

Фундаментальный пробел в фундаментальной биологии

В. А. Кордюм, В. И. Андриенко, О. А. Маслова, Н. С. Шувалова, Д. М. Иродов,
Т. А. Рубан, Е. М. Сухорада, Л. И. Лихачева, С. П. Шпилевая

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680

kordium@imbg.org.ua

Ставится проблема внутриклеточной пространственно-временной организации метаболизма, сигналинга и энергетического обеспечения этих процессов. Для функционирования клетки ферменты метаболических цепей, молекулы сигнальