает, что активность РНК-полимеразы, приходящаяся на каждое ядро, по мере увеличения числа ядер непрерывно уменьшается. Это спадение особенно сильно на ранних стадиях (до стадии бластулы приблизительно в 500—1000 раз), но продолжается и позже. За то время пока число клеток увеличивается в 100—200 раз (от стадии бластулы до выклева), активность фермента возрастает в зародыше не более чем в 2 раза, т. е. в расчете на ядро уменьшается в 50—100 раз.

Очевидно, как и ДНК-полимераза у зародышей морского ежа, по мере увеличения числа клеток РНК-полимераза во все большем количестве переходит из цитоплазмы в ядра, и возможно, что в действительности количество фермента в ядрах поддерживается на постоянном уровне или же меняется в зависимости от скорости транскрипции. Амфибии и рыбы более удобны для исследования этого вопроса, так как у них синтез РНК резко активируется на сравнительно поздней стадии.

В некоторых случаях синтез фермента явно предшествует той стадии, на которой могут осуществляться его функции. Выше уже упоминалось, что синтез коллагена начинается только со стадии гастролы, в то время как фермент, необходимый для модификации протоколлагена, — пролингидроксилаза — запасен заранее уже в яйце (Green et al., 1968).

Активность тирозиназы обнаруживается у зародышей *R. pipiens* незадолго до выклева. Однако методом радиоиммунопреципитации неактивный зимоген тирозиназы можно обнаружить уже со стадии ранней гастролы. При слабой обработке гомогената трипсином в этом белке активируется тирозиназная активность (Benson, Triplett, 1974) (рис. 70). Очевидно, и в этом случае фермент накапливается заранее в неактивной форме.

Значительные изменения ферментативных активностей индуцируются тиреоидным гормоном у головастиков при их метаморфозе. Эти органоспецифические изменения наиболее полно изучены в печени и в мышцах хвоста (Cohen, 1970; Tata, 1970b, 1971). Их подробное рассмотрение выходит за рамки этой книги.

*Активность ферментов
в развитии рыб и других животных*

В ооцитах и ранних зародышах вьюна более подробно и, главное, комплексно были исследованы ферменты гликолиза и пентозофосфатного пути окисления углеводов (Мильман и Юровицкий, 1973). Активность большинства из них (фосфорилазы, фосфоглюкомутазы, глюкозофосфатизомеразы, фосфофруктокиназы, альдолазы, триозофосфатдегидрогеназы и изомеразы, фосфоглицераткиназы, энолазы, пируваткиназы, лактатдегидрогеназы, 6-фосфоглюконатдегидрогеназы, фосфорибозоизомеразы, транскетолазы и трансальдолазы) за первые 20 час. развития (21°), т. е. до конца обрастания желтка и образования осевых органов, совершенно не изменяется. Существенно, что на этих же стадиях происходит увеличение скорости анаэробного гликолиза и дыхания приблизительно в три раза (аэробный гликолиз у зародышей практически отсутствует).

Активность ни одного из ферментов, связанных с усвоением гликогена, не возрастает на этих стадиях (до 20 час.). Зато активность других заметно снижается. Это относится к гликогенсинтетазе (снижение за 20 час. в 2,3 раза), фосфоенолпируваткарбоксихиназе (снижение почти в 2 раза), фруктозодифосфатазе (снижение почти на 40%) и глюкозо-6-фосфодегидрогеназе (снижение на 35%). Активность цитохромоксидазы, если ее определять по Смигу на целых митохондриях, возрастает в ходе развития (Нейфах, Донцова, 1962). Но, как уже отмечалось, на митохондриях, разрушенных дезоксихолом, этого увеличения нет (Абрамова, Васильева, 1973). Очевидно, оно связано с повышением в ходе развития проницаемости митохондрий к субстрату — восстановленному цитохрому *c*. Активность протеаз в ходе развития рыб увеличивается, но происходит это в основном в желтке, где синтез белка отсутствует (Нейфах, Давидов, 1964; Коновалов, Местечкина, 1975).

Изменение активностей ферментов гликолиза, дыхания и количества митохондрий было исследовано также в процессе оогенеза вьюна. Это стало возможно после того, как Н. Д. Озернюком был предложен метод разделения ооцитов по размерам путем постепенной диссоциации клеток яичника трипсином (Озернюк, 1972). Таким путем удается получить несколько групп ооцитов, различающихся по средним размерам.

На исследованных стадиях сравнивали ооциты со средним диаметром 200, 400 и 800 мкм, т. е. их объем относился, как 1:8:64, а содержание белка в ооците было 1, 4 и 180 мг соответственно. (Различия между отношениями объемов и количеством белка объясняются, вероятно, разной концентрацией липидов и других компонентов.)

Для сравнения скорости увеличения активности ферментов гликолиза в ходе оогенеза активность у малых ооцитов

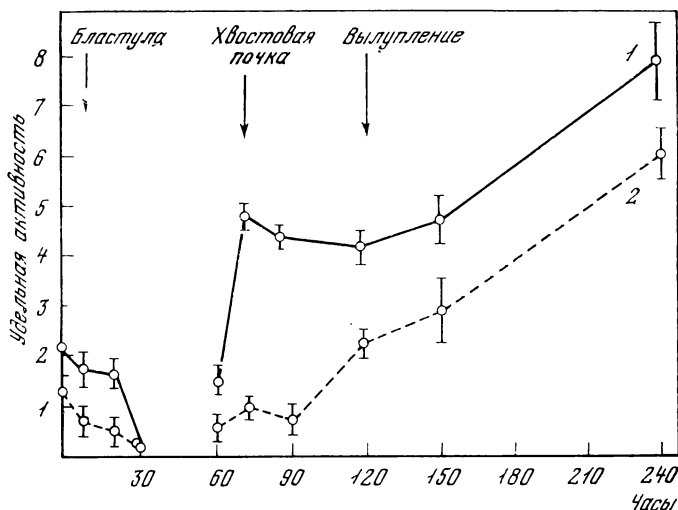


Рис. 70. Активность тирозиназы в развитии лягушки

Активность тирозиназы (ДОФА-оксидазы) определяли на разных стадиях развития после предварительной обработки гомогената зародышей трипсином (1) и без обработки (2). Неактивная форма фермента, активируемая частичным протеолизом трипсином, синтезируется и накапливается до начала функции тирозиназы (Benson, Triplett, 1974)

(200 мкм) принимали за единицу. Тогда активность у средних (400 мкм) и больших (800 мкм) ооцитов возрастала следующим образом. Активность триозофосфатдегидрогеназы, изомеразы и альдолазы возрастала в средних ооцитах в 4—6 и в больших ооцитах в 70—100 раз, т. е. почти пропорционально содержанию белка и объему ооцитов. Активность фосфоглицераткиназы на этих же стадиях оогенеза увеличивалась в 4 и в 44 раза, т. е. уже несколько медленнее, чем рос ооцит. Активность же остальных ферментов (енолазы, фруктозодифосфатазы, фосфоенолпируваткарбоксикиназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы, транскетолазы и трансальдолазы) увеличилась соответственно в 3—6 и 9—35 раз, т. е. намного медленнее, чем рос объем ооцита (Мильман, Юровицкий, 1973). Таким образом, в ходе оогенеза происходит не только рост количества ферментов, но и значительно изменяется соотношение их активностей. Отношения, свойственные ранним ооцитам, заменялись отношениями, характерными для яйца и зародыша. Так, например, отношение активностей альдолазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы друг к другу возросло за время роста ооцита в 12 раз.

Значительная часть ферментов, связанных с гликолизом, локализована в желточной части яйца. Для большинства ферментов гликолиза и гексозомонофосфатного шунта характерно рас-

пределение между бластодермой и желтком как 2:1, а концентрация ферментов в клетках приблизительно в 20 раз выше, чем в желточной части яйца. Однако большая часть активности фосфорилазы и фруктозоdifосфатазы концентрируется в желтке (90 и 70% соответственно), и их концентрации в клетках и желтке приблизительно равны. Кроме того, в желтке находится еще значительное количество латентной фосфорилазы.

В ходе эмбрионального развития рыб происходит значительное усложнение набора эстераз (Holmes, Whitt, 1970; Иваненков, 1976; Ботвинник, Нейфах, 1977). Новые виды эстераз появляются на стадии гастрюлы, в начале органогенеза, во время вылупления личинок.

У ранних зародышей вьюна также были исследованы активность и локализация РНК-полимеразы. Как показано в работах Кафиани и сотрудников (Kafiani et al., 1973; Экизашвили и др., 1974), активность РНК-полимеразы II (активируемой Mn^{2+} и подавляемой α -аманитином) в целом зародыше в ходе развития возрастает незначительно, в том числе и на стадиях, когда происходит активация синтеза РНК (8 час. развития при 21,5°). В то же время РНК-полимераза II, первоначально локализованная в цитоплазме, в ходе раннего развития постепенно концентрируется в ядрах. Этот переход происходит и на последующих стадиях.

На тех же ранних стадиях в ядра переходит из цитоплазмы также РНК-полимераза I (активация Mg^{2+}), хотя заметный синтез рРНК начинается позже. Предполагается, что миграция РНК-полимераз из цитоплазмы в ядра происходит не просто в результате увеличения числа ядер, а является одним из условий, обеспечивающих увеличение скорости транскрипции. Однако тот факт, что и РНК-полимераза I мигрирует в ядро, хотя и не участвует на ранних стадиях в транскрипции, показывает недостаточность этого условия и необходимость других регуляторных механизмов.

Большая карта изменений активности ферментов у зародыша рыбы — эрмизона — была недавно представлена в лаборатории Витта (Shaklee et al., 1974) (рис. 71).

Данные о ферментной активности у других видов животных немногочисленны и носят отрывочный характер. Несколько лучше других исследовано эмбриональное развитие асцидий (Durante, 1961). Эти данные сейчас приобретают особый интерес в связи с тем, что, по-видимому, все эмбриональное развитие асцидий проходит без синтеза РНК, и, следовательно, синтез всех белков на этих стадиях программирован в оогенезе и регулируется на уровне трансляции.

У другого объекта с мозаичным развитием — моллюска *Hydrobia ulina* — развитие и характер синтезируемых белков существенно изменяются, если на ранней стадии удалить полярную лопасть. Это находит свое отражение и в кинетике образования новых

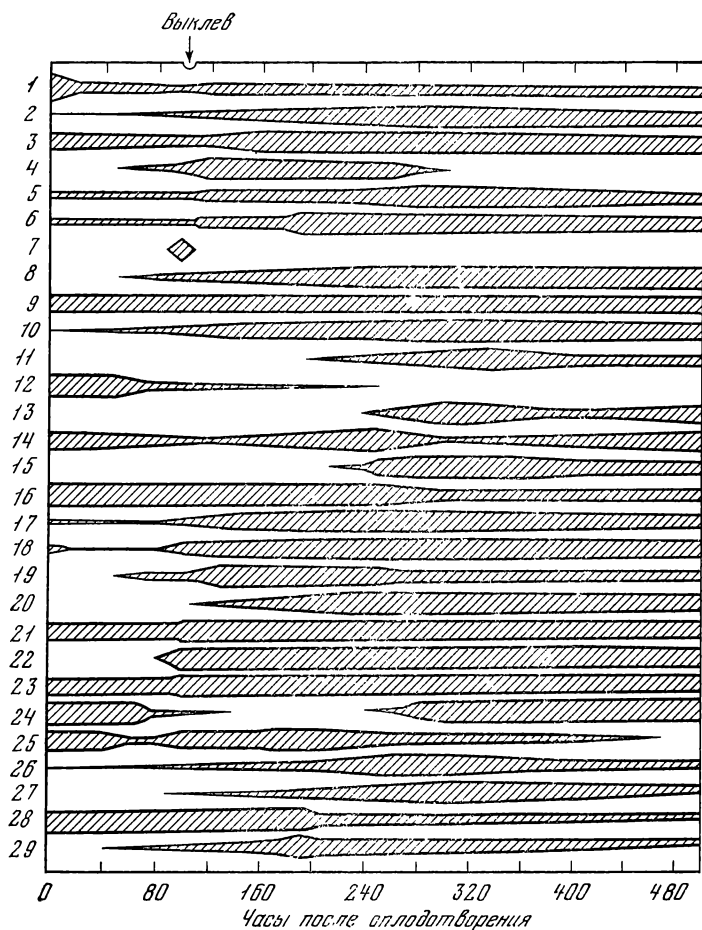


Рис. 71. Изменения активности ферментов в эмбриональном и личиночном развитии рыбы эрмизона

Изменения изоэнимного состава ряда фермента исследовали электрофоретически и оценивали количественно у зародышей и ранних личинок *Erimyzon sucetta*. Относительные изменения активности во время развития представлены в виде ширины полос. Ферменты и изоэнимы (сверху вниз): 1 — фосфоглюконатдегидрогеназа; 2, 3 — фосфоглюкомутазы 3 и 1; 4 — гексозодифосфатаза; 5, 6, 7 — малатдегидрогеназы 3,2 и 1; 8, 9 — аспаратаминотрансферазы 4 и 2; 10 — щелочная фосфатаза; 11 — глутаматдегидрогеназа; 12, 13, 14 — эстеразы 9,6-7,8; 15, 16, 17, 18, 19 — креатинкиназы 2б-3б, 2а-3а, 9, 1 и 6; 20 — маннозофосфат изомераза; 21, 22, 23 — глюкозофосфат изомеразы С, В и А; 24 — амплаза; 25 — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; 26 — изодитратизомераза; 27, 28, 29 — лактатдегидрогеназы С, В и А (Shaklee et al., 1974)

энзимов (Freeman, 1971). Электрофоретический план изозимов щелочной фосфатазы и эстераз существенно меняется в ходе развития этого моллюска. Так, щелочная фосфатаза в первые дни развития представлена одной фракцией, количество которой затем увеличивается и к ней последовательно добавляются две новых. У зародышей, лишенных полярной лопасти, новые фракции не появляются, а количество первой так и остается небольшим. Эстеразы в период раннего развития также представлены одной изозимной фракцией, к которой потом поочередно добавляются еще четыре и на поздних стадиях количество всех пяти фракций возрастает. Без полярной лопасти этот план нарушается — одна из новых фракций не появляется, количество второй остается неизменным. Таким образом, нарушение морфогенеза, вызванное удалением участка цитоплазмы, приводит к нарушению нормального порядка активации ферментов.

В период эмбрионального развития дрозофилы активность многих ферментов не изменяется (Wright, Shaw, 1970). Можно отметить две серии работ, в которых активность ферментов у зародышей дрозофилы сопоставлялась с генетическим анализом их регуляции. Так, активность ксантиндегидрогеназы резко возрастает в ходе раннего эмбриогенеза (3—6 час.) дикой линии дрозофилы. Это возрастание сильно подавлено у гетерозиготов по гену *rosy* ($ry^2/+$) и совсем отсутствует, если материнский организм был мутантен по гену *mal*. Ген *rosy* является структурным геном ксантиндегидрогеназы, и его проявление уже через 3 часа после оплодотворения перед гастрულიей является, по-видимому, самым ранним проявлением гена в развитии дрозофилы. Материнский эффект гена *mal* неясен, и, возможно, он состоит в образовании кофактора или специфически влияет на синтез ксантиндегидрогеназы (Sayles et al., 1973).

При изучении спектра эстераз в лаборатории Л. И. Корочкина было показано, что одна из них — эстераза-6 — синтезируется в семьях выходящей системе самцов дрозофилы под контролем ряда генов, в число которых входят как структурные гены фермента, так и гены, контролирующие трансляцию ферментного белка (см. Кузин и др., 1975).

При исследовании энзимов в раннем эмбриогенезе млекопитающих, после разработки соответствующих микрометодов, главное внимание было обращено на раннее проявление генетического контроля над синтезом различных ферментов. Такой ранний контроль был обнаружен для глюкозофосфатизомеразы (Brinster, 1973) на 3-й день развития, гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы — на 4-й день (Epstein, 1972) и глюкозофосфатизомеразы — I — на 5-й день (Chapman et al., 1971) (рис. 72).

В связи с ранней активацией синтеза РНК у млекопитающих интересны данные о росте РНК-полимеразной активности во время дробления яиц мыши (Siracusa, 1973). Активность фермента уже во время первого деления дробления увеличивается

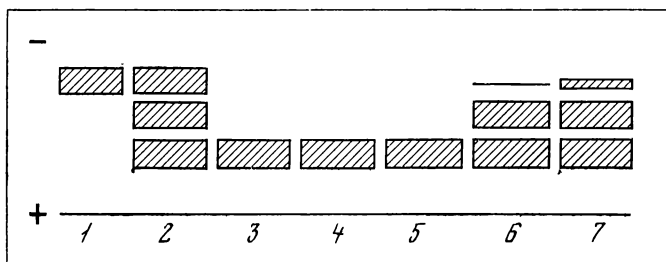


Рис. 72. Экспрессия гена, контролирующего глюкозофосфатазимазу в рап-
 дем эмбриогенезе мыши

Фермент из сердца взрослых мышей линии GPI-1A(♀) (3), GPI-1B(♂) (1) и их гибридов — GPI-1AB (2), а также из гибридных эмбрионов на стадии 3 (4), 4 (5), 5 (6) и 6 (7) сут анализировали электрофоретически. Первое проявление отцовского гена глюкозофосфатазимазы обнаруживается на 5 сут развития (Chapman et al., 1971)

в несколько раз, и этот рост продолжается на последующих ста-
 диях, увеличиваясь к стадии бластоцисты в 30—60 раз. Регист-
 рируемое увеличение намного выше того, которое наблюдалось у
 амфибий и морского ежа. Это, вероятно, связано с тем, что запас
 фермента в яйце млекопитающих не может быть слишком боль-
 шим. В расчете на ядро активность фермента снижается, и в
 данном случае и, как и у других объектов, отсутствует заметная
 корреляция между активностью РНК-полимеразы и активностью
 синтеза РНК. Когда синтез РНК относительно мал (до 8-й кле-
 точной стадии), активность полимеразы возрастает в 5—20 раз,
 а когда он значительно ускоряется, активность фермента увели-
 чивается не более чем в 2—5 раз (Siracusa, 1973).

Активность ферментов в дифференцирующихся тканях

Изучение изменений в составе ферментов дифференцирую-
 щихся тканей и органов позволяет иметь дело с относительно
 гомогенным материалом, а часто и связать появление энзима с
 функциональной специализацией клеток, т. е. с их окончатель-
 ной дифференцировкой.

Многие ферменты специфичны для специализированных орга-
 нов, и начало их синтеза в клетке уже является проявлением
 дифференцировки, никак не менее важным, чем морфологические
 признаки. В тех же случаях, когда речь идет об общетканевых
 ферментах, таких как, например, альдолаза или лактатдегидроге-
 наза, то для дифференцировки многих органов характерно появ-
 ление специфических изоформ и их характерные соотношения,
 свойственные лишь данному органу. В этом разделе мы ограни-
 чиваемся только ферментами, а не вообще специализированными

белками. Иногда такое разделение явно искусственно. Например, говоря о мышцах, мы рассматриваем не сам миозин, а его АТФазную активность. Как уже отмечалось выше, определение энзиматической активности далеко не всегда позволяет судить о количестве белка. Однако как раз для тканеспецифических белков соответствие между энзиматической активностью и количеством ферментного белка более очевидно, и в некоторых случаях измерения активности позволяет прямо рассчитывать количество молекул фермента на клетку (Rutter et al., 1968).

Образование специфического набора ферментов в специализированных клетках поднимает целый ряд вопросов. Главным среди них, вероятно, является место синтеза ферментов в ряду событий, составляющих органогенез: детерминация органа, его морфогенез, цитодифференцировка и, наконец, начало его функции. Ниже, на примере развития более хорошо изученной поджелудочной железы, мы увидим, что первое появление слабой энзиматической активности совпадает или же быстро следует за самыми начальными этапами органогенеза — детерминацией и ранним морфогенезом. Накопление высокой активности специфических для этого органа ферментов происходит на следующем этапе дифференцировки (Rutter et al., 1968).

Даже в специализированных тканях нам неизвестна роль всех изменений активности ферментов. Но и общеклеточные ферменты, определяющие неспецифические звенья метаболизма, имеют в разных органах свои особенности, и кинетика изменений их активности в ходе развития специфична для каждого из них. Это иллюстрируется, например, в работе Вэнга (Wang, 1968), который сравнивал изменения активности восьми ферментов углеводного и аминокислотного обмена в разных органах зародыша цыпленка. По его данным, активность лактатдегидрогеназы (в расчете на 1 мг белка) по мере развития снижается в печени, но почти не меняется в сердце, почках и мозге. Для глюкозо-6-фосфатазы характерно резкое, в семь-восемь раз, увеличение активности в почках, но малые изменения в остальных трех органах. Активность многих дегидрогеназ и трансаминаз возрастает в тканях почек, сердца и мозга, но меньше меняется в печени. Активность же глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы медленно падает во всех четырех органах. В итоге самым «спокойным» органом оказывается печень, а самым «активным» — почки, хотя их функция начинается только после вылупления.

Наиболее рано в развитии позвоночных происходит закладка и морфогенез первой системы, становление функций которой и окончательная дифференцировка продолжают длительное время и в постэмбриональном развитии. К специфическим ферментам первой системы и перво-мышечного аппарата относится ацетилхолинэстераза, появляющаяся в тканях одновременно с первыми мышечными движениями (см. Herrmann, Tootle, 1964). Для развития нервных клеток характерны также значительные изменения

активности ферментов, связанных с энергетическим и аминокислотным обменом — глутаматаминотрансферазы, глутаминсинтетазы. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эмбриональном развитии первой ткани снижается, но особенно интенсивно это снижение — в шесть—семь раз за три дня — происходит на ранних стадиях дифференцировки спинного мозга (Burt, 1965). Характерным свойством высокодифференцированной первой ткани — эмбриональной сетчатки глаза — является ее способность к индукции глутаматсинтетазы (Moscona et al., 1968). Индуктором синтеза этого фермента может быть гидрокортизон, причем в данном случае, как вообще для стероидных гормонов, показано его прямое действие на транскрипционном уровне. На этой модели удалось проследить активацию синтеза РНК, ее выход в цитоплазму и попадание в область тех полирибосом (12—14 рибосом), где синтезируется именно глутаматсинтетаза. Во фракции этих же полисом происходит активное включение аминокислот (Sarkar, Moscona, 1971).

Дифференцировка мышечной ткани сопровождается целым рядом изменений ферментативных активностей и появлением новых ферментов, специфичных только для мышц. Многие данные о таких изменениях получены при исследовании дифференцировки мышечной ткани в тканевых культурах. На ранних этапах миогенеза в тканевой культуре пролиферация миобластов и их слияние в миотрубочки сопровождается образованием миозина, обладающего миозин-АТФазной активностью и синтезом, характерных для мышц ферментов — микиназы и креатинфосфокиназы (Schubert et al., 1973). Изозимный состав креатинфосфокиназы в ходе миогенеза меняется. Молекула этого фермента состоит из двух субъединиц. В раннем эмбриогенезе цыпленка (в первые шесть дней развития) все креатинфосфокиназы представлены только изозимом I (BB), характерным для нервной ткани. В ходе дифференцировки мышц изозим I постепенно, с 7 по 15-й дни инкубации, замещается мышечным изозимом этого фермента — MM (форма III), но в переходный период образуется и смешанная форма — BM (Erpenberger et al., 1964). Так как белковые субъединицы не мигрируют между клетками, это означает, что подавление активности гена креатинфосфокиназы B и включение гена M происходит в одних и тех же клетках, по мере их дифференцировки. В дифференцирующейся культуре миобластов этот процесс осуществляется быстрее: на второй день культивирования происходит слияние миобластов, а на четвертый — резко повышается активность креатинфосфокиназы и форма I (BB) замещается на форму III (MM) (Morris et al., 1972).

Для мышечной дифференцировки характерно также образование мышечной формы ЛДГ за счет субъединицы M. В грудной мышце эмбриона цыпленка активность субъединицы M начинает расти с 6-го дня и за 40 дней эмбрионального и пост-

эмбрионального развития возрастает в 1000 раз. Аналогичный рост субъединицы М происходит и в культуре дифференцирующихся миобластов (Cahn, 1964). Параллельно с ростом активности мышечных ферментов и синтезом миозина в культуре миобластов образуются рецепторы ацетилхолина (Merlie et al., 1975).

Для мышечной дифференцировки свойственны изменения активности ферментов, прямо не связанных с функцией мышц, но, очевидно, важных для самого процесса дифференцировки. Так, после слияния миобластов в миотрубочки происходит значительное снижение активности аденилциклазы — фермента, локализованного на клеточной мембране и ответственного за синтез циклической АМФ, индуцируемый внеклеточными факторами (гормонами). Если слияние миобластов затормозить небольшим понижением температуры, то не происходит и уменьшения аденилциклазной активности (Wahrmann et al., 1973). Эти результаты — один из немногих примеров, когда активность ферментов удается связать с процессом морфогенеза. Однако такой вывод был бы более убедительным, если исключить возможность того, что активность локализованной на мембране аденилциклазы снижается в связи с уменьшением площади поверхности слившихся миобластов.

На следующем этапе мышечной дифференцировки, на 11-й день развития цыпленка, обнаруживается быстрое связывание меченого ацетата с гистонами ядер и высокая активность гистоновой деацетилазы. К 16-у дню активность этого фермента снижается почти до нуля (Voffa et al. 1971). Роль гистоновой деацетилазы неясна, как и вообще неизвестен смысл ацетилирования и деацетилирования гистонов. Однако очевидно, что эти процессы не могут быть не связаны с участием гистонов в регуляции функции ядер в дифференцирующихся клетках.

На еще более поздних этапах становления мускулатуры, в период перед рождением и в постэмбриональном развитии, происходит дальнейшее повышение активности специфических мышечных ферментов: 5-аденилмонофосфатдезаминазы, креатинфосфаткиназы, аденилаткиназы и мышечной альдолазы (Young, 1970). У животных, появляющихся на свет хорошо подготовленными к самостоятельному существованию, активность этих ферментов во много раз повышается за несколько дней до вылупления (цыпленок) или рождения (морская свинка). В то же время новорожденный крысенок рождается совершенно незрелым, и активность мышечных ферментов у него постепенно повышается в течение первых десяти дней после рождения.

Эта связь активности мышечных ферментов с функцией проявляется и при сравнении органов. В сердечной мышце кролика, активно работающей уже у эмбриона, повышение активности комплекса мышечных ферментов происходит за неделю до рождения, в то время как в диафрагме этот же процесс начинается в соответствии с ее функцией только после рождения (Young, 1970).

Многообразие белков, синтезирующихся при миогенезе, находит свое отражение в числе активных уникальных последовательностей ДНК (генов). Как показали опыты по гибридизации РНК с ДНК, в зачатках мышц зародыша цыпленка оно особенно велико (до 12—14% всей уникальной ДНК) в начале слияния миобластов в миотрубочки, а затем резко уменьшается до 7% и остается на этом уровне и во взрослых мышцах (Ordahl, Caplan, 1976).

В культуре миогенных клеток синтез мышечных ферментов и миозина стимулируется после того, как клетки помещаются в среду, не способствующую пролиферации (меньше эмбрионального экстракта, добавление инсулина и соматотропина и др.) и активирующую слияние миобластов. Однако если слияние миобластов и образование миотрубочек искусственно затормозить, например убрав из среды кальций, в неслившихся одиночных клетках начинается такое же накопление мышечных ферментов, как и при нормальной дифференцировке (Delain, Wahrmann, 1975; Turner et al., 1976).

Для дифференцировки печени характерны многие специфические ферменты, среди них энзимы, связанные с орнитинным циклом, альдолаза типа В, особый изотипный состав лактатдегидрогеназы, и ферменты, связанные с метаболизмом ароматических аминокислот — триптофаном и тирозином. Появление или резкое возрастание активности этих ферментов по времени предшествует началу или изменению функции печени, которое у млекопитающих и птиц происходит при рождении и вылуплении, а у амфибий — при метаморфозе головастика в лягушку.

Так, активность тирозинтрансаминазы в печени крыс обнаруживается сразу после рождения, быстро увеличивается и почти достигает максимума через 12 час. Этот процесс связан с активацией генов, так как подавляется актиномицином, но зависит также и от функции надпочечников, вероятно, через синтез стероидов (см. Herrmann, Tootle, 1964).

Три фермента, осуществляющих последовательную переработку тирозина: тирозин- α -кетоглютаратаминотрансфераза, гидроксифенилпируватгидролаза и гомогентизатоксигеназа — также впервые появляются после рождения, и далее активность всех трех строго параллельно увеличивается в течение первых суток и, с меньшим теплом, в последующие дни (Goswami et al., 1973).

Очень поучительны результаты работы, в которой исследовали один из ферментов печени — этаноламинфосфокиназа — в эмбриональном и постэмбриональном развитии крысы (Weinhold, Rethy, 1972). Активность этого энзима начинает резко возрастать за пять дней до рождения и к моменту рождения во много раз превосходит начальный уровень. В течение двух первых дней после рождения активность его резко снижается до исходного уровня и затем в течение 10 дней снова постепенно повышается. О причине такого скачка можно было бы высказать ряд пред-

положений. Однако при определении активности фермента в экстракте, очищенном от низкомолекулярных компонентов, оказалось, что резкого снижения активности после рождения не происходит и активность этаноламинфосфокиназы монотонно повышается в течение всего исследуемого периода. В низкомолекулярной фракции был обнаружен сильный ингибитор этого фермента — холин, появляющийся в печени после рождения. Таким образом, вопрос о причине временного снижения активности фермента был выяснен: деградации и ресинтеза фермента не происходит. Однако остается неясным, находится ли холин и фермент в одних и тех же частях клеток или их взаимодействие является артефактом, вызванным гомогенизацией. В этом случае холин не выступает в роли регулятора метаболизма, и действительного снижения активности фермента в клетках не происходит.

Кроме появления новых ферментов, для дифференцировки печени характерна и смена изозимного состава. Так, на смену активности мышечной альдолазы типа А у ранних зародышей крыс в печени возрастает активность уже специфической альдолазы печени (типа В) (Weber, Rutter, 1964). Этот переход сопровождается временным появлением гибридных форм альдолазы, состоящих из субъединиц А и В. У зародышей цыпленка исходной эмбриональной формой является альдолаза типа С, характерная для мозговой ткани: с 5-го по 8-й день инкубации осуществляется замена альдолазы типа С на тип В, и в этот период в печени образуются гибридные молекулы С—В (Lebherz, 1972). Это еще один пример, свидетельствующий о том, что замена изозимов происходит не посредством замены клеток, а путем их действительной дифференцировки, т. е. постепенного, в пределах каждой клетки, подавления транскрипционной активности одного гена и включения другого.

Суммарная активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в печени цыпленка в ходе развития меняется мало и постепенно снижается (Wang, 1968). Однако на тех же стадиях происходит внутриклеточная замена митохондриального фермента его изозимом, локализованным в микросомной фракции. Если максимум активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в митохондриях приходится на 11-й день инкубации (активность микросом в это время составляет не более 15%), то перед вылуплением (20-й день) достигает максимума активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в микросомах (теперь в митохондриальной фракции активность составляет 15—20%) (Simbonis, MacBride, 1965). Ряд ферментов печени отсутствует или они очень малоактивны до рождения плода у млекопитающих или до вылупления цыпленка [тирозинаминотрансфераза, триптофанпиролаза, УДФ-глюкуронилтрансфераза (УГТ) и др.]. Механизм этого подавления экспрессии был исследован для УГТ (Skea, Nemeth, 1969). Оказалось, что фактором подавления является эмбриональная среда — при эксплантации клеток эмбриональной печени в них сразу начинается

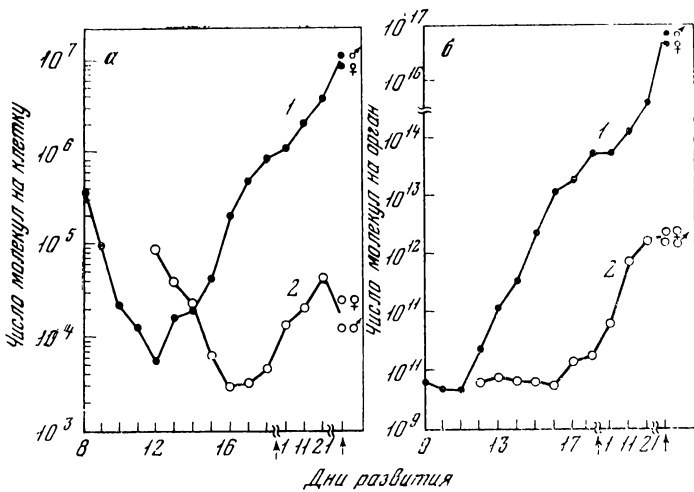


Рис. 73. Активность аргиназы в развитии мыши

Активность аргиназы определяли в печени (1) и почках (2) в эмбриональном и постэмбриональном развитии мыши и рассчитывали в виде числа молекул фермента на клетку (а) и на орган (б). Стрелками обозначены моменты рождения и взрослого животного. На ранних стадиях орган быстро растет и активность на клетку уменьшается; на последующих стадиях скорость синтеза фермента намного опережает скорость пролиферации (Bradley, 1973)

быстрое повышение активности УГТ. Однако при трансплантации эмбриональной печени на хориоаллантоис, т. е. в ту же эмбриональную среду, фермент в клетках печени не появляется.

Сложность расчета активности фермента и ее связь с синтезом видны на примере изменений активности аргиназы в печени и почках эмбриона мыши (Bradley, 1973) (рис. 73). Размер печени увеличивается от момента ее закладки (3-й день) и до рождения. Однако суммарная активность аргиназы в расчете на орган, очень низкая на этих стадиях, не повышается до 11—12 дня. Это приводит к тому, что в расчете на 1 мкг ДНК активность снижается за 3—4 дня в 100 раз, а в расчете на клетку — в 50 раз (размер клеток несколько уменьшается). В следующий период начинается интенсивный синтез аргиназы, и в расчете на клетку и ДНК она возрастает в 1000 раз. Но так как одновременно продолжается интенсивный рост печени (и числа клеток в ней), активность аргиназы на орган с 11-го дня до рождения увеличивается почти в миллион раз. Аналогичным образом, но в более поздние сроки, меняется аргиназная активность в почках — до 16-го дня развития она остается постоянной в расчете на орган, но снижается в десятки раз в расчете на ДНК или на клетку. В следующий же период в расчете на ДНК и на клетку она вырастает в 10 раз, а на целую почку — в 500 раз.

Эти данные показывают, в какой степени выводы зависят от постановки вопроса. Если исследователя интересует интенсивность функции аргиназы, то ее правильнее выражать в виде удельной активности, т. е. в расчете на миллиграмм белка или на клетку. Если же предметом исследования является синтез ферментного белка, то, очевидно, правильнее учитывать его суммарно, в расчете на весь орган. И, наконец, если делается попытка по активности фермента судить об интенсивности функции генов, то активность можно выражать в расчете на единицу ДНК.

Благодаря работам групп Раттера (Rutter et al., 1968, 1973) и Весселса (Wessels, Cohen, 1967) наиболее полно и в сочетании с экспериментально-эмбриологическим подходом изучен энзиматический план развития поджелудочной железы. Этот объект оказался чрезвычайно удобным благодаря синтезу в нем широкого набора строго тканеспецифических и легко определяемых экзокрипных ферментных белков, а также поступающих в кровь важных белковых гормонов — инсулина и глюкагона. Некоторые морфогенетические процессы в поджелудочной железе также оказались доступны для анализа.

Развитие этого органа у зародышей млекопитающих начинается на стадии 20—25 сомитов (9 дней у зародышей мыши и 10,5 дня — у крысы) в виде выроста первичной кишки, который постепенно образует характерную для экзокринных желез систему долек и ацинарных пузырьков. Они образованы железистым эпителием и соединены протоками, которые выводятся в полость кишки. Снаружи эпителий окружают мезенхимные клетки, формирующие впоследствии соединительнотканную строму железы. Среди экзокринных клеток рано обособляются островки клеток типа В, синтезирующие инсулин, а после рождения в железе можно выявить клетки типа А, синтезирующие глюкагон. Детерминацию поджелудочной железы можно отнести к стадии 10 сомитов (8-й день у мыши), когда эксплантация кишки и мезенхимы уже приводит к нормальному развитию железы. Для дифференцировки железистого эпителия, однако, необходимо постоянное воздействие мезенхимных клеток или присутствие некоторых факторов, вырабатываемых в этих клетках. Природа этих факторов до сих пор не установлена, но они связаны с осаждаемой частью гомогената мезенхимных клеток — термолабильны и чувствительны к действию трипсина (Rutter et al., 1968). Мезенхимный фактор определяет не только морфологическую дифференцировку и синтез ферментов, но и пролиферативную активность (синтез ДНК, митозы).

К 14 дню развития морфологическая дифференцировка поджелудочной железы как органа завершается, и митотическая активность в клетках сильно уменьшается. В это время начинается цитодифференцировка — образование эндоплазматического ретикулула, гранул зимогена и т. д. Специфические ферменты подже-

лудочной железы обнаруживаются на очель ранних стадиях ее развития, уже у 12-дневных зародышей крысы (рис. 74). Активность эта невелика и при расчете числа молекул фермента на клетку варьирует от 10^3 (липаза) до 10^5 (амилаза). Достоверно тестируемое накопление инсулина в первичной кишке обнаруживается уже на 11-й день развития крысы (одна молекула на клетку), а на 12-й день в зачатке железы находится уже более 10^4 молекул инсулина на клетку.

Этот первичный уровень активности, названный автором протодифференцировкой, сохраняется несколько дней, после чего (на 14—16-е дни развития) начинается резкое увеличение концентрации ферментов и гормонов. Раньше всего ускоряется синтез инсулина, амилазы и карбоксилазы А (14-й день), затем следуют липаза А, химотрипсин и рибонуклеаза (15-й день), а с 16—17 дня — остальные ферменты: трипсин, карбоксипептидаза В и липаза В. В течение 3—4 дней концентрация молекул ферментов в клетках увеличивается приблизительно в 10 000 раз и достигает максимального уровня — от 10^6 (липаза В) до 10^9 (химотрипсин) молекул на клетку. Концентрация инсулина от 10^4 на 12—14-е дни увеличивается до 10^7 к 18 дню развития. Так протодифференцированное состояние переходит в дифференцированное. В период постэмбрионального развития и у взрослого животного концентрация ферментов в клетках дифференцированной железы может значительно меняться (в 10 раз) в зависимости от условий, в основном от диеты.

Поджелудочная железа закладывается в виде двух долей — выростов кишки: дорзальная доля появляется на стадии 23—25 сомитов, а вентральная на 12 час. позже (стадия 29—30 сомитов). Однако повышение активности специфических ферментов — амилазы и карбоксипептидаз А и В — происходит в характерное для каждого фермента время, но строго синхронно в обеих долях (Sprooner et al., 1970). Это показывает, что в клетках поджелудочной железы осуществляется строгий временной последовательный порядок синтеза ферментов, который, однако, не связан непосредственно и однозначно с морфологическими процессами развития органа.

На зачатках поджелудочной железы, культивируемых с мечеными аминокислотами, удалось исследовать синтез отдельных ферментов непосредственно, т. е. разделить белки электрофоретически, идентифицировать отдельные фракции как ферменты и определить их радиоактивность. Синтез отдельных ферментов происходит с различной скоростью. В условиях культуры ткани в 13-дневном зачатке железы синтез белка продолжается все время (7 дней) с постоянной скоростью. Но на этом уровне включение меченых аминокислот в два фермента — амилазу и химотрипсин — начинает повышаться на второй день эксплантации (15-й день развития) и достигает максимума к 6 дню (19-й день), достигая 15% от общего синтеза белка.

По уровню ферментативной активности Раттер различает три состояния — предифференцированное, когда фермента в ткани нет или его содержится менее одной молекулы на клетку, протодифференцированное, когда активность очень мала (10^3 — 10^5 молекул на клетку) и дифференцированное с высокой активностью (10^6 — 10^9 молекул на клетку) (рис. 74). В соответствии с этим различаются и три перехода: первичный — из пре- в протодифференцированное состояние (он, очевидно, совпадает с началом морфогенеза), вторичный — из прото- в дифференцированное состояние (конец пролиферации и начало цитодифференцировки) и третичный, определяющий колебания (модуляции) в активности функционирующей железы.

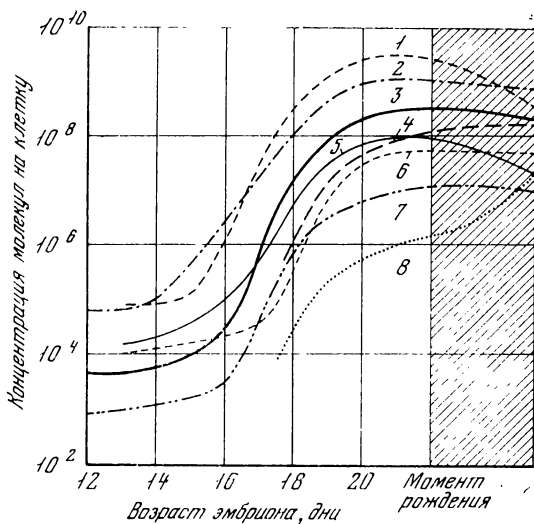
Не так отчетливо, но аналогичные картины описывались выше и в дифференцировке других тканей: раннее появление миозина в миоблестах, а затем его быстрое накопление в мышечных волокнах, появление аргиназы в эмбриональном зачатке печени и ее быстрое накопление в следующий период и др. Два этапа развития органов, выражающиеся в различных уровнях ферментативной активности, являются, по-видимому, общим свойством многих процессов цитодифференцировки. Эти процессы могут и не быть прямо связаны с морфогенезом органа как целого.

В заключение рассмотрим еще два своеобразных примера дифференцировки экзокринных желез, характеризующиеся специфическим набором ферментов. Одним из них является ядовитая железа змеи, которая морфологически начинает дифференцироваться очень рано, на 8-й день эмбрионального развития, и полностью функционально дееспособна к моменту вылупления змеи на 40-й день развития (при 30°). В отличие от поджелудочной железы между морфологическим формированием ядовитой железы (8—14 дни) и началом синтеза ферментов яда (25-й день) проходит значительное время. Активность фосфодиэстеразы в змеином яде повышается относительно медленно: за 15—20 дней второй половины развития — в 10 раз. Активность бензоиларгининэтилэстеразы и оксидазы аминокислот обнаруживается на 26—30-й день и в течение десяти дней возрастает почти в 100 раз (Fein et al., 1971).

Значительно подробнее Кафатос исследовал образование протеолитического фермента вылупления — коконазы, синтезирующегося в конце развития куколки и служащего для растворения фиброиновых нитей кокона павлиноглазки (Kafatos, 1972). Эпителиальные клетки на ранних этапах метаморфоза синтезируют кутикулярный слой куколки, после чего начинается длительная (18—21-й день) дифференцировка зимогенных клеток, секретирующих коконазу. Этот процесс, как и многие другие в развитии насекомых, контролируется антагонистично действующими ювенильным гормоном и экдизоном. Кратковременное действие экдизона включает дифференцировку, которая начинается с синтеза ДНК и последующей (3—4-й дни развития) волной

Рис. 74. Накопление ферментов во время развития поджелудочной железы мыши

- 1 — амилаза;
- 2 — химотрипсин;
- 3 — рибонуклеаза;
- 4 — трипсин;
- 5, 6 — карбоксипептидазы В и А;
- 7, 8 — липазы А и В. Небольшие количества ферментов присутствуют в клетках до начала их видимой цитодифференцировки; во время дифференцировки их количество возрастает в 10^4 — 10^5 раз (Уэсселс, Раттер, 1970)



митозов. В результате двух последних клеточных делений образуется секретирующая ткань, каждый элемент которой состоит из одной клетки канальца и двух, связанных с ней, зимогенных клеток. В последующие дни (5—12-е дни) цитоплазма зимогенных клеток увеличивается, а в их ядрах происходит многократная репликация ДНК, создающая 100—200-кратную полиплоидизацию. В цитоплазме нарастает количество рибосом и плотность эндоплазматического ретикулума и образуются полисомы, состоящие из 9—12 рибосом. Это соответствует синтезу белков с мол. весом 27 — $36 \cdot 10^3$, совпадающим с мол. весом неактивного предшественника коконазы — зимогена (33 тыс.). На апикальном конце зимогенных клеток образуется полость, которая в течение 9—16 дней развития заполняется зимогенным белком. В последующие дни фермент выделяется наружу, после чего зимогенные клетки дегенерируют.

Авторадиографическое исследование миграции меченых белков показывает, что доля секретируемых белков постепенно возрастает: на 10-й день развития синтез зимогена составляет 20% всего белкового синтеза, а на 14-й день он равен уже 70%. Зимоген еще не обладает протеолитической активностью — он становится активным ферментом — коконазой во время его выхода из канальца в полость кокона. Эта активация, по-видимому, осуществляется частичным протеолизом зимогена, так как легко может быть моделирована *in vitro* обработкой сильно разведенными растворами трипсина или протеазы оукливания, но не самой коконазой.

Синтез зимогена продолжается 3—4 дня, но в пределах этих дней скорость синтеза возрастает от 3 мкг на 11-й день до 15 мкг

на 17-й день (всего в куколке образуется 45 мкг зимогена). Измерения синтеза белков в разные сроки после обработки актиномицином позволили Кафатосу определить время полураспада мРНК для этих белков. Для всех незимогенных белков это время в среднем равно 2,5 час., а для мРНК зимогена — почти 100 час.

Если белки, синтезирующиеся в нормальных зимогенных клетках, пометить ^3H -лейцином, а в клетках, обработанных актиномицином, — ^{14}C -лейцином, а потом смесь этих белков фракционировать электрофоретически, то отношение меток $^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ позволяет судить о чувствительности различных белков к актиномицину, т. е. о времени жизни мРНК, на которых они синтезируются. Оказалось, что в зимогенных клетках из 50 исследованных фракций у 48 время полураспада варьировало от 1 до 4,5 час., у одного равнялось 10 час., и у мРНК зимогена — 100 час. Время жизни самих белков также варьирует от 5 до 90 час., причем между временем жизни мРНК и тех белков, которые они кодируют, нет заметной корреляции.

Расчеты показывают, что только 10% всей транскрибируемой мРНК является мРНК коконазы (зимогена). Однако благодаря высокой стабильности зимогенной мРНК ее количество быстро накапливается и с 9-го по 14-й день увеличивается в 27 раз, а синтез самого зимогена за эти дни возрастает от 9 до 70% (Kafatos, 1972). Учитывая, что средняя скорость синтеза мРНК равна от 3—4 (химотрипсин, коконаза) до 13—20 (фибрион, гемоглобин, овальбумин) молекул в минуту на один ген, можно рассчитать, что для обеспечения необходимого синтеза мРНК зимогена достаточно одного гена коконазы на один набор хромосом (при условии полиплоидизации ядер). Это означает, что даже в таких специализированных синтезах, как синтез коконазы, нет необходимости в амплификации генов.

Цикл работ Кафатоса по своей завершенности цитологического и молекулярного анализа дифференцировки, вероятно, превосходит все работы такого плана. Вместе с тем на примере этих работ видно, как мало известно о механизмах регуляции транскрипции, трансляции и цитодифференцировки в целом.

Подводя итог всему разделу о ферментах, легко убедиться, что только в отдельных случаях есть достаточные основания отождествлять активность фермента с его количеством и повышение ферментной активности с синтезом ферментного белка. Тем не менее данные, полученные при исследовании ферментов в развивающихся системах, дали много новой информации, которую было бы трудно получить иным путем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные, приведенные в этой книге, показывают, что молекулярно-биологические события, происходящие в процессах развития, складываются из обычных явлений — репликации, транскрипции, трансляции, составляющих основу общей молекулярной биологии. Однако в развивающихся системах эти процессы в ряде случаев принимают необычную форму, что и позволяет осуществляться особым явлениям, встречающимся только в ооцитах или дифференцирующихся клетках. Исключительную ситуацию представляет, по-видимому, оогенез, биологические особенности которого предъявляют природе весьма жесткие требования. Действительно, из одной клетки за относительно короткое время должно образоваться яйцо часто в тысячи и миллионы раз большего размера, несущее в себе гигантский запас питательных веществ и белоксинтезирующую систему, способную без непосредственного участия собственных ядер обеспечить процессы раннего развития. Для удовлетворения этих требований в ооците происходит ряд необычных процессов. На уровне структуры и репликации ДНК — образование «ламповых щеток» и амплификация рДНК. На уровне транскрипции в ооците осуществляется некоординированный синтез 5SpРНК, значительно опережающий синтез 28S и 18SpРНК. Особое значение принимает депонирование РНК в виде РНП для 4S и 5S РНК и мРНК, хранящихся до начала их использования многие месяцы. В обеспечении ооцита белками желтка участвуют другие клетки и осуществляется, например, перенос вителлогенина от места его синтеза внутрь ооцита. Такой перенос белка внутрь клетки, по-видимому, исключительное явление, свойственное только оогенезу.

Молекулярно-биологические события в клетках зародыша менее своеобразны, чем во время оогенеза, но и они отличаются от тех, которые происходят в дифференцирующихся клетках. Так, во время быстрых делений дробления репликация занимает почти весь период интерфазы и транскрипция у многих видов почти или совсем отсутствует. Однако затем наступает период активации, когда уровень транскрипции в ядрах эмбриональных клеток достигает наивысших значений и в последующем развитии только снижается.

В эмбриональных клетках при дифференцировке узкоспециализированных клеток большее значение приобретают изменения

времени жизни мРНК, которые позволяют обеспечить преимущественный синтез отдельных белков, несмотря на то, что скорости транскрипции различных активных генов различаются мало. Важную и, может быть, решающую роль в определении скорости выхода мРНК в цитоплазму и даже выбора видов выходящих мРНК может играть процессинг.

Включение трансляции и ее скорость — следующее звено, обеспечивающее синтез белков на заранее транскрибированных матрицах. Не только на стадиях, на которых ядра практически не функционируют, но и в другие периоды развития общая скорость синтеза белков и избирательный синтез отдельных их видов регулируются не только за счет различий в транскрипции, сколько за счет специфической трансляции отдельных матриц.

Сейчас еще трудно установить какие-либо общие закономерности в молекулярной биологии развития. Сравнение данных, полученных на трех — пяти основных объектах (морской еж, отдельные виды амфибий, рыб, млекопитающих, некоторых беспозвоночных), показало, что различия на молекулярном уровне могут быть очень велики. В одних случаях оогенез может продолжаться долго и осуществляться за счет транскрипции в собственном ядре ооцита, в других он происходит быстрее и определяется ядрами питающих клеток. У одних видов образуются мелкие яйца и синтез РНК начинается сразу после оплодотворения, у других видов яйца крупные и активация транскрипции происходит только в многоклеточном зародыше. У иглокожих, амфибий и рыб деления дробления следуют друг за другом очень быстро, и во время короткой интерфазы для транскрипции почти не остается времени. В то же время у млекопитающих и у аскариды каждое деление дробления продолжается часы, и даже в раннем дроблении ядра способны транскрибировать достаточно РНК для того, чтобы обеспечить ею маленький объем цитоплазмы вокруг ядер. Вероятно, роль ядер в ходе раннего развития этих видов существенно отличается от их роли у видов с более быстрым развитием или большим объемом яйца.

По-видимому, различной оказывается и такая особенность раннего развития, как сходство мРНК в ооците и у зародыша. У морских ежей и рыб на стадии бластулы синтезируются много тех же мРНК, что было транскрибировано в оогенезе, в то время как у амфибий такого сходства нет и на стадии поздней бластулы активируются совсем не те гены, которые функционировали на стадии «ламповых щеток» в оогенезе. Эти примеры лишь иллюстрируют разнообразие молекулярных механизмов развития. Чтобы судить о действительном их разнообразии и найти, какие признаки являются общими, а какие — частными, круг подробно изученных объектов должен быть значительно расширен. Число возможных объектов для молекулярной биологии развития и приемов работы с ними все время возрастает, но для накопления данных по многим видам еще предстоит большая работа.

Очень важно знать, в какой степени молекулярные процессы подчинены биологии размножения вида. Очевидно, что и размер яиц (запас желтка в них), и скорость оогенеза, и продолжительность эмбриогенеза, и степень развития личинки или новорожденного организма являются прямыми объектами естественного отбора. В то же время молекулярные процессы, такие, как, например, амплификация ДНК или полиплоидизация ядер питающих клеток, время начала транскрипции или порядок включения различных генов, не отбираются непосредственно, а в том или ином виде отражаются на количестве или жизнеспособности потомства. Разнообразие молекулярных механизмов развития, о котором говорилось выше, определяется, следовательно, различиями биологии размножения. В свою очередь можно ожидать, что сама эволюция, или во всяком случае ее темп, будет зависеть от того, окажутся ли молекулярные механизмы развития достаточно пластичными, т. е. способными изменяться за счет мутаций, создавая варианты, лучше приспособленные к изменяющимся внешним условиям.

Молекулярная биология развития, которая насчитывает менее трех десятков лет, еще не закончила своего описательного периода — для многих процессов мы еще не знаем самых основных параметров. Прогресс в этой области, в отличие, например, от молекулярной биологии вирусов, ограничен не только большей сложностью системы, но сложностью и недостаточным многообразием методов молекулярной биологии развития.

- Абрамова Н. Б., Васильева М. Н.* Онтогенез, 1973, 4, 288—293.
- Абрамова Н. Б., Клячко О. С., Нейфах А. А.* Онтогенез, 1977, 8, 600—610.
- Абрамова Н. Б., Нейфах А. А.* Журн. эвол. биохим. и физиологии, 1965, 1, 227—233.
- Абрамова Н. Б., Нейфах А. А.* Онтогенез, 1971, 2, 71—78.
- Абрамова Н. Б., Нейфах А. А.* Мол. биол., 1973, 7, 410—416.
- Айзенштадт Т. Б.* Журн. общей биол., 1965, 26, 230—236.
- Айзенштадт Т. Б., Детлаф Т. А.* Онтогенез, 1972, 3, 280—289.
- Айтхожин М. А., Белицина Н. В., Спирин А. С.* Биохимия, 1964, 29, 169—175.
- Андреева Л. Ф.* Онтогенез, 1970, 1, 298—409.
- Белицина Н. В., Айтхожин М. А., Гаврилова Л. П., Спирин А. С.* Биохимия, 1964, 29, 363—374.
- Богданов А. А., Леднева Р. К.* Итоги науки и техники, серия мол. биол., 1975, 5, 76—112.
- Боннер Дж.* Молекулярная биология развития, М., «Мир», 1967.
- Борхсениус С. Н., Андреева Л. И., Воробьев В. И.* Мол. биол., 1974, 8, 577—583.
- Ботвинник Н. М., Нейфах А. А.* Биохимия, 1969, 37, 643—647.
- Ботвинник Н. М., Нейфах А. А.* Онтогенез, 1977, 8, 217—222.
- Буракова Т. А., Костомарова А. А.* Онтогенез, 1975, 6, 225—233.
- Ванюшин Б. Ф.* Успехи соврем. биол., 1974, 77, 68—78.
- Вольфсон В. Г.* Изменение характера транскрипции в раннем эмбриогенезе морского ежа. Автореферат дисс. Л., 1972.
- Вольфсон В. Г., Воробьев В. И.* Научные сообщения Ин-та биологии моря, ДВНЦ АН СССР, 1971, вып. 2, 48—51.
- Вольфсон В. Г., Воробьев В. И.* Онтогенез, 1972, 3, 498.
- Газарян К. Г., Ченцов Ю. С., Кульминская А. Ф.* Журн. общей биол., 1967, 28, 198—205.
- Гаузе Г. Г.* Журн. Всес. хим. об-ва им. Менделеева, 1975, 20, 246—252.
- Гаузе Г. Г.* Митохондриальная ДНК. М., «Наука», 1977.
- Гаузе Г. Г., Михайлов В. С.* Докл. АН СССР, 1974, 217, 1197—1200.
- Георгиев Г. П.* Журн. Всес. хим. об-ва им. Менделеева, 1975, 20, 242—246.
- Давидсон Э.* Действие генов в раннем развитии. М., «Мир», 1972.
- Детлаф Т. А., Никитина Л. А., Строева О. Г.* Докл. АН СССР, 1965, 160, 1441—1443.
- Донцова Г. В., Игнатьева Г. М., Ротт Н. Н., Толсторуков И. И.* Онтогенез, 1970, 1, 471—481.
- Иваненков В. В.* Онтогенез, 1976, 7, 579—589.
- Касинский Н. Е., Болс Н. К., Берд Е. В.* Онтогенез, 1973, 4, 558—567.
- Кафиани К. А., Тимофеева М. Я.* Докл. АН СССР, 1964, 154, 721—724.
- Кафиани К. А., Тимофеева М. Я.* В кн.: Клеточная дифференцировка и индукционные механизмы. М., «Наука», 1965, с. 61—77.
- Коновалова Ю. Д., Местечкина А. Я.* Онтогенез, 1975, 6, 201—204.
- Костомарова А. А., Коробцова Н. С.* Докл. АН СССР, 1970, 191, 493—495.
- Костомарова А. А., Нечаева Н. В.* Онтогенез, 1970, 1, 391—397.
- Костомарова А. А., Ротт Н. Н.* В кн.: Клеточное ядро и его ультраструктуры. М., «Наука», 1970, с. 258—261.
- Корочкин Л. И.* Взаимодействие генов в развитии. М., «Наука», 1977.
- Криссгабер М. Р., Нейфах А. А.* Докл. АН СССР, 1968, 180, 1259—1261.

- Кригсгабер М. Р., Нейфах А. А., Мадатова Н. П. Онтогенез, 1976, 7, 47—57.
- Кузин Б. А., Аронштам А. А., Корочкин Л. И. Онтогенез, 1975, 6, 323—330.
- Лейтин В. Л. Успехи соврем. биол., 1975а, 79, 323—341.
- Лейтин В. Л. Успехи соврем. биол., 1975б, 80, 22—38.
- Маршак Т. А., Нейфах А. А. Онтогенез, 1973, 1, 28—33.
- Масуи Т. Онтогенез, 1972, 8, 574—587.
- Мельникова Н. Л., Тимофеева М. Я., Ротт Н. Н., Игнашева М. М. Онтогенез, 1972, 3, 85—94.
- Мильман Л. С., Юровицкий Ю. Г. Механизмы эпизиматической регуляции углеводного обмена в раннем эмбриогенезе. М., «Наука», 1973.
- Михайлов В. С., Гаузе Г. Г. Мол. биол., 1974, 1, 108—118.
- Нейфах А. А. Журн. общей биол., 1959, 20, 202—213.
- Нейфах А. А. Докл. АН СССР, 1960а, 132, 1458—1461.
- Нейфах А. А. Биохимия, 1960б, 25, 658—668.
- Нейфах А. А. Докл. АН СССР, 1961а, 136, 1248—1251.
- Нейфах А. А. Журн. общей биол., 1961б, 22, 42—57.
- Нейфах А. А. Природа, 1970, 7, 44—47.
- Нейфах А. А., Абрамова Н. Б. В кн.: Генетические функции органоидов цитоплазмы. Л., «Наука», 1974, с. 80—85.
- Нейфах А. А., Абрамова Н. Б., Багрова А. М. Цитология, 1971, 13, 491—498.
- Нейфах А. А., Давидов Е. Р. Биохимия, 1964, 29, 273—282.
- Нейфах А. А., Донцова Г. В. Биохимия, 1962, 27, 339—348.
- Нейфах А. А., Кригсгабер М. Р. Докл. АН СССР, 1969, 183, 493—496.
- Нейфах А. А., Кригсгабер М. Р., Ильин М. Н. Докл. АН СССР, 1968, 181, 253—256.
- Нейфах А. А., Костомарова Л. А. Цитология, 1971, 11, 231—235.
- Нейфах А. А., Ротт Н. Н. Докл. АН СССР, 1959, 125, 432—434.
- Нейфах А. А., Ротт Н. Н. В кн.: Структура и функция клеточного ядра. М., «Наука», 1967, с. 194—201.
- Нейфах А. А., Ротт Н. Н. Журн. общей биол., 1968, 29, 564—573.
- Овчинников Л. П., Воронина А. С., Степанова А. С., Белицина Н. В., Спиринов А. С. Мол. биол., 1968, 2, 752—763.
- Овчинников Л. П., Аванесов А. П., Спиринов А. С. Мол. биол., 1969а, 3, 465—471.
- Овчинников Л. П., Быстрова Т. Ф., Спиринов А. С. Докл. АН СССР, 1969б, 185, 210—213.
- Озернюк Н. Д. Докл. АН СССР, 1972, 207, 974—977.
- Озернюк Н. Д., Пальмбах Л. Р. Онтогенез, 1975, 6, 442—448.
- Опо С. Генетические механизмы прогрессивной эволюции. М., «Мир», 1973.
- Остерман Л. А. Успехи современной биологии, 1977, 76, 1—25.
- Остерман Л. А., Свердлова П. С., Соловьева И. А., Тимофеева М. Я. В кн.: Структура и функция нуклеиновых кислот. Пущино, 1974.
- Равен Х. Оогенез. М., «Мир», 1964.
- Рачкус Ю. А., Кафиани К. А., Тимофеева М. Я. Онтогенез, 1971, 2, 276—285.
- Рачкус Ю. А., Куприянова Н. С., Тимофеева М. Я., Кафиани К. А. Мол. биол., 1969а, 3, 617—626.
- Рачкус Ю. А., Тимофеева М. Я., Куприянова Н. С., Кафиани К. А. Мол. биол., 1969б, 3, 428—440.
- Романов А. А., Романова А. И. Птичье яйцо. М., «Пищепромиздат», 1959.
- Ротт Н. Н., Шевелева С. А. Цитология, 1967, 9, 1265—1275.
- Сакун О. Ф. Докл. АН СССР, 1961, 137, 749—751.
- Самарина О. П., Асриян А. С., Георгиев Г. П. Докл. АН СССР, 1965, 163, 1510—1516.
- Светлов П. Г., Быстров В. Д., Корскова Г. Ф. Архив анат., гистол., эмбриол., 1962, 42, 22—37.
- Скоблина М. Н. Экспериментальное изучение роли ядра в процессе созревания ооцитов амфибий и осетровых рыб. Автореферат дисс., 1970.
- Соловьева И. А., Тимофеева М. Я. Мол. биол., 1973, 7, 908—915.
- Соловьева И. А., Тимофеева М. Я., Сосинская И. К. Онтогенез, 1973а, 4, 340—347.
- Соловьева И. А., Тимофеева М. Я., Сосинская И. К. Онтогенез, 1973б, 4, 549—557.
- Соловьева И. А., Шостак Н. Г., Ти-

- мофеева М. Я. Онтогенез, 1976, 7, 18—26.
- Спирин А. С., Белицина Н. В., Айхожин М. А. Журн. общ. биол., 1964, 25, 331—338.
- Спирин А. С., Гаврилова Л. П. Рибосома. М., «Наука», 1971.
- Степанов А. С., Воронина А. С. Докл. АН СССР, 1972, 203, 1418—1421.
- Степанов А. С., Воронина А. С., Овчинников Л. П., Спирин А. С. Биохимия, 1972, 37, 3—9.
- Стрелков Л. А., Игнатьева Г. М. Онтогенез, 1975, 6, 519—523.
- Сэджер Р. Цитоплазматические гены и органеллы. М., «Мир», 1975.
- Тимофеева М. Я. Синтез нуклеиновых кислот в раннем эмбриональном развитии. Автореферат канд. дисс. М., 1967.
- Тимофеева М. Я., Иванчик Т. А., Нейфах А. А. Докл. АН СССР, 1969, 184, 1014—1016.
- Тимофеева М. Я., Кафиани К. А. Биохимия, 1964, 29, 110—115.
- Тимофеева М. Я., Кафиани К. А. Докл. АН СССР, 1965, 164, 1183—1186.
- Тимофеева М. Я., Кафиани К. А., Нейфах А. А. В кн.: Структура и функция клеточного ядра. М., «Наука», 1967.
- Тимофеева М. Я., Соловьева И. А., Серенкова Т. И. Мол. биол., 1977, 11.
- Тимофеева М. Я., Эйскер Г. И., Курянинова Н. С. Мол. биол., 1975, 9, 126—133.
- Уэсселс Н., Раггер У. В кн.: Молекулы и клетки. М., «Мир», 1970, с. 38—53.
- Ченцов Ю. С. Успехи совр. биол., 1966, 62, 324—344.
- Чмилевский Д. А. Цитология, 1971, 13, 1233—1256.
- Чугуев Ю. П., Стронгин А. Я., Сова В. В. Биохимия, 1976, 41, 1713.
- Шмерлинг Ж. Г. Известия АН СССР, 1970, серия биол., 6, 847—862.
- Шмерлинг Ж. Г. Биохимия, 1965, 30, 113—123.
- Шмидт Г. А. Эмбриология позвоночных, т. 1. М., 1951.
- Экизашвили В. К., Гаузе Л. Н., Кафиани К. А. Труды Тбилиск. ун-та, 1974, 8, с. 211—215.
- Abe H., Yamana K. Biochim. et biophys. acta, 1971, 840, 392—406.
- Abramova N. B., Neyfakh A. A. Exptl Cell Res., 1973, 77, 136—142.
- Adamson E. D., Woodland H. R. J. Mol. Biol., 1974, 88, 263—285.
- Agrell J., Person H. Nature, 1956, 178, 1398—1399.
- Alfageme C. R., Infante A. A. Exptl Cell Res., 1975, 96, 255—262.
- Alfert M. J. Cell and Compar. Physiol., 1950, 36, 381—409.
- Allen W. R., Wilt F. H. Exptl Cell Res., 1976, 97, 151—163.
- Aloni Y., Hatlen L. E., Attardi G. J. Mol. Biol., 1971, 56, 555—563.
- Altman S. Nature New Biol., 1971, 229, 19—20.
- Altman S. Cell, 1975, 4, 21—29.
- Anderson W. A. J. Ultrastructur. Res., 1969, 86, 95—107.
- Angerer R. C., Davidson E. H., Britten R. K. Cell, 1975, 6, 29—39.
- Araya A., Krauskopf M., Siddiqui M. A. Q. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1975, 67, 924—934.
- Aronson A. I., Wilt F. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, 62, 186—193.
- Asao T. Exptl Cell Res., 1969, 58, 243—252.
- Asao T. Exptl Cell Res., 1970, 61, 215—265.
- Attardi B., Attardi G. J. Mol. Biol., 1971, 55, 231—245.
- Attardi G., Aloni Y., Attardi B., Ojala D., Pica-Mattocchia L., Robberson Don L., Storrie B. Cold Spring Harbor. Sympos Quant. Biol., 1973, 38, 599—619.
- Attardi G., Costantino P., Ojala D. In Biogenesis of Mitochondria A. M. Kroon, C. Saccone (Eds). N. Y., Acad. Press, 1974, p. 9—15.
- Attardi G., Huang P. C., Kobat S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1965, 54, 185—192.
- Attardi G., Tu C., Keeley B. J. Cell Sci., 1975, 19, 55—63.
- Auriault Cl. In «Simbiosis», v. VII, N 2, 1975, p. 127—138.
- Bachvarova R., Davidson E. H., Allfrey V. G., Mirsky A. E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, 55, 358—365.
- Backstrom S. Exptl Cell Res., 1959, 18, 347—356.
- Backstrom S. Exptl Cell Res., 1963, 32, 566—569.
- Badman W. S., Brookbank J. W. Developm. Biol., 1970, 21, 243—256.
- Bagshaw J. C., Finamore F. J., Novelli G. D. Developm. Biol., 1970, 23, 23—25.
- Bakken A. H. Developm. Biol., 1973, 33, 100—122.

- Ballus E., Brachet J.* Biochim. et biophys. acta, 1962, **61**, 157—163.
- Baltus E., Hanocq-Quertier J., Brachet J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1968, **61**, 469—476.
- Baltus E., Quertier J., Ficq A., Brachet J.* Biochim. et biophys. acta, 1965, **95**, 408—417.
- Bamburg J. R., Shoter E. M., Silson L.* Biochemistry, 1973, **12**, 1476—1482.
- Barrett D.* Developm. Biol., 1964, **10**, 289—304.
- Barrett D., Angelo G. M.* Exptl Cell Res., 1969, **57**, 159—166.
- Beams H. W., Kessel R. G.* J. Cell Biol., 1962, **13**, 158—162.
- Beerman S.* Genetics, 1966, **54**, 567—576.
- Bell F., Reeder R.* Biochim. et biophys. acta, 1967, **142**, 500—511.
- Bell W. J., Barth R. H.* Nature New Biol., 1971, **230**, 220—222.
- Benbow R. M., Ford Ch. C.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, **72**, 2437—2441.
- Benson S. C., Triplett E. L.* Developm. Biol., 1974, **40**, 270—282.
- Benttinen L. C., Comb D. G.* J. Mol. Biol., 1971, **57**, 355—358.
- Berg W. E.* Exptl Cell Res., 1965, **40**, 469—489.
- Berg W. E.* Exptl Cell Res., 1968, **49**, 379—395.
- Berg W. E., Mertes D. U.* Exptl Cell Res., 1970, **60**, 218—224.
- Bergami M., Mansour T. E., Scarano E.* Exptl Cell Res., 1968, **49**, 650—655.
- Berger Sh. L., Cooper H. L.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, **72**, 3873—3877.
- Bernardi G.* Biochim. et biophys. acta, 1969, **174**, 423—433.
- Bernhardt D., Darnell J. E.* 1969. J. Mol. Biol., **42**, 43—56.
- Berns A. J. M., Van Kraaikamp M., Bloemendal H., Lane C. D.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, **69**, 1606—1609.
- Bester A. J., Kennedy D. S., Heywood S. M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, **72**, 1523—1527.
- Bibring T., Brachet J., Gaeta F. S.* Biochim. et biophys. acta, 1965, **108**, 644—651.
- Bieber S., Spence J. A., Hitchings G. H.* Exptl Cell Res., 1959, **16**, 202—213.
- Bielka H., Schultz J., Bottger M.* Biochim. et biophys. acta, 1968, **157**, 209—212.
- Bier K. J.* Cell Biol., 1963, **16**, 436—440.
- Bird A. P.* Chromosoma, 1974, **46**, 421—433.
- Bird A. P., Birnstiel M. L.* Chromosoma, 1971, **35**, 300—309.
- Bird A. P., Rogers E., Birnstiel M. L.* Nature New Biol., 1973, **242**, 226—230.
- Birnboim H. C., Sederoff R.* Cell, 1975, **5**, 173—181.
- Birnstiel M. L., Chipchase M., Spets J.* Progr. in Nucl. Acid Res. and Mol. Biol., 1971, **11**, 351—389.
- Birnstiel M., Jones K., Loening U. E.* Ann. embryol. morphogénèse, Suppl. I, 1969, 89—96.
- Birnstiel M. L., Spiers J., Purdom J., Jones K., Loening U. E.* Nature, 1968a, **217**, 649.
- Birnstiel M. L., Spiers J., Purdom J., Jones K., Loening U. E.* Nature, 1968b, **219**, 454—463.
- Black J. O., Bresnick E. J.* Cell Biol., 1972, **52**, 733—742.
- Blackler A. W.* Current Topics Developm. Biol., 1970, v. 5, 71—93.
- Bloom A. M., Mukherjee B. B.* Exptl Cell Res., 1972, **74**, 577—582.
- Boedtker H., Crkvenjakov R. B., Last J. A., Doty P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, **71**, 4208—4212.
- Boffa L. C., Gershay E. L., Vidali G.* Biochim. et biophys. acta, 1971, **254**, 135—143.
- Bolotin M., Coch D., Deutsch J., Netter P., Pertochilo E., Slonimski P. P.* Bull. Inst. Pasteur, 1971, **69**, 215—239.
- Bonhag F. F. J.* Morphol., 1955, **96**, 381—411.
- Bonner J.* In: «The Molecular Biology of Development». Oxford, Clarendon Press, 1965.
- Bonner J., Dahmus M. E., Fambrough D., Huang R. C. C., Marushige K., Tuan D. Y. H.* Science, 1968, **159**, 47—68.
- Bonner J., Garrard W. T., Gottesfeld J., Holmes D. S., Sevall J. S., Wilkes M.* Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1973, **38**, 303—308.
- Bonner J., Huang R. C. C.* J. Mol. Biol., 1963, **6**, 169—174.
- Bonner J., Wu Y.-R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, **70**, 535—537.
- Bonner W. M. J.* Cell Biol., 1975, **64**, 421—430.
- Bonner W. M. J.* Cell Biol., 1975, **64**, 431—449.
- Borst P.* Annual Rev. Biochem., 1972, **41**, 333—376.

- Borst P., Kroon A. M.* Internat. Rev. Cytol., 1969, 26, 108—190.
- Botchan M., Kram R., Schmid C. W., Hearst J. E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, 68, 1125—1129.
- Brachet J.* Exptl Cell Res., 1967, 48, 233—236.
- Brachet J.* Current Modern Biol., 1969, 2, 298—314.
- Brachet J., Ficq A.* Arch. Biol., 1956, 67, 431—446.
- Brachet J., Ficq A.* Exptl Cell Res., 1965, 38, 153—159.
- Brachet J., Ficq A., Tencer R.* Exptl Cell Res., 1963, 32, 168—170.
- Bradley M. O.* Developm. Biol., 1973, 33, 1—17.
- Brahmachary R. L.* Adv. in Morphogenesis, 1974, 10, 115—173.
- Brahmachary R. L., Chosal D., Tapaswi P. K., Basur R.* Exptl Cell Res., 1971, 65, 325—328.
- Brandhorst B. P., Humphreys T.* J. Cell Biol., 1972, 53, 474—482.
- Brandhorst B. P., McConkey E. H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 3580—3584.
- Bresch H.* FEBS Letters, 1973, 31, 233—236.
- Brasiello A. R.* Exptl Cell Res., 1968, 53, 252—260.
- Brasiello A. R.* Exptl Cell Res., 1971, 67, 279—286.
- Bravo R., Allende J. E.* Arch. Biochem. and Biophys., 1976, 172, 648—653.
- Brawerman G., Diez J.* Cell, 1975, 5, 272—280.
- Briggs R., Cassens G.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, 55, 1103—1109.
- Brinster R. L.* Genetics, 1973, 9, 187—191.
- Brinster R. L., Wiebold J. L., Brunner S.* Developm. Biol., 1976, 51, 215—224.
- Bristow D. A., Deuchar E. M.* Exptl Cell Res., 1964, 35, 580—589.
- Britten R. J., Kohne D. E.* Science, 1968, 161, 529—540.
- Britten R. J., Rake V. T.* Carnegie Inst. Year Book, 1968, 67, 325.
- Brown D. D.* Nat. Cancer Inst. Monogr., 1966, 23, 297.
- Brown D. D.* Current Topics Developm. Biol., 1967, v. 2, 47—73.
- Brown D. D., Blackler A. W.* J. Mol. Biol., 1972, 63, 75—83.
- Brown D. D., Dawid J. B.* Science, 1968, 160, 272—280.
- Brown D. D., Gurdon J. B.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1964, 51, 139—146.
- Brown D. D., Littna E. J.* Mol. Biol., 1964, 8, 669—678.
- Brown D. D., Littna E. J.* Mol. Biol., 1966, 20, 95—112.
- Brown D. D., Sugimoto K. J.* Mol. Biol., 1973, 78, 397—415.
- Brown D. D., Weber C. S. J.* Mol. Biol., 1968, 34, 661—680, 681—697.
- Brown D. D., Wensink P. D., Jordan E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, 68, 3175—3179.
- Brown D. D., Wensink P. D., Jordan E.* J. Mol. Biol., 1972, 63, 57—73.
- Brown I. R., Church R. B.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1971, 42, 850—856.
- Brown I. R., Church R. B.* Developm. Biol., 1972, 29, 73—84.
- Brown R. D., Tocchini-Valentini G. P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 1746—1748.
- Brown R. D., Tocchini-Valentini G. P.* In «Methods in Enzymology», v. 29E. N. Y., Acad. Press, 1973.
- Buckingham M. E., Caput D., Cohen A., Whalen R. C., Gross F.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974a, 71, 1466—1470.
- Buckingham M. E., Cohen A., Gross F., Lizzati D., Charmot D., Drugeon G.* Biochimie, 1974b, 56, 1571—1573.
- Buckingham M. E., Cohen A., Gross F.* J. Mol. Biol., 1976, 103, 611—626.
- Buckingham M. E., Gross F.* FEBS Letters, 1975, 53, 355—359.
- Burgos M.* Exptl Cell Res., 1955, 9, 360—363.
- Burdon R. H.* Progr. in Nucl. Acid. Res. and Mol. Biol., 1971, v. 11, 33—79.
- Burny A., Marbaix G., Quartier J., Brachet J.* Biochim. et biophys. acta, 1965, 103, 526—528.
- Burt M. A.* Developm. Biol., 1965, 12, 213—232.
- Byrd E. W. Jr.* Developm. Biol., 1975, 46, 309—316.
- Byrd E. W., Kasinsky H. E.* Biochemistry, 1973, 12, 246—253.
- Cahn D. R.* Developm. Biol., 1964, 9, 327—346.
- Callan H. G. J.* Cell Sci., 1966, 1, 85—98.
- Candelas G. C., Inverson R. M.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1966, 24, 867—871.
- Cape M., Decroly M.* Biochim. et biophys. acta, 1969, 174, 99—107.
- Carroll A., Eckberg W. R., Ozaki H.* Exptl Cell Res., 1975, 90, 328—332.

- Castaneda M.* Biochim. et biophys. acta, 1969, **179**, 381—388.
- Cave M. D.* Chromosoma, 1973, **42**, 1—22.
- Cave M. D.* J. Cell Biol., 1974, **63**, 53a.
- Chamberlain J. P.* Biochim. et biophys. acta, 1970, **13**, 183—193.
- Chamberlain J., Metz Ch. B. J.* Mol. Biol., 1972, **64**, 593—607.
- Chapman V. M., Whitten W. K., Ruddle F. H.* Developm. Biol., 1971, **26**, 153—158.
- Chase J. H., Dawid J. B.* Developm. Biol., 1972, **27**, 504—518.
- Chen P. S.* Exptl Cell Res., 1960, **21**, 523—534.
- Chi J. C., Fellini S. A., Holtzer H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, **72**, 4999—5003.
- Chia W. K., Morrison P. E.* Canad. J. Zool., 1972, **50**, 1569—1576.
- Church R. B., Brown I. R.* In «Results and Problem in Differentiation». Ursprung, 1972, v. 3, 1—12.
- Church R. B., Schultz G. A.* Current Topics Developm. Biol., 1974, v. 8, 179—202.
- Clandinin M. T., Schultz G. A. J.* Mol. Biol., 1975, **93**, 517—528.
- Clarkson S. G., Birnstiel M. L.* Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1974, v. 38, 451—459.
- Clarkson S. G., Birnstiel M. L., Serra V. J.* Mol. Biol., 1973a, **79**, 391—410.
- Clarkson S. G., Birnstiel M. L., Purdom I. F. J.* Mol. Biol., 1973b, **79**, 411—429.
- Clavert J.* Arch. néerl. zool., 1953, **10**, 1—18.
- Claycomb C., Vilee C. A.* Developm. Biol., 1971, **24**, 413—427.
- Clayton D. A., Davis R. W., Vinograd J. J.* Mol. Biol., 1970, **47**, 137—153.
- Clayton R. M.* Current Topics Developm. Biol., 1970, **5**, 115—180.
- Clegg I. S., Golub A. L.* Developm. Biol., 1969, **19**, 178—200.
- Clegg K. B., Denny P. C.* Developm. Biol., 1974, **37**, 263—272.
- Cognetti G., Settineri D., Spinelli G.* Exptl Cell Res., 1972, **71**, 465—468.
- Cohen L. H., Newrock K. M., Zweidler A.* Science, 1975, **190**, 994—997.
- Cohen Ph. P.* Science, 1970, **168**, 533—543.
- Coleman J. R., Coleman A. W. J.* Cell Physiol., 1968, **72**, 19—34.
- Collier J. R.* Acta embryol. et morphol. exptl., 1961, **4**, 70—76.
- Collier J. R.* Current Topics Developm. Biol., 1966, v. 1, 39—63.
- Collier J. R.* Exptl Cell Res., 1971, **69**, 181—184.
- Collier J. R.* Exptl Cell Res., 1975, **95**, 263—268.
- Collier J. R., Schwartz R.* Exptl Cell Res., 1969, **54**, 403—406.
- Colman A. J.* embryol. and exptl morphol., 1974, **32**, 515—532.
- Comb D. J. J.* Mol. Biol., 1965, **11**, 851—855.
- Comb D. G., Katz S., Branda R., Pinzino C. J. J.* Mol. Biol., 1965, **14**, 195—213.
- Comings D. E., Mittochia E.* Exptl Cell Res., 1972, **71**, 113—131.
- Corneo G., Ginelli E., Polli E. J.* Mol. Biol., 1968, **33**, 331.
- Corneo G., Ginelli E., Polli E.* Biochemistry, 1970a, **9**, 1565—1571.
- Corneo G., Ginelli E., Polli E. J.* Mol. Biol., 1970b, **48**, 319—327.
- Craig S. P. J.* Mol. Biol., 1970, **47**, 615—618.
- Craig N., Perry R. P.* Nature New Biol., 1971, **229**, 75—80.
- Craig S. P., Piatigorsky J.* Developm. Biol., 1971, **24**, 214—232.
- Craig S. P., Piatigorsky J.* Biochim. et biophys. acta, 1973, **299**, 642—653.
- Crippa M., Tocchini-Valentini G. P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, **68**, 2769—2773.
- Crippa M., Gross P. R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, **62**, 120—127.
- Crippa M., Davidson E., Mirsky A.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, **57**, 885—892.
- Daentl D. L., Epstein Ch. J.* Developm. Biol., 1971, **24**, 428—442.
- Daneholt B.* Cell, 1975, **4**, 1—19.
- Darnell J. E., Balin R. J.* Cell Physiol., 1970, **76**, 349—356.
- Das C. C., Kaufmann B. P., Gay H.* Nature, 1964a, **204**, 128—129.
- Das N. K., Luykx P., Alfert M.* Developm. Biol., 1965, **12**, 72—78.
- Das N. K., Micou-Estwood J., Ramamurthy G., Alfert M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, **67**, 968—975.
- Davidson E. H., Allfrey V. G., Mirsky A. E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1964, **52**, 501—508.
- Davidson E. H., Britten R. J.* Quart. Rev. Biol., 1973, **48**, 565—613.
- Davidson E. H., Crippa M., Mirsky A. E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1968, **60**, 152—159.

- Davidson E. H., Crippa M., Kramer F. R. Mirsky A. E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, 856—863.
- Davidson E. H., Galau G. A., Angerer R. C., Britten R. J. Chromosoma, 1975, 51, 253—259.
- Davidson E. H., Graham D. E., Neufeld B. R., Chamberlin M. E., Amenson C. S., Hough B. R., Britten R. J. Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1973, 38, 295—301.
- Davidson E. H., Haslett G. W., Finney R. J., Allfrey V. G., Mirsky A. E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1965, 54, 696—704.
- Davidson E. H., Hough B. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969a, 63, 342—349.
- Davidson E. H., Hough B. R. J. Exptl Zool., 1969b, 172, 25—48.
- Davidson E. H., Hough B. R. J. Mol. Biol., 1971, 56, 491—506.
- Davidson E. H., Hough B. R., Amenson C. S., Britten R. J. J. Mol. Biol., 1973, 77, 1—23.
- Davidson E. H., Mirsky A. E. In «Genetic Control of Differentiation». Brookhaven Sympos. Biol., 1965, v. 18, 77—98.
- Davis F. C., Wilt F. H. Developm. Biol., 1972, 27, 1—12.
- Dawid I. B. J. Mol. Biol., 1965, 12, 581—599.
- Dawid I. B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, 56, 269—276.
- Dawid I. B. «Control of organelle development». Soc. Exptl Biol., v. 24. Cambridge, Univ. Press, 1970, p. 227—246.
- Dawid I. B. J. Mol. Biol., 1972a, 63, 201—216.
- Dawid I. B. Developm. Biol., 1972b, 29, 139—151.
- Dawid I., Blackler A. W. Developm. Biol., 1972, 29, 152—161.
- Dawid I., Brown D. Developm. Biol., 1970, 22, 1—14.
- Dawid I. B., Brown D. D., Reeder R. H. J. Mol. Biol., 1970, 51, 341—360.
- Dawid I., Wolstenholme D. R. J. Mol. Biol., 1967, 28, 233—245.
- Dawid I., Wolstenholme D. R. Biophys. J., 1968, 8, 65—81.
- Decroly M., Cape M., Brachet J. Biochim. et biophys. acta, 1964, 87, 34—39.
- Dehn P. F., Wallace R. A. J. Cell Biol., 1973, 58, 721—724.
- Delain D., Wahrmann J. P. Exptl Cell Res., 1975, 93, 495—497.
- DeLaunay J., Wagnez M., Denis H. Developm. Biol., 1972, 42, 379—387.
- Denis H. J. Mol. Biol., 1966a, 22, 269—284.
- Denis H. J. Mol. Biol., 1966b, 22, 285—304.
- Denis H. Adv. in Morphogenesis, 1968, 7, 115—150.
- Denis H. Précis d'embryologie moléculaire. Presse Univ. France, 1974.
- Denis H., Mairy M. Europ. J. Biochem., 1972, 25, 524—534.
- Denis H., Mazabraud A., Wegner M. Europ. J. Biochem., 1975, 58, 43—50.
- Denis H., Wegnez M., Willem R. Biochimie, 1972, 54, 1189—1196.
- Denny P. C., Tyler A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1964, 14, 245—249.
- De Petrocellis B., Grippo P., Monroy A., Parisi E., Rossi M. In «Physiology and Genetics of Reproduction», E. M. Coutinho and F. Fuchs (Eds). N. Y., 1974, p. 35—60.
- De Petrocellis B., Parisi E. Exptl Cell Res., 1972, 73, 496—500.
- De Petrocellis B., Parisi E. Exptl Cell Res., 1973a, 72, 53—62.
- De Petrocellis B., Parisi E. Exptl Cell Res., 1973b, 82, 351—356.
- Dettlaff T. A. J. Embryol. and Exptl Morphol., 1966, 16, 183—195.
- Dettlaff T. A., Skobolina M. N. Ann. embryol. morphol. suppl. 1, 1969, p. 133—151.
- Deuchar E. M. J. Embryol. and Exptl Morphol., 1956, 4, 327—436.
- Deuchar E. M. In «Cell Differentiation» Sympos. Soc. Exptl Biol., 1963a, 17, 58—73.
- Deuchar E. M. Acta embryol. et morphol. exptl., 1963b, 6, 311—323.
- Deuchar E. M. Acta embryol. et morphol. exptl., 1964, 7, 49—60.
- Diacumakos J. G., Garnjowski J., Tatum E. L. J. Cell Biol., 1965, 26, 427—443.
- Diez J., Brawerman G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 4091—4095.
- Dobner P., Flickinger R. A. Biochim. et biophys. acta, 1976, 432, 401—403.
- Donohoo P., Kafatos F. C. Developm. Biol., 1973, 32, 224—229.
- Douvas A. S., Harrington Ch. A., Bonner J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 3902—3906.
- Dubroff L. M., Nemer M. Nature, 1976, 260, 120—124.
- Dumont J. N. J. Morphol., 1969, 129, 317.

- Duncan M. J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, **72**, 1533—1537.
- Durante M. C. C. r.*, Acad. sci. Paris, 1955, **241**, 1340.
- Durante M. C.* Acta embryol. et morphol. exptl., 1961, **4**, 352—355.
- Dworkin M., Infante A. A.* Developm. Biol., 1976, **53**, 73—90.
- Ecker R. E., Smith L. D.* Biochim. et biophys. acta, 1966, **129**, 186—192.
- Ecker R. E., Smith L. D.* Developm. Biol., 1968, **18**, 232—249.
- Ecker R. E., Smith L. D.* Developm. Biol., 1971, **24**, 559—576.
- Ecker R. E., Smith L. D., Subtelny S.* Science, 1968, **160**, 1115—1117.
- Edds M. V.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1958, **44**, 296—305.
- Edstrom J. E.* Biochim. et biophys. acta, 1964, **80**, 399—410.
- Edstrom J. E., Gall J. G. J.* Cell Biol., 1963, **19**, 279.
- Ellem K. A. O., Gwathkin R. B. L.* Developm. Biol., 1968, **18**, 311—330.
- Ellis C. H. J.* Exptl Zool., 1966, **163**, 1—22.
- Elsdale T. R., Fischberg M., Smith S.* Exptl Cell Res., 1958, **14**, 642—644.
- Elsson D., Chargaff E.* Experimentia, 1952, **8**, 143—145.
- Emerson Ch. P., Becker S. K. J.* Mol. Biol., 1975, **93**, 431—447.
- Emerson Ch. P., Humphreys T.* Developm. Biol., 1970, **23**, 86—112.
- Emerson Ch. P., Jr., Humphreys T.* Science, 1971, **171**, 898—901.
- Enger M. D., Walters R. A.* Biochemistry, 1970, **9**, 3551—3562.
- England M. C., Mayer D. T.* Exptl Cell Res., 1957, **12**, 249—253.
- Epel D.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1964a, **17**, 62—68.
- Epel D.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1964b, **17**, 69—73.
- Epel D.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, **57**, 899—906.
- Epel D.* Exptl Cell Res., 1972, **72**, 74—89.
- Epel D., Pressman B. C., Elsaesser S., Weaver A. M.* In: «The Cell Cycle Gene — Enzyme Interactions», G. M. Padill et al. (Ed.). N. Y., Acad. Press, 1969b), 279—298.
- Epel B., Weaver A. M., Muchmore A. W., Schimke R. T.* Science, 1969a, **163**, 294—296.
- Eppenberger H. M., Eppenberger M., Richterich R., Aebi H.* Developm. Biol., 1964, **10**, 1—16.
- Eppig J. J., Dumont J. N.* Developm. Biol., 1971, **36**, 330—342.
- Epstein Ch. I.* Science, 1972, **175**, 1467—1468.
- Epstein Ch. I., Smith S. A.* Developm. Biol., 1973, **33**, 171—184.
- Epstein Ch. I., Smith S. A.* Developm. Biol., 1974, **40**, 233—244.
- Evans D., Birnstiel M.* Biochim. et biophys. acta, 1968, **166**, 274—276.
- Evans L. E., Ozaki H.* Exptl Cell Res., 1973, **79**, 228—231.
- Fan H., Penman S. J.* Mol. Biol., 1971, **59**, 27.
- Fansler B., Loeb L. A.* Exptl Cell Res., 1969, **57**, 305—310.
- Fantoni A., Bordin S., Lunadei M.* Cell Differentiation, 1972, **1**, 219—228.
- Faulhabe I., Lyra L. Roux'* Arch. Entwicklungsmech. Organ., 1975, **176**, 191—205.
- Fedecka-Bruner B., Anderson M., Epel D.* Developm. Biol., 1971, **25**, 655—671.
- Fein A., Bdolah A., Rochva E.* Developm. Biol., 1971, **24**, 520—532.
- Feldherr C. M.* Exptl Cell Res., 1975, **93**, 411—419.
- Feldherr C. M., Richmond P. A.* Exptl Cell Res., 1976, **100**, 417—419.
- Ficq A.* Exptl Cell Res., 1968, **53**, 691—693.
- Ficq A., Aiello F., Scarano E.* Exptl Cell Res., 1963, **29**, 128—136.
- Ficq A., Brachet J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, **68**, 2775—2776.
- Filipowicz W., Sierra J. M., Ochoa S.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, **72**, 3947—3951.
- Filipowicz W., Sierra J. M., Nombela C., Ochoa S., Merrick W. C., Anderson W. F.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, **73**, 44—48.
- Finamore F. J., Crouse G. T.* Exptl Cell Res., 1958, **14**, 160—165.
- Finamore F. J., Clegg J. C.* Cell Cycle. Padilla (Ed.). N. Y., Acad. Press, 1969, p. 249—281.
- Finamore F. J., Thomes D. J., Crouse G. T., Llough B.* Arch. Biochem., 1960, **88**, 10—15.
- Finamore J., Volkin E.* Exptl Cell Res., 1958, **15**, 405—411.
- Firtel R. A., Monroy A.* Developm. Biol., 1970, **21**, 87—104.
- Fischmann H. H.* Current Topics Developm. Biol., 1970, v. 5, 235—265.
- Fitzmaurice L. C., Baker R. F.* Biochim. et biophys. acta, 1972, **272**, 510—517.

- Flickinger R. A.* Biol. Bull., 1957, 112, 21—28.
- Flickinger R. A.* Roux' Arch. Entwicklun-
gsmech. Org., 1973, 171, 256—258.
- Flickinger R., Greene R., Kohl D.,
Miyagi M.* Proc. Nat. Acad. Sci.
USA, 1966, 56, 1712—1718.
- Flamm W. G., McCallum M., Walker
P. M. B.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA,
1967, 57, 1729—1734.
- Flamm W. G., Walker P. M. B.,
McCallum M. J.* Mol. Biol., 1969, 40,
423—443.
- Follett B. K., Nicholls T. J., Redshaw
M. R. J.* Cell Physiol., 1968, 72, 91—
102.
- Ford O. L.* Nature, 1971, 233, 561—564.
- Ford P.-J., Southern E. M.* Nature New
Biol., 1973, 241, 7—12.
- Frederiksen S., Hellung-Larsen P.*
Exptl Cell Res., 1972, 71, 289—292.
- Frederiksen S., Hellung-Larsen P.,
Engberg J.* Exptl Cell Res., 1973, 71,
287—294.
- Frederiksen S., Hellung-Larsen P.*
Exptl Cell Res., 1974, 89, 217—223.
- Freeman S. B. J.* Embryol. and Exptl
Morphol., 1971, 26, 339—349.
- Fromson D., Verma D. P. S.* Proc. Nat.
Acad. Sci. USA, 1976, 73, 148—151.
- Fry B. J., Gross P. R.* Developm. Biol.,
1970a, 21, 105—124.
- Fry B. J., Gross P. R.* Developm. Biol.,
1970b, 21, 125—146.
- Furuichi Y., Morigan M., Shatkin A. J.,
Jelinek W., Salditt-Georgieff M., Dar-
nell J. E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA,
1975, 72, 1904—1908.
- Gabrielli F., Baglioni C.* Developm.
Biol., 1975, 43, 254—263.
- Galau G. A., Britten R. J., Davidson
E. H.* Cell, 1974, 2, 9—20.
- Galau G. A., Klein W. H., Davis M. M.*
Cell, 1976, 7, 485—505.
- Gall J. G.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA,
1968, 60, 553.
- Gall J. G.* Genetics, 1969, 61, 121—132.
- Gall J. G., Callan H. G.* Proc. Nat.
Acad. Sci. USA, 1962, 48, 562—570.
- Gall J. G., Pardue M. L.* Proc. Nat.
Acad. Sci. USA, 1969, 63, 378.
- Gall J. B., Pardue M.* In: «Methods in
Enzymology», 1971, v. 21D, 470—480.
- Gambino R., Metafora S., Felicetti L.,
Raisman J.* Biochim. et biophys.
acta, 1973, 312, 377—391.
- Ganion L. R., Kessel R. G. J.* Cell.
Biol., 1972, 52, 420—437.
- Gasaryan K., Andreeva N.* FEBS Let-
ters, 1972, 27, 263—266.
- Gause G. G., Mikhailov V. S.* Biochim.
et biophys. acta, 1973, 324, 189—198.
- Georgiev G. P.* Progr. in Nucl. Acid
Res. and Mol. Biol., 1967, 6, 259—
351.
- Georgiev G. P.* Current Topics Deve-
lopm. Biol., 1972, v. 7, 1—60.
- Geyer-Duszynska J.* Chromosomes To-
day, 1966, 1, 174—192.
- Gilbert W., Dressler D.* Cold Spring
Harbor Sympos. Quant. Biol., 1968,
33, 437—484.
- Gineitis A. A., Nivinskas H. H., Vo-
rob'ev V. J.* Exptl Cell Res., 1976,
98, 248—252.
- Girard M., Baltimore D.* Proc. Nat.
Acad. Sci. USA, 1966, 56, 999—1002.
- Giudice G.* Developmental biology of
sea urchin embryos. N. Y., Acad.
Press, 1973.
- Giudice G., Mutolo V.* Biochim. et bio-
phys. acta, 1967, 138, 276—285.
- Giudice G., Mutolo V.* Biochim. et bio-
phys. acta, 1969, 179, 341—347.
- Giudice G., Sconzo G., Bono A., Alba-
nese J.* Exptl Cell Res., 1975, 72, 90—
94.
- Giudice G., Sconzo G., Ramirez F.* Bio-
chim. et biophys. acta, 1972a, 262,
401—403.
- Giudice G., Sconzo G., Albanese L., Or-
tolani G., Camurat M.* Cell Differenti-
ation, 1974, 3, 287—295.
- Glišin V. R., Glišin M. V.* Proc. Nat.
Acad. Sci. USA, 1964, 52, 1548—
1553.
- Glišin V. R., Glišin M. V., Doty P.*
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, 56,
285.
- Glišin V., Savic A., Ruzdeje S., Bai-
kovic N., Milensnic I.* Stud. Bio-
phys., 1972, 31—32, 345—357.
- Goldberg R. B., Crain W. R., Reeder-
man J. V., Moore G. P., Barnett
Th. R., Higgins R. C., Gelfand R. A.,
Galau G. A., Britten R. J., Davidson
E. H.* Chromosoma, 1975, 51, 225—
251.
- Goldstein L., Rao M. V. N., Prescott
D. M.* Ann. Embryol. and Morphol.,
Suppl., 1969, 1, 189—197.
- Gorski G., Morrison M. R., Merkel
Ch. G., Lingrel G. B. J.* Mol. Biol.,
1974, 86, 363.
- Gorski G., Morrison M. R., Merkel
Ch. G., Lingrel G. B.* Nature, 253,
1975, 749—751.
- Goswami M. N. O., Rosenberg A. J.,
Menry F.* Developm. Biol., 1973, 30,
129—136.

- Gould M. *Developm. Biol.*, 1969a, **19**, 469—481.
- Could M. *Developm. Biol.*, 1969b, **19**, 482—497.
- Govaert J. *Arch. Biol.*, 1957, **68**, 165.
- Grady L. J., Campbell W. P. *Nature*, 1975, **254**, 356—358.
- Grainger R. M., Wilt F. H. J. *Mol. Biol.*, 1976, **104**, 589—601.
- Graham C. F. *J. Cell Sci.*, 1966, **1**, 363.
- Graham C. F. In: «Regulation of Mammalian Reproduction». S. Segal (Ed.). Springfield, Thomas Publ. Co., 1973, 286—301.
- Graham C. F., Arms K., Gurdon J. B. *Developm. Biol.*, 1966, **14**, 349—381.
- Graham C. F., Morgan R. W. *Developm. Biol.*, 1966, **14**, 439—460.
- Graham D. E., Neufeld B. R., Davidson E. H., Britten R. J. *Cell*, 1974, **1**, 127—137.
- Grant P. J. *Cell. and Compar. Physiol.*, 1958, **52**, 227—248.
- Grant Ph. In: «Biochemistry of Animal Development», v. 1. Acad. Press, 1965, p. 483—594.
- Graziosi G., Robertis D. R. *Nature*, 1975, **258**, 157—159.
- Green H., Goldberg B., Schwartz M., Brown D. D. *Developm. Biol.*, 1968, **18**, 391—400.
- Greenberg J. R. *J. Mol. Biol.*, 1969, **46**, 85—98.
- Greenberg J. B., Penman S. J. *Mol. Biol.*, 1966, **21**, 527—535.
- Greene R. F., Flickinger R. A. *Biochim. et biophys. acta*, 1970, **217**, 447—460.
- Gregg J. R., Løvtrup S. *Biol. Bull.*, 1955, **108**, 29—34.
- Grigliatti T. A., White B. N., Tener G. M., Kaufman T. C., Suzuki D. T. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, **71**, 3527—3531.
- Grippe P., Jaccarino M., Parisi E., Scarrano E. J. *Mol. Biol.*, 1968, **36**, 195—208.
- Gross K. W., Jacobs-Lorena M., Baglioni C., Gross P. R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973a, **70**, 2614—2618.
- Gross K. W., Ruderman J., Jacobslo M., Baglioni C., Gross P. R. *Nature New Biol.*, 1973b, **241**, 272—274.
- Gross P. R. *J. Exptl Zool.*, 1964, **157**, 21—38.
- Gross P. *Curr. Topics Developm. Biol.*, 1967, **2**, 1—45.
- Gross P. R., Cousinou G. H. *Exptl Cell Res.*, 1964, **33**, 368—395.
- Gross P. R., Fry B. J. *Science*, 1966, **153**, 749—751.
- Gross P. R., Malkin L. J., Hubbard M. J. *Mol. Biol.*, 1965, **14**, 468.
- Grossman A., Levy M., Troll W., Weismann G. *Nature New Biol.*, 1973a, **243**, 277—278.
- Grossmann A., Inoue S., Fischman L. *Nature New Biol.*, 1973b, **243**, 278—280.
- Gurdon J. B. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1967, **58**, 545—552.
- Gurdon J. B. *J. Embryol. and Exptl Morphol.*, 1968, **20**, 401—414.
- Gurdon J. B. *Essays Biochem.*, 1969, **4**, 25—68.
- Gurdon J. B. *Proc. Roy. Soc. B*, 1970, **176**, 303—314.
- Gurdon J. B. *The control of gene expression in development*. London, Oxford Univ Press, 1974.
- Gurdon J. B. *Harvey Lectures*, 1973—1974, Ser. 69. New York, 1975a, p. 49—69.
- Gurdon J. B. In: «Cell Patterning». Amsterdam, 1975b, p. 223—234; discuss, p. 234—239.
- Gustafson T. *Internat. Rev. Cytol.*, 1954, **3**, 277—327.
- Gustafson T. In: «Biochemistry of Animal Development», v. 1. R. Weber (Ed.). N. Y., Acad. Press, 1965, p. 139—202.
- Gustafson F., Lenicque P. *Exptl Cell Res.*, 1952, **3**, 251—274.
- Gustafson T., Lenicque P. *Exptl Cell Res.*, 1955, **8**, 114—117.
- Haba G., Cooper G. W., Elting V. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1966, **56**, 1719—1723.
- Hagenmaier H. E. *Roux' Archiv, Entwicklungsmech. Org.*, 1969, **162**, 19—40.
- Haggis A. *Science*, 1966, **154**, 670.
- Hall T. J., Cummings M. R. *Developm. Biol.*, 1975, **46**, 233—242.
- Hallberg R. L. *Developm. Biol.*, 1974, **38**, 346—351.
- Hallberg R. L., Brown D. D. *J. Mol. Biol.*, 1969, **46**, 393—411.
- Hand G. S. *Exptl Cell Res.*, 1974, **64**, 204—208.
- Hanocq F., Kirsch-Volders M., Hanocq-Quertier J., Balrus E., Steinert G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, **59**, 1322—1326.
- Hanocq-Quertier J., Baltus E., Ficq A., Brachet J. *J. Embryol. and Exptl Morphol.*, 1968, **19**, 273—281.

- Hansen-Delkeskamp E. Z.* Naturforsch., 1969, 24b, 1331—1335.
- Harding C. V., Harding D., Perlmann P.* Exptl Cell Res., 1954, 6, 202—210.
- Harris S. E., Forrest H. S.* Science, 1967, 156, 1613—1615.
- Hartmann J. F., Comb D. A. J.* Mol. Biol., 1969, 41, 155—158.
- Hartmann J. F., Ziegler M. H., Comb D. G.* Developm. Biol., 1971, 25, 209—231.
- Hassell J., Klein N. W.* Developm. Biol., 1971, 26, 380—392.
- Hausman S. J., Anderson S. M., Telfer W. H. J.* Cell Biol., 1971, 48, 303—313.
- Heideman S. R., Townsend J., Tomokins R. J.* Exptl Zool., 1975, 191, 253—261.
- Henning W. J.* Mol. Biol., 1968, 38, 227—239.
- Herrman H.* Current Topics Developm. Biol., 1970, v. 5, 181—202.
- Herrmann H., Tootle M. L.* Physiol. Rev., 1964, 44, 289—371.
- Hess O.* Mol. Genet., 1968, 103, 58—71.
- Heywood S. M., Kennedy D. S., Bester A. J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 2428—2431.
- Heywood S. M., Rich A.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1968, 59, 590—597.
- Hickey E. D., Weber L. A., Baglioni C.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, 73, 19—23.
- Hinegardner R. T.* Exptl Cell Res., 1961, 25, 341—347.
- Hinegardner R. T., Rao B., Feldman D. E.* Exptl Cell Res., 1964, 36, 53—61.
- Hirama M. N., Mano Y.* Exptl Cell Res., 1974, 86, 15—24.
- Hnilica L. S., Johnson A. W.* Exptl Cell Res., 1970, 63, 261—270.
- Hoff-Jorgensen E.* Proc. Sympos. Colsto Res. Soc., 1954, 7, 79—90.
- Hoff-Jorgensen E., Zeuten E.* Nature, 1952, 169, 245—246.
- Hogan B., Gross P. R.* Exptl Cell Res., 1972, 72, 101—114.
- Holmes R. S., Whitt G. S.* Biochem. Genetics, 1970, 4, 471—480.
- Holt C. E., Gurney E. G. J.* Cell Biol., 1969, 40, 484—496.
- Hough B. R., Davidson E. H.* In «Handbook of Genetics», v. 4, 1976, p. 51—55.
- Hough B. R., Smith M. J., Britten R. J., Davidson E. H.* Cell, 1975, 5, 291—299.
- Hough B. R., Yancey P. H., Davidson E. H. J.* Exptl Zool., 1973, 185, 357—368.
- Hourcade D., Dressler D., Wolfson J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973a, 70, 2926—2930.
- Hourcade D., Dressler D., Wolfson J.* Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1973b, 38, 537—549.
- Huez G., Marbaix G., Alubert E., Lecclereg M., Nudal U., Soreg H., Solomon R., Lebleu B., Revel M., Littauer U. Z.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 3143—3146.
- Hultin T.* Exptl Cell Res., 1950, 1, 599—602.
- Hultin T.* Exptl Cell Res., 1961, 25, 405—417.
- Hultin T., Morris J.* Developm. Biol., 1968, 17, 143—164.
- Hultin T., Wessel G.* Exptl Cell Res., 1952, 3, 613—616.
- Humphrey R. R.* Developm. Biol., 1966, 13, 57—76.
- Humphreys T.* Developm. Biol., 1969, 20, 435—458.
- Humphreys T.* Developm. Biol., 1974, 26, 201—208.
- Hynes R. O., Greenhouse G. A., Minkoff R., Gross P. R.* Developm. Biol., 1972, 27, 457—478.
- Hynes R. O., Gross P. R.* Biochim. et biophys. acta, 1972, 259, 104—111.
- Hynes R. O., Raff A., Gross P. R.* Developm. Biol., 1972, 27, 150—164.
- Illmensee K., Mahowald A. P.* Exptl Cell Res., 1976, 97, 127—140.
- Imoh H., Kawasaki J. J.* Embryol. and Exptl Morphol., 1973, 30, 73—82.
- Infante A. A., Graves P. N.* Biochim. et biophys. acta, 1974, 246, 100—110.
- Infante A. A., Nemer M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, 58, 681—688.
- Infante A. A., Nemer M. J.* Mol. Biol., 1968, 32, 543—565.
- Ingwall J. S., Weiner C. D., Morales M. F., Davis E., Stockdale F. E.* J. Cell Biol., 1974, 63, 145—151.
- Inman R. J.* Mol. Biol., 1967, 28, 103.
- Inman R., Schnos M. J.* Mol. Biol., 1970, 49, 93—98.
- Izawa M., Allfrey V. G., Mirsky A. E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1963a, 49, 544—551.
- Izawa M., Allfrey V. G., Mirsky A. E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1963b, 50, 811—817.
- Jamamoto K. J.* Fac. Sci. Hokkaido Univ., 1956, Ser. 6, 12, 375.

- Jared D. W., Wallace R. A. *Compar. Biophys. Physiol.*, 1968, **24**, 437—443.
- Jaworska H., Avanzi S., Lima-de-Faria A. *Hereditas*, 1973b, **74**.
- Jaworska H., Lima-de-Faria A. *Hereditas*, 1973a, **74**, 169—186.
- Jaworska H., Lima-de-Faria A. *Hereditas*, 1973b, **74**, 186—199.
- Jenkins K. D., Denny P. C. *Biochim. et biophys. acta*, 1970, **217**, 206—208.
- John H., Birnstiel M. L., Jones K. W. *Nature*, 1969, **223**, 582—587.
- Johnson J. D., Epel D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, **72**, 4474—4478.
- Johnson A. W., Hnilica L. S. *Biochim. et biophys. acta*, 1970, **224**, 518—530.
- Johnson A. W., Hnilica L. S. *Biochim. et biophys. acta*, 1971, **246**, 141—154.
- Johnson A. W., Wilhelm J. A., Hnilica L. S. *Biochim. et biophys. acta*, 1973b, **295**, 150—158.
- Johnson A. W., Wilhelm J. A., Ward D. N., Hnilica L. S. *Biochim. et biophys. acta*, 1973a, **295**, 140—149.
- Johnson R., Strehler B. *Nature*, 1972, **240**, 412—414.
- Kaempfer R., Kaufmann J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, **69**, 3317—3321.
- Kafatos F. C. *Current Topics Developm. Biol.*, 1972, **v. 7**, 125—192.
- Kafiani C. A. *Adv. in Morphogen.*, 1970, **v. 8**, 209—284.
- Kafiani C. A., Akhalkatsi R. G., Gasyryan K. G. *Biochim. et biophys. acta*, 1973, **324**, 133—142.
- Kafiani C. A., Timofeeva M. J., Melnikova N. L., Neyfakh A. A. *Biochim. et biophys. acta*, 1968, **169**, 274—277.
- Kafiani C. A., Timofeeva M. J., Neyfakh A. A., Melnikova N. L., Rachkus J. A. *J. Embryol. and Exptl Morphol.*, 1969, **21**, 295—308.
- Karnofsky D. A., Basch R. S. *J. Biophys. and Biochem. Cytol.*, 1960, **7**, 61—71.
- Karp G., Manes C., Hahn W. E. *Developm. Biol.*, 1973, **31**, 404—408.
- Karp G. C., Weems M. D. *J. Exptl Zool.*, 1975, **194**, 535—546.
- Kasamatsu H., Robberson D. L., Vinograd J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, **68**, 2252—2257.
- Kaulenas M. S., Fairbairn D. *Developm. Biol.*, 1966, **14**, 481—494.
- Kaulenas M. S., Fairbairn D. *Exptl Cell Res.*, 1968, **52**, 233—251.
- Kaulenas M. S., Foor W. E., Fairbairn D. *Science*, 1969, **136**, 1201—1203.
- Kaulenas M. S., Unsworth B. R. *Mol. Gen. Genet.*, 1974, **135**, 231—243.
- Kedes L. H., Birnstiel M. L. *Nature New Biol.*, 1971, **230**, 165—169.
- Kedes L. H., Gross P. R. *J. Mol. Biol.*, 1969, **42**, 559—575.
- Kedes L. H., Gross P. R., Cognetti G., Hunter A. L. *J. Mol. Biol.*, 1969a, **45**, 337—351.
- Kedes L. H., Hogan B., Cognetti G., Schweig S., Yanover P., Gross P. R. *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 1969b, **34**, 717—723.
- Kedes L., Stavy L. *J. Mol. Biol.*, 1969, **43**, 337—340.
- Kemp D. *J. Nature*, 1975, **254**, 573—577.
- Kessel R. G. *Z. Zellforsch. mikroskop. Anat.*, 1968, **89**, 17—38.
- Kessel R. G. *Z. Zellforsch. mikroskop. Anat.*, 1971, **112**, 313—332.
- Kidder G. M. *J. Exptl Zool.*, 1972, **180**, 55—74.
- Kidder G. M. *Developm. Biol.*, 1976, **49**, 132—142.
- Kierszenbaum A. L., Tres L. L. *J. Cell Biol.*, 1975, **65**, 258—270.
- Kijima S., Wilt F. H. *J. Mol. Biol.*, 1969, **40**, 235—246.
- Kimmel C. B., Sessions S. K. *J. Mol. Biol.*, 1976, **102**, 177—192.
- Kindas-Mugge I., Lane C. D., Kreil G. *J. Mol. Biol.*, 1974, **87**, 451—462.
- Kirby K. S., Cook E. A. *Biochem. J.*, 1967, **104**, 254—257.
- Kirshner R. H., Wolstenholme D., Gross N. G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1968, **60**, 1466—1472.
- Kistler A., Weber R. *Developm. Biol.*, 1974, **37**, 236—247.
- Klein W. H., Murphy W., Attardi G., Britten R. J., Davidson E. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, **71**, 1785—1789.
- Klose J., Van Wallenberg-Pachaly H. *Developm. Biol.*, **51**, 324—331.
- Knowland J. S. *Biochim. et biophys. acta*, 1970, **204**, 416—429.
- Knowland J., Graham C. J. *Embryol. and Exptl Morphol.*, 1972, **27**, 1, 167—176.
- Koch E. A., Smith P. A., King R. C. *J. Morphol.*, 1967, **121**, 55—70.
- Kriggsaber M. R., Kostomarova A. A., Terekhova T. A., Burakova T. A. *J. Embryol. and Exptl Morphol.*, 1971, **26**, 611—622.

- Krigsgaber M. R., Neyfakh A. A. J.* Embryol. and Exptl Morphol., 1972, 28, 491—509.
- Kung Ch. Sh.* Developm. Biol., 1974, 36, 343—356.
- Kunz W.* Chromosoma, 1967, 20, 332—370.
- Kuriki Y., Okazaki R.* Embryologia (Nagoya), 1959, 4, 337—348.
- La Marca M. J., Fidler M. C., Smith L. D., Keem K.* Developm. Biol., 1975, 47, 384—393.
- La Marca M. J., Smith D. L., Strobel M. C.* Developm. Biol., 1973, 34, 106—118.
- Lanclos K. D., Hamilton T. H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 3934—3938.
- Landesman R.* Cell Differentiation, 1972, 1, 209—213.
- Landesman R., Gross P. R.* Developm. Biol., 1969, 19, 244—260.
- Lane C. D., Marbaix G., Gurdon J. B.* J. Mol. Biol., 1971, 61, 73—91.
- Larsen C. J., Galibert F., Hampe F., Boiron M.* Bull. Soc. Chim. Biol., 1969, 51, 649—668.
- Larsen C. J., Lebowitz P., Weissman I. M., Dubuy B.* Cold Spring Harbor. Sympos. Quant. Biol., 1970, v. 35, 35—46.
- Lebherz H. C.* Developm. Biol., 1972, 27, 143—149.
- Leonard D. A., La Marca M. J.* Developm. Biol., 1975, 45, 199—202.
- Lerner A. M., Bell E., Darnell J. E.* Science, 1963, 141, 1187—1188.
- Levin D. H., Ranu R. S., Ernst V., Fifer M. A., London J. M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 4849—4853.
- Levner M. H.* Exptl Cell Res., 1974, 85, 296—302.
- Levy S., Wood P., Grunstein M., Kedes L.* Cell, 1975, 4, 239—248.
- Lewin B.* Cell, 1975, 4, 77—93.
- Lievens A., Brachet J.* Biochim. et biophys. acta, 1970, 204, 263—266.
- Liftan R. P., Kedes L. H.* Developm. Biol., 1976, 48, 47—55.
- Lima-de-Faria A.* Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1973, 38, 559—571.
- Lima-de-Faria A., Birnstiel M., Jaworska H.* Genetics, 1969, 61, 145—161.
- Lima-de-Faria A., Gustafsson T., Jaworska H.* Hereditas, 1973a, 73, 119—162.
- Lima-de-Faria A., Jaworska H., Gustafsson T., Daskaloff S.* Hereditas, 1973b, 73, 163—191.
- Lima-de-Faria A., Nilsson B., Cave D., Puga A., Jaworska H.* Chromosoma, 1968, 25, 1—20.
- Lindahl P. E.* Roux' Archiv Entwicklungsmech. Org., 1932, 127, 300—338.
- Ling V., Dixon G. H. J.* Biol. Chem., 1970, 245, 3035—3042.
- Lison L., Pastels J. J.* Arch. biol. (Liege), 1951, 62, 2—64.
- Lockshin R. A.* Science, 1966, 154, 775—776.
- Lodish H. F., Jacobson A.* Developm. Biol., 1972, 27, 283—285.
- Loeb L. A., Fansler B.* Biochim. et biophys. acta, 1970, 217, 50—55.
- Loeb L. A., Fansler B., Williams R., Mazia D.* Exptl Cell Res., 1969, 57, 298—304.
- Loening U. E.* Sympos. Soc. Gen. Microbiol., 1970, 20, 77—106.
- Longo F. J., Plunkett W.* Developm. Biol., 1973, 30, 156—167.
- Løvtrup-Rein H.* Exptl Cell Res., 1972, 72, 188—194.
- Mabuchi I.* J. Mol. Biol., 1976, 100, 569—582.
- MacGregor H. C.* Quart. J. Microscop. Sci., 1965, 106, 215—228.
- MacGregor H. C.* J. Cell Sci., 1968, 3, 437.
- MacGregor H. C.* Biol. Rev., 1972, 47, 177—210.
- MacKintosh F. R., Bell E. J.* Mol. Biol., 1969a, 41, 365—380.
- MacKintosh F. R., Bell E.* Science, 1969b, 164, 961—963.
- MacLaughlin I., Terner Ch.* Biochem. J., 1973, 133, 635—639.
- MacMaster K. R., Taylor I. H.* J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1958, 4, 5—11.
- Maden B. E. H., Robertson J. S. J.* Mol. Biol., 1974, 87, 227—235.
- Maggio R., Vittorelli M. L., Rinaldi A. M., Monroy A.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1964, 15, 436—441.
- Maggio R., Vittorelli M. L., Caffarelli-Mormino J., Monroy A. J.* Mol. Biol., 1968, 31, 621—626.
- Mahdavi V., Crippa M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 1749—1752.
- Mahowald A. P., Tiefert M.* 1970. Roux' Archiv. Entwicklungsmech. Org., 165, 8—25.
- Mairy M., Denis H.* Arch. internat. physiol. et biochim., 1970, 78, 599—601.

- Mairy M., Denis H.* Developm. Biol., 1971, **24**, 143—165.
- Mairy M., Denis H.* Europ. J. Biochem., 1972, **25**, 535—543.
- Mairy-von-Frenckell M.* Arch. internat. physiol. et biochim., 1970, **78**, 393—397.
- Malacinski G. M.* Developm. Biol., 1971, **26**, 442—451.
- Malacinski G. M.* Experientia, 1974, **30**, 610—612.
- Malkin L. J., Gross P. R., Romanoff Ph.* Developm. Biol., 1964, **10**, 378—394.
- Man N. T., Cole R. I.* Exptl Cell Res., 1974, **83**, 328—334.
- Manen C., Russell D. H. J.* Embryol. and Exptl Morphol., 1973, **30**, 243—256.
- Manes C.* 1975. In «The Developmental Biology of Reproduction». Markert, Paraconstantinou (Eds). N. Y., Acad. Press, 1975, p. 133—163.
- Manes C., Daniel J. C.* Exptl Cell Res., 1969, **55**, 261—268.
- Manning J. E., Schmid C. W., Davidson N.* Cell, 1975, **4**, 141—155.
- Mano Y.* Biochem. and Biophys. Res. Comm., 1968, **33**, 877—882.
- Mano Y.* Biochemistry (Tokyo), **65**, 483—487.
- Mano Y.* Developm. Biol., 1970, **22**, 433—460.
- Mano Y. J.* Biochem., 1971a, **69**, 1—10.
- Mano Y. J.* Biochem., 1971b, **69**, 11—25.
- Mano Y., Nagano H.* Biochemistry (Tokyo), 1970, **67**, 611—618.
- Maroun L. E.* Exptl Cell Res., 1973, **79**, 459—461.
- Marshak A., Marshak C.* Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole, 1952, **103**, 295.
- Marshak A., Marshak C.* Exptl Cell Res., 1953, **5**, 288—300.
- Marshak A., Marshak C.* Nature, 1954, **174**, 919—920.
- Marshak A., Marshak C. J.* Biophys. and Biochem. Cytol., 1955, **1**, 167—171.
- Marshak A., Marshak C.* Exptl Cell Res., 1956, **10**, 246—247.
- Marushige Y., Marushige K. J.* Biol. Chem., 1975, **250**, 39—45.
- Marzluff W. F., Jr., White E. L., Banjamin R., Huang R. Ch. C.* Biochemistry, 1975, **14**, 3715—3724.
- Masui Y. J.* Exptl Zool., 1972, **166**, 365—376.
- Masui Y., Markert C. L. J.* Exptl Zool., 1971, **177**, 129—146.
- Mathews Chr. K.* Exptl Cell Res., 1975, **92**, 47—56.
- Matioly G., Brody S., Thorell B.* Acta haematol., 1962, **28**, 73—86.
- Matsumoto L., Kasamatsu H., Piko L. J.* Cell Biol., 1973, **59**, 221a.
- Matsumoto L., Kasamatsu H., Piko L., Vinograd J.* J. Cell Biol., 1974, **63**, 146—159.
- Mazabraud A., Wegnez M., Denis H.* Developm. Biol., 1975, **44**, 326—332.
- Mazia D.* Growth, Suppl., 1949, **13**, 5.
- Mazia D., Schatten G., Steinhardt R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, **72**, 4469—4473.
- McClellan D. K., Warner A. H.* Developm. Biol., 1972, **29**, 88.
- McLean E. W., Whiteley A. H.* Exptl Cell Res., 1974, **87**, 132—138.
- McMaster-Kaye R., Kaye J. S.* Exptl Cell Res., 1976, **97**, 378—386.
- Meeker G. L., Iverson R. M.* Exptl Cell Res., 1971, **64**, 129—132.
- Merlie J. P., Sobel A., Chandeux J. P., Gross F.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, **72**, 4028—4032.
- Merriam R. W.* Exptl Cell Res., 1966, **41**, 614—621.
- Merriam R. W. J.* Cell Sci., 1969, **5**, 333—349.
- Metafora S., Felicetti L., Gambino R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, **68**, 600—604.
- Mezger-Freed L. J.* Cell Biol., 1963, **18**, 471—474.
- Mikhailov V. S., Gause G. G.* Developm. Biol., 1974, **41**, 57—71.
- Miller O. L. J.* Cell Biol., 1964, **23**, 60A.
- Miller O. L.* Nat. Cancer Inst. Monogr., 1966, **23**, 53—66.
- Miller O. L., Beatty B. R.* Genetics, Suppl., 1969, **118**, 84—86.
- Miller T. H., Epel D.* Developm. Biol., 1973, **32**, 331—344.
- Milstone L. M., Piatigorsky J.* Developm. Biol., 1975, **43**, 91—100.
- Milstone L. M., Zelenka P., Piatigorsky J.* Developm. Biol., 1976, **48**, N 2, 197—204.
- Mintz B. J.* Exptl Zool., 1964a, **157**, 87—100.
- Mintz B. J.* Exptl Zool., 1964b, **157**, 267—272.
- Mirkes P. E.* Exptl Cell Res., 1970, **60**, N 1, 115—118.
- Mirkes P. E.* Exptl Cell Res., 1972, **74**, 503—508.
- Mizuno S., Lee Y. R., Whiteley A. H.,*

- Whiteley H. R.* Developm. Biol., 1974, **37**, 18—27.
- Monesi V.* Exptl Cell Res., 1965, **39**, 197—224.
- Monroy A.* Compar. Biochem., 1967, **28**, 1—22.
- Monroy A., Gross P. R.*, Morphological and Biochemical Aspects of Cytodifferentiation, Basel S. Karger, 1967, p. 37—51.
- Monroy A., Rinaldi A. M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1965, **54**, 107—111.
- Monroy A., Vittorelly M. L.* J. Cell and Compar. Physiol., 1962, **60**, 285—287.
- Monroy A., Vittorelly M. L., Guarneri R.* Acta embryol. et morphol. exper., 1961, **4**, 77—95.
- Moore B. C.* Anat. Rec., 1959, **134**, 610—611.
- Morris J. E., Coone A., Cole R. J.* Exptl Cell Res., 1972, **74**, 582—585.
- Moscona A. A., Moscona M. U., Saenz N.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1968, **61**, 160—167.
- Moss B., Ingram V. M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1965, **54**, 967—971.
- Moss B. A., Jonce W. G., Ingram V. M.* J. Biol. Chem., 1973, **248**, 1025—1031.
- Moss P. S., Stronman R. C.* Developm. Biol., 1976, **48**, 431—437.
- Muckenthaler F. A., Mahowald A. P.* J. Cell Biol., 1966, **28**, 199—208.
- Mulnard J.* Arch. Biol., 1954, **65**, 261.
- Murison G.* Developm. Biol., 1969, **20**, 518—543.
- Murray K.* In: «Structure and Function of Chromatin». Ciba Found. Sympos., v. 28. Elsevier, 1975, p. 338—351.
- Nakano E., Monroy A.* Exptl Cell Res., 1958, **14**, 236—244.
- Nass M. M. K.* Science, 1969a, **165**, 25—35.
- Nass M. M. K.* Nature, 1969b, **223**, 1124—1126.
- Nass M. M. K., Nass S., Afselius B. A.* Exptl Cell Res., 1965, **37**, 516—539.
- Nass S., Margit M. K., Nass, Hennix U.* Biochim. et biophys. acta, 1965, **95**, 426—435.
- Nemer M. J.* Biol. Chem., 1962, **237**, 143—149.
- Nemer M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1963, **50**, 230.
- Nemer M.* Progr. in Nucl Acid Res. and Mol. Biol., 1967, v. 7, 243—301.
- Nemer M.* Cell, 1975, **6**, 559—570.
- Nemer M., Bard S. G.* Science, 1963, **140**, 664—666.
- Nemer M., Dubroff L. M., Graham M.* Cell, 1975, **6**, 171—178.
- Nemer M., Infante A.* Science, 1965, **150**, 214—217.
- Nemer M., Infante A. J.* Mol. Biol., 1967, **27**, 73—86.
- Nemer M., Lindsay D. T.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1969, **35**, 156—160.
- Newrock K. M., Ruff R. A.* Developm. Biol., 1975, **42**, 242—261.
- Neyfakh A. A.* Current. Topics in Developm. Biol., 1971, v. 6, 45—77.
- Neyfakh A. A., Kostomarova A. A., Burakova T. A.* Exptl Cell Res., 1972, **72**, 223—232.
- Nigon V., Dailer J.* Biochim. et biophys. acta, 1958, **29**, 246—255.
- Nilsson M. O., Hultin T.* Exptl Cell Res., 1972, **72**, 145—149.
- Nonaka M., Terayama H.* Developm. Biol., 1975, **43**, 322—332.
- Ogur M., Rosen G.* Arch. Biochem., 1950, **25**, 262—276.
- Ohno S., Karasaki S., Takata K.* Exptl Cell Res., 1964, **33**, 310—318.
- Ojala D., Attardi G.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, **71**, 563—568.
- Olmstead J. B., Witman G. B., Carlson K., Rosenbaum J. L.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, **68**, 2273—2277.
- O'Malley B. W., Woo S. L. C., Harris S. E., Rosen J. M., Means A. R.* J. Cell Physiol., 1975, **85**, 343—356.
- O'Melia A. F., Villee C. A.* Nature New Biol., 1972, **239**, 51—53.
- Oppenheimer J. M.* Quart. Rev. Biol., 1947, **22**, 105—118.
- Ordahl Ch. P., Caplan A. J.* Developm. Biol., 1976, **54**, 61—72.
- Ozaki H., Whiteley A. H.* Developm. Biol., 1970, **21**, 196—215.
- Paglia L. M., Berry S. J., Kastern W. H.* Developm. Biol., 1976a, **51**, 173—181.
- Paglia L. M., Kastern W. H., Berry S. J.* Developm. Biol., 1976b, **51**, 182—189.
- Painter T. S., Taylor A. N.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1942, **28**, 311—317.
- Palmer W. G., Papaconstantinou J.* Nature, 1968, **219**, 170—172.
- Palmiter R.* Cell, 1975, **4**, 189—197.
- Pan M. L., Bell W. J., Telfer W. H.* Science, 1969, **165**, 393—394.
- Papaconstantinou J., Fulku E. M. J.* Cell Physiol., 1968, **72**, 161—180.
- Pardue M. L., Gall J. C.* Science, 1970, **168**, 1356—1360.

- Parsons J. A., Rustad R. C. J. Cell Biol., 1968, 37, 683—691.
- Pasternak C. A. 1973. Developm. Biol., 30, 403—410.
- Pasternak J., Haight M. Chromosoma, 1975, 49, 279—298.
- Paterson J. B., Lang M., Dackerman K., Schulz J. Exptl Cell Res., 1954, 6, 181—190.
- Paul M., Goldsmith M. R., Hunsley J. R., Kafatos F. C. J. Cell Biol., 1972, 55, 653—679.
- Perkowska E., MacGregor H. C., Birnstiel M. Nature, 1968, 217, 649—650.
- Perlmann P. Exptl Cell Res., 1953, 5, 394—399.
- Pero R., Lima-de-Faria A., Stahle U., Granstom H., Ghatnekar R. Hereditas, 1973, 73, 195.
- Perry R. P., Cheng F.-Y., Freed J. J. 1970. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 65, 609—616.
- Petry W. H., Wyman A. R., Kafatos F. C. 1976. Developm. Biol., 49, 185—199.
- Pfohl R. J. Exptl Cell Res., 1965, 39, 496—503.
- Pfohl R. J. Developm. Biol., 1975, 44, 333—345.
- Piatigorsky J., Ozaki H., Tyler A. Developm. Biol., 1967, 15, 1—22.
- Piatigorsky J., Tyler A. Biol. Bull., 1967, 133, 229—244.
- Piatigorsky J., Tyler A. Developm. Biol., 1970, 21, 13—28.
- Piatigorsky J., Webster H. F., Craig S. P. Developm. Biol., 1972, 27, 176—189.
- Piko L. Developm. Biol., 1970, 21, 257—279.
- Piko L. In «Early Development Mammals». 2nd Sympos. Brit. Soc. Developm. Biol. Cambridge, 1975, p. 167—187.
- Piko L., Blair D. G., Tyler A., Vinograd J. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1968, 59, 838—845.
- Piko L., Chase D. G. J. Cell Biol., 1973, 58, 357—378.
- Piko L., Matsumoto L. Developm. Biol., 1976, 49, 1—10.
- Piko L., Tyler A., Vinograd J. Biol. Bull., 1967, 132, 68—90.
- Pinon H., Barat M., Dufresne C., Mounolou J. C. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1975, 65, 692—698.
- Poccia D. L., Hinegardner R. T. Developm. Biol., 1975, 45, 81.
- Portugal F. II. Mech. Ageing and Develop., 1972, 1, 23—32.
- Prives J. M., Paterson B. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 3208—3211.
- Puckett L. D., Snyder L. A. Biochem. Genet., 11, 1974, 249—260.
- Raff R. A., Colot H. V., Selvig S. E., Gross P. R. Nature, 1972, 235, 211—214.
- Raff R. A., Greenhouse G. A., Gross K. W., Gross P. R. J. Cell Biol., 1971, 50, 516—529.
- Raff R. A., Kaumeyer J. F. Developm. Biol., 1973, 32, 309—320.
- Raff R. A., Newrock K. M., Secrist R. D. Developm. Biol., 1975, 44, 369—374.
- Ranzi S. Année biol., 1957, 33, 523—550.
- Rao M. V. N., Prescott D. M. Exptl Cell Res., 1970, 62, 286—290.
- Raveh D., Friedlander M., Eyal-Giladi H. Exptl Cell Res., 1976, 100, 195—203.
- Reich E., Luch D. J. L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, 55, 1600—1607.
- Ribbert D., Bier K. Chromosoma, 1969, 27, 178—197.
- Rinaldi A. M., Monroy A. Developm. Biol., 1969, 19, 73—86.
- Rinaldi A. M., Parente A. Developm. Biol., 1976, 49, 260—267.
- Rinaldi A. M., Sconzo G., Albanese I., Ramirez F., Bavister B. D., Giudice G. Cell Differentiation, 1974, 3, 305—312.
- Ritossa F. M., Atwood K. C., Spiegelman S. Genetics, 1966, 54, 819—834.
- Ritossa F. M., Spiegelman S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1965, 53, 737—745.
- Robberson D. L., Kasamatsu H., Vinograd J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 737—741.
- Robberson D. L., Clayton D. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 3810—3814.
- Rochaix Y.-D., Bird A., Bakken A. J. Mol. Biol., 1974, 87, 473—487.
- Roeder R. G., Rutter W. J. Biochemistry, 1970b, 9, 2543—2553.
- Rogers E. M. J. Cell Biol., 1968, 36, 421—432.
- Rosbach M., Ford P. J. J. Mol. Biol., 1974, 85, 87—101.
- Rosbach M., Ford P. J., Bishop J. O. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 3746—3750.
- Roskam W. G., Tichelaar W., Schrim

- J., Gruber M., Ab G. Biochim. et biophys. acta*, 1976, **435**, 82—90.
- Roskam W. G., Gruber M., Ab G. Biochim. et biophys. acta*, 1976, **435**, 91—94.
- Ross J. J. Mol. Biol.*, 1976, **106**, 403—420.
- Rossi M., Augusti-Tocco G., Monroy A. Quant. Rev. Biophys.*, 1975, **8**, 43—119.
- Roth T. F., Porter K. B. J. Cell Biol.*, 1964, **20**, 313—332.
- Rott N. N., Sheveleva G. A. J. Embryol. and Exptl Morphol.*, 1968, **20**, 141—150.
- Rourke A. W., Heywood S. M. Biochemistry*, 1972, **11**, 2061—2066.
- Rubin G. M. J. Biol. Chem.*, 1973, **248**, 3860—3875.
- Rubinstein N., Chi J., Holtzer H. Exptl Cell Res.*, 1976, **97**, 387—393.
- Rudack D., Wallace R. A. Biochim. et biophys. acta*, 1968, **155**, 299.
- Ruderman J. V., Gross P. R. J. Cell Biol.*, 1973, **59**, 296a.
- Ruderman J. V., Gross P. R. Developm. Biol.*, 1974, **36**, 286—298.
- Russell D. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, **68**, 523—527.
- Russell D. H., Snyder S. H. Mol. Pharmacol.*, 1959, **5**, 253—262.
- Rutter W. J., Kemp J. D., Bradshaw W. S., Clark W. R., Ronzio R. A., Sanders T. G. J. Cell Physiol.*, 1968, **72**, 1—18.
- Rutter W. J., Pietet R. L., Morris P. W. Annual Rev. Biochem.*, 1973, **42**, 606—646.
- Ruzdizic S., Glišin V. Biochim. et biophys. acta*, 1972, **269**, 441—449.
- Sadgopal A., Kabat D. Biochim. et biophys. acta*, 1969, **190**, 486—495.
- Sagata N., Shiokawa K., Yamana K. Developm. Biol.*, 1976, **50**, 242—247.
- Sager R., Kitchin R. Science*, 1975, **189**, 426—447.
- Saito Z., Martin W. J., Cook W. H. Canad. J. Biochem.*, 1965, **43**, 1755—1770.
- Salzman N. P., Moore D. E., Mendelsohn J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1966, **56**, 1449—1456.
- Samarina O. P. In «Molecular Biology of Nucleocytoplasmic Relationships». Puiseux-Dao S. (Ed.). Amsterdam, Elsevier Co.*, 1975, p. 219—229.
- Santerre R. F., Rich A. Developm. Biol.*, 1976, **54**, 1—12.
- Sargent T. D., Raff R. A. Developm. Biol.*, 1976, **48**, 327—335.
- Sarkar P. K., Moscona A. A. Developm. Biol.*, 1971, **26**, 187—200.
- Sayles C. D., Browder L. W., Williamson J. H. Developm. Biol.*, 1973, **33**, 213—217.
- Scarano E., De Petrocellis B., Augusti-Tocco G. Biochim. et biophys. acta*, 1964, **83**, 174—176.
- Scarano E., Maggio R. Exptl Cell Res.*, 1959, **18**, 333—346.
- Scarano E., Rossi M., Geraci G. FEBS Sympos on Regulation of Enzyme Activity and Allosteric Interactions. E. Kvamme and A. Pihl (Eds). N. Y., Acad. Press*, 1968, p. 145—165.
- Schatz C. In «Molecular Biology of Nucleocytoplasmic Relationships», S. Puiseux-Dao (Ed.). Amsterdam — New York, Elsevier*, 1975, p. 157—169.
- Scheer U. Developm. Biol.*, 1973, **30**, 13—28.
- Scheer U., Trendelenburg M. F., Franke W. W. J. Cell Biol.*, 1976, **69**, 465—489.
- Schildkraut G. L., Marmur J., Doty P. J. Mol. Biol.*, 1962, **4**, 430—440.
- Schubert D., Tarikas H., Humphreys S., Heinemann S., Patrick J. Developm. Biol.*, 1973, **33**, 18—37.
- Schultz A. W. J. Exptl Zool.*, 1967, **166**, 347—354.
- Schultz G. A. Developm. Biol.*, 1975, **44**, 270—277.
- Schultz J. Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 1956, **21**, 307—328.
- Schwartz M. S. Developm. Biol.*, 1970, **23**, 241—260.
- Sconzo G., Albanese I., Rinaldi A. M., Lopresti G., Giudice G. Cell Differentiation*, 1974, **3**, 297—304.
- Sconzo G., Bono A., Albaneze J., Giudice G. Exptl Cell Res.*, 1972, **72**, 95—100.
- Sconzo G., Giudice G. Biochim. et biophys. acta*, 1971, **254**, 447—451.
- Sconzo G., Pirrone A. M., Mutolo V., Giudice G. Biochim. et biophys. acta*, 1970, **199**, 435—440.
- Sconzo G., Vitrano E., Bono A., Giovanni L. D., Mutolo V., Giudice G. Biochim. et biophys. acta*, 1971, **232**, 132—139.
- Scott J. F., Fraccastoro A. P., Taft E. B. Histochem. and Cytochem.*, 1956, **4**, 1—10.

- Seale R. L., Aronson A. L. J. Mol. Biol., 1973a, 75, 633—645.
- Seale R. L., Aronson A. L. J. Mol. Biol., 1973b, 75, 647—658.
- Selman G. G., Pawsey G. J. J. Embryol. and Exptl Morphol., 1965, 14, 191—212.
- Selvig S. E., Greenhouse G. A., Gross P. R. Cell Differentiation, 1972, 1, 5—14.
- Selvig S. E., Gross P. R., Hunter A. Developm. Biol., 1970, 22, 343—365.
- Sevaljevic L. Biochim. et biophys. acta, 1974, 335, 102.
- Shaklee J. B., Champion M. J., Whitt G. S. Developm. Biol., 1974, 48, 356—382.
- Sharma O. K., Mays L. L., Borek E. J. Biol. Chem., 1973, 248, 7622—7624.
- Shaver J. Exptl Cell Res., 1956, 11, 548—559.
- Sheiness D., Puckett L., Darnell J. E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 1077—1081.
- Shutt R. H., Kedes S. H. Cell, 1974, 3, 283.
- Siekevitz P., Maggio R., Catalano C. Biochim. et biophys. acta, 1966, 129, 145—156.
- Sierra J. M., Meier D., Ochoa S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 2693—2697.
- Silver D. J., Comb D. G. Exptl Cell Res, 1966, 43, 699—700.
- Silver D. J., Comb D. G. Developm. Biol., 1967, 16, 107—117.
- Simbonis S. S., McBride R. A. Developm. Biol., 1965, 12, 347—357.
- Simmel E. A., Karnofsky D. A. J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1961, 10, 59.
- Singer R. H., Penman Sh. J. Mol. Biol., 1973, 78, 324—334.
- Singh U. N. Exptl Cell Res., 1968, 53, 537—543.
- Siracusa G. Exptl Cell Res., 1973, 78, 460—462.
- Skea B. R., Nemeth A. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, 64, 795—802.
- Slater D. W., Slater J., Gillespie D. Nature, 1972, 240, 333—337.
- Slater D. W., Slater J., Gillespie D. H., Gillespie S. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1974, 60, 1222—1228.
- Slater D. W., Spiegelman S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, 56, 164—170.
- Slater D. W., Spiegelman S. Biochim. et biophys. acta, 1968, 166, 82—93.
- Slater D. W., Spiegelman S. Biochim. et biophys. acta, 1970, 213, 194—207.
- Slater J., Gillespie D., Slater D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 406—411.
- Slater J., Slater D. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 1103—1107.
- Smith K. D. J. Exptl Zool., 1967, 164, 393—406.
- Smith L. Methods Biochem. Anal., 1955, 2, 427—435.
- Smith L. D., Ecker R. E. Developm. Biol., 1969, 19, 281—309.
- Smith L. D., Ecker R. E. Current Topics Developm. Biol., 1970, v. 5, 1.
- Smith L. D., Ecker R. E., Subtelny S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, 56, 1724—1728.
- Smith R. L., Forrest H. S. Developm. Biol., 1973, 33, 123—129.
- Sofer W. H., George J. F., Iverson R. M. Science, 1966, 153, 1644—1645.
- Solomon J. Biochim. et biophys. acta, 1957a, 23, 211.
- Solomon J. Biochim. et biophys. acta, 1957b, 24, 584—591.
- Sommerville J. J. Mol. Biol., 1973, 78, 487—503.
- Sonenshein G. E., Geognegan T. E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, 73, 3088—3092.
- Southern E. M. Nature, 1970, 227, 795—798.
- Speirs J., Birnstiel M. J. Mol. Biol., 1974, 87, 237—256.
- Spiegel M., Ozaki H., Tyler A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1965, 21, 135—140.
- Spiegel M., Spiegel E. S., Meltzer P. S. Developm. Biol., 1970, 21, 73—86.
- Spirin A. S. Current Topics Developm. Biol., 1966, 1, 2—38.
- Spirin A. S. Europ. J. Biochem., 1969, 10, 20—35.
- Spirin A. S., Nemer M. Science, 1965, 150, 214—217.
- Spooner B. S., Walther B. T., Rutter W. J. J. Cell Biol., 1970, 47, 235—246.
- Stearns L. W. Sea urchin development. Dowden, Hutchinson Ross Inc., Stroudsburg Pennsylvania, 1974.
- Stavy L., Gross P. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, 57, 735—742.
- Stavy L., Gross P. R. Biochim. et biophys. acta, 1969, 182, 193—202.
- Steinert M. Bull. Soc. chim. biol., 1951, 33, 549—554.
- Steinert M., Van Gansen P. Exptl Cell Res., 1971, 66, 355.

- Stewart J. A., Papaconstantinou J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, 58, 95—102.
- Storti R. V., Rich A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, 73, 2346—2350.
- Strom Ch. M., Dorfman A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, 73, 3428—3432.
- Stubblefield E., Klevecz R., Deaven L. J. Cell Physiol., 1967, 69, 345—354.
- Sugino Y., Sugino N., Okazaki R., Okazaki T. Biochim. et biophys. acta, 1960, 40, 417—424.
- Swanson R. F., Dawid J. B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, 66, 117—124.
- Swift H., Kleinfeld R. Physiol. Zool., 1953, 26, 301—311.
- Sy J., McCarty L. Biochim. et biophys. acta, 1970, 199, 86—94.
- Sze L. C. J. Exptl Zool., 1953, 122, 577—601.
- Tartof K. D. Science, 1970, 171, 58—61.
- Tata J. R. In «Biochemical Actions of Hormones», v. 1. G. Litwack (Ed.). N. Y., Acad. Press, 1970, p. 89—133.
- Tata J. R. In «Hormones in Development», v. I. M. Hamburgh (Ed.), 1971a, p. 19—41.
- Tata J. R. In «Control Mechanism of Growth and Differentiation». Cambridge, Univ. Press, 1971b, p. 163—181.
- Tata J. R. Cell, 1976, 9, 1—14.
- Telfer W. H. Annual Rev. Entomol., 1965, 10, 161—184.
- Telfer W. H., Melins M. E. Amer. Zoologist, 1963, 3, 185.
- Teng C. S. Biochim. et biophys. acta, 1974, 366, 385—395.
- Terman S. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, 65, 4, 985—992.
- Terman S. A., Gross P. R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1965, 21, 595—600.
- Thaler M. M., Cox M. C. L., Villee C. A. J. Biol. Chem., 1970, 245, 1479—1483.
- Theriault Y., Landesman R. Cell Differentiation, 1974, 3, 249—257.
- Thomas Ch. Arch. biol. Liège, 1967, 78, 6, 347.
- Thomas Ch. J. Embryol. and Exptl Morphol., 1969, 21, 165—167.
- Thomas Ch. Biochim. et biophys. acta, 1970, 224, 99—113.
- Thomas Ch. Exptl Cell Res., 1972, 74, 547—551.
- Thomas R. J. J. Embryol. and Exptl Morphol., 1968, 19, 203—215.
- Thornton V. F., Evernett P. J. Gen. and Compar. Endocrinol., 1969, 13, 268—274.
- Timojeeva M. Ya., Solovjeva I. A. FEBS Letters, 1973, 33, 327—330.
- Timourian H. Developm. Biol., 1967, 16, 594—611.
- Timourian H., Watchmaker G. Developm. Biol., 1970, 23, 478—491.
- Tobler H., Smith K. D., Ursprung H. Developm. Biol., 1972, 27, 190—203.
- Tocchini-Valentini G. P., Crippa M. In «Le petit Colloq. on Biologie and Medicine». L. Silvestry (Ed.). Amsterdam, North Holland, 1971, v. 2, p. 237—240.
- Tocchini-Valentini G. P., Mahdavi V., Brown R., Crippa M. Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1973, 38, 551—558.
- Trams E. G., Lauter C. J., Koval G. J., Ruzdijic S., Glišin V. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1974, 147, 171—176.
- Tschudy D. P., Marver H. S., Collins A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1965, 21, 480—488.
- Tsien H. C., Wattiaux J. M. Nature New Biol., 1971, 230, 147—148.
- Tung T. C., Tung Y. F. Y. Proc. Zool. Soc. London, 1944, 114, 46—64.
- Tupper J. T. Developm. Biol., 1973, 32, 140—154.
- Tupper J. T. Developm. Biol., 1974, 38, 332—345.
- Turkington R. W., Majumder G. C. J. Cell Physiol., 1974, 85, 495—508.
- Turner D. C., Gmür R., Leberherz H. G., Siegreist M., Wallimann T., Eppenberger H. M. Developm. Biol., 1976, 48, 284—307.
- Tyler A. Developm. Biol., 1967, Suppl. I, 170—226.
- Tyler A., Piatigorsky J., Ozaki H. Biol. Bull., 1966, 131, 204—217.
- Vacquier V. D. Developm. Biol., 1971, 26, 1—10.
- Vacquier V. D., Lorh J., Epel D. Developm. Biol., 1971, 26, 393—399.
- Vacquier V. D., Tegner M. J., Epel D. Exptl Cell Res., 1973, 80, 111—119.
- Van Blerkom J., Manes C. Developm. Biol., 1974, 40, 40—51.
- Van den Biggelaar J. A. M. Exptl Cell Res., 1971, 67, 207—210.
- Van de Kerckhove D. Nature, 1959, 183, 329.
- Van Gansen P., Thomas G., Schram A. Exptl Cell Res., 1976, 98, 111—119.

- Vanyushin B. F., Kirnos M. D. FEBS Letters, 1974, 39, 195—199.
- Vanyushin B. F., Kiryanov G. I., Kudryashova I. B., Belozersky A. N. FEBS Letters, 1974, 15, 313—316.
- Vaughn L. C., Thomson L. A. J. Cell Biol., 1972, 52, 322—337.
- Vendrelly C., Vendrelly R. Compt. rend. Soc. biol., 1949, 143, 1386.
- Vertel B. M., Fischman D. A. Developm. Biol., 1976, 48, 438—446.
- Vincent W. S., Halvorson H. O., Chen H. R., Shin D. Biol. Bull., 1968, 135, 441.
- Vorob'ev V. I., Kosjuk G. N. FEBS Letters, 1974, 46, 43—46.
- Wahrmann J. P., Luzzati D., Winand R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1973, 52, 576—581.
- Wainwright S. D., Wainwright L. K. Canad. J. Biochem., 1972, 50, 1165—1173.
- Wainwright S. D., Wainwright L. K., Tsay H. M. Canad. J. Biochem., 1972, 50, 1158—1164.
- Walker P. M. B. Progr. in Biophys. 1972, 23, 147—190.
- Wallace H., Morray J., Langridge H. R. Nature New Biol., 1971, 230, 201—203.
- Wallace R. A. Developm. Biol., 1961, 3, 486—515.
- Wallace R. A., Bergink E. W. Amer. Zoologist, 1974, 14, 1159—1175.
- Wallace R. A., Dumont J. N. J. Cell Physiol., 1968, 72 (Suppl. 1), 73—90.
- Wallace R. A., Jared D. W. J. Cell Biol., 1976, 69, 345—351.
- Wang K.-M. Compar. Biochem. Physiol., 1968, 27, 33—50.
- Ward R. T. J. Cell Biol., 1962, 14, 309—341.
- Watson-Coggins L., Gall J. G. J. Cell Biol., 1972, 52, 569—576.
- Webb A. C. Anat. Rec., 1976, 184, 285—300.
- Webb A. C., LaMarca N. Y., Smith L. D. Developm. Biol., 1975, 45, 44.
- Weber C. S., Rutter W. J. Federat. Proc. Amer. Soc. Exptl Biol., 1964, 23, 487.
- Wegnez M., Denis H. Biochimie, 1972, 54, 1069—1072.
- Wegnez M., Monier R., Denis H. FEBS Letters, 1972, 25, 13—19.
- Weinberg E. S., Birnstiel M. L., Purdom I. F., Williamson R. Nature, 1972, 240, 225—228.
- Weinberg R. A., Penman S. J. Mol. Biol., 1968, 38, 289—304.
- Weinhold P. A., Rethy V. B. Biochim. et biophys. acta, 1972, 276, 143—154.
- Weinsberg E. S., Overton G. Ch., Shutt R. H., Reeder R. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 4815—4819.
- Wellauer P. K., Reeder R. H. J. Mol. Biol., 1975, 94, 151—161.
- Wensink P., Brown D. D. J. Mol. Biol., 1971, 60, 232—247.
- Wessbach A. Cell, 1975, 5, 101—108.
- Wessels N. K., Cohen I. H. Developm. Biol., 1967, 15, 237—270.
- Westin M. J. Exptl Zool., 1969, 171, 297—304.
- Westin M. J. Exptl Zool., 1972, 179, 207—214.
- Westin M. J. Exptl Zool., 1975, 192, 307—314, 315—322.
- Westin M., Perlman P. Exptl Cell Res., 1972, 72, 233—239.
- Westin M., Perlman H., Perlman P. J. Exptl Zool., 1967, 166, 331—345.
- White B. N., Tener G. M., Holden J., Suzuki D. T. Developm. Biol., 1973, 33, 185—195.
- Whiteley A. H., McCarthy B. J., Whiteley H. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, 55, 519—525.
- Wilkins M. H. F. Science, 1963, 140, 941—950.
- Wilson D. A., Thomas C. A., Jr. J. Mol. Biol., 1974, 84, 115—144.
- Wilson E. B. The Cell in Development and Heredity. N. Y., MacMillan, 1928.
- Wilt F. H. Developm. Biol., 1964, 9, 299—313.
- Wilt F. H. Adv. in Morphogen., 1967, 6, 89—125.
- Wilt F. H. Developm. Biol., 1970, 23, 444—455.
- Wilt F. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 2345—2349.
- Wilt F. H., Hultin T. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1962, 9, 313—317.
- Wilt F. H., Mazia D. Develop. Biol., 1974, 37, 422—424.
- Winesdorfer J. Amer. Zool, 1965, 5, 635.
- Wittliff J. L., Kenney F. T. Biochim. et biophys. acta, 1972a, 269, 485—492.
- Wittliff J. L., Kenney F. T. Biochim. et biophys. acta, 1972b, 269, 493—509.
- Wolfson J., Dressler D., Magazin M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 499—504.

- Wolstenholme D. R., Dawid J. B. J.* Cell Biol., 1968, 39, 222—228.
- Woodland H. R., Graham C. F.* Nature, 1969, 221, 327—332.
- Woodland H. R., Gurdon J. B.* Developm. Biol., 1969, 20, 80—104.
- Woodland H. R., Gurdon J. B., Lingrel J. B.* Developm. Biol., 1974, 39, 134—140.
- Woodland H. R., Pestell R. Q. W.* Biochem. J., 1972, 127, 597—605.
- Woods P. S., Taylor J. H.* Proc. Xth Intern. Congr. Genetics, 1958, v. 2, 320.
- Wright D. A., Moyer F. H. J.* Exptl Zool., 1966, 163, 215—230.
- Wright D. A., Shaw Ch. R.* Genetics, 1970, 4, 385—394.
- Wright D. A., Subtelny S.* Developm. Biol., 1971, 24, 119—140.
- Yamada T.* In «Morphol. and Biochem. Aspects of Cytodiff.», (S. Karger Basel/N. Y.), 1967, p. 77—89.
- Yoshida K., Katoh A.* Exptl Cell Res., 1972, 71, 361—371.
- Young B. D., Birnie G. D., Paul J.* Biochemistry, 1976, 15, 2823—2829.
- Young P. G., Zimmerman A. M.* Developm. Biol., 1973, 33, 196—205.
- Young V. R.* In «Mammalian Protein Metabolism», v. IV. H. Munro (Ed.). N. Y., Acad. Press, 1970, p. 586—660.
- Yudin A. L., Neyfakh A. A.* Exptl Cell Res., 1973, 82, 210—214.
- Zalokar M.* Developm. Biol., 1976, 49, 425—437.
- Zamboni L., Gondon B. J.* Cell Biol., 1968, 36, 276—282.
- Zampetti-Bosseler F., Huez G., Brachet J.* Exptl Cell Res., 1973, 78, 383—393.
- Zeikus J. G., Taylor M. W., Buck C. A.* Exptl Cell Res., 1969, 57, 74—78.
- Zeitz L., Ferguson R., Garfinkel E.* Exptl Cell Res., 1969, 56, 158—163.
- Zeuthen E.* Pabbl. Staz. Zool. Napoli Suppl., 1951, 23, 47.
- Zimmerman A. M.* Exptl Cell Res., 1963, 31, 39—45.
- Zwaan J. J.* Cell Physiol., 1968, 72, Suppl. I, 47—72.
- Zylber E., Penman Sh.* J. Mol. Biol., 1969, 46, 201—206.

ОГЛАВЛЕНИЕ

От авторов	3
Введение в эмбриологию	5
Принципы развития /5/ Оогенез и сперматогенез /6/ Оплодотворение /8/ Деление дробления яйца /10/ Гастрюляция /11/ Органогенез /13/	
Введение в молекулярную биологию	16
ДНК /16/ РНК /21/ Белки /26/	

Глава первая

ДНК /31—70/

ДНК в яйце	31
Содержание ДНК в яйце /36/ Ядерная ДНК /38/ ДНК митохондрий /39/ ДНК желтка /45/	
Синтез ДНК в оогенезе	47
Ядерная ДНК ооцита /47/ ДНК свободных ядрышек ооцита /48/ Амплификация рДНК /52/ Механизм амплификации рДНК /56/ Судьба ядрышковой ДНК в оогенезе /59/ Синтез митохондриальной ДНК в оогенезе /60/	
Синтез ДНК в эмбриогенезе	63
Синтез ядерной ДНК /63/ Синтез митохондриальной ДНК /66/ Изменение содержания ДНК в эмбриогенезе /67/	

Глава вторая

РНК /71—185/

РНК в оогенезе	72
Содержание РНК в яйце /72/ Накопление РНК в оогенезе /77/ Источники накопления РНК /79/ Синтез транспортных РНК /81/ Синтез 5 рРНК /84/ Синтез 28 и 18 рРНК /86/ Синтез информационной РНК /89/ Образование рибонуклеопротеидных комплексов /96/	
РНК в эмбриональном развитии	101
Начало ядерного синтеза РНК /101/ Порядок синтеза различных типов РНК /107/ Митохондриальная РНК /116/ Другие виды РНК /119/	

Принципы методов определения видов синтезируемой РНК /120/ Амфибии /124/ Морской ёж /130/ Рыбы /137/ Млекопитающие /141/ Накопление мРНК специфических белков в специализирующихся клетках /146/

Глава третья

Б Е Л О К

/186—286/

Белки в оогенезе	190
Образование желтка /190/ Синтез белков ооцита /195/ Использование желтка в ходе развития /202/	
Белки в эмбриогенезе	204
Синтез белка в начале развития /204/ Скорость синтеза белка /214/ Состав синтезируемых белков /221/ Ядерные белки /231/	
Синтез тканеспецифических белков	241
Коллаген /241/ Сократительные белки /242/ Кристаллины /246/ Гемоглобины /249/ Тубулин /252/ Белки хориона яйца /254/	
Активность ферментов	255
Активность ферментов во время оплодотворения /260/ Активность ферментов в раннем развитии морского ежа /262/ Активность ферментов в ходе развития амфибий /266/ Активность ферментов в развитии рыб и других животных /270/ Активность ферментов в дифференцирующихся тканях /275/	
Заклучение	287
Литература	290

*Александр Александрович Нейфаз,
Маргарита Яковлевна Тимофеева*

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ ПРОЦЕССОВ РАЗВИТИЯ

Утверждено к печати Институтом молекулярной биологии Академии наук СССР

Редактор издательства Г. В. Красильникова. Художник Н. П. Фролов
Художественный редактор И. К. Капралова. Технический редактор Ю. В. Рылина.
Корректор Р. А. Тютина

Сдано в набор 23/III 1977 г. Подписано к печати 27/VII 1977 г. Формат 60×90^{1/16}.
Бумага № 1. Усл. печ. л. 19,5. Уч.-изд. л. 22,2. Тираж 4000. Т-12956. Тип. зак. 2027.
Цена 2 р. 22 к.

Издательство «Наука». 117485, Москва, Профсоюзная ул., 94а
2-я тип. издательства «Наука». 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 10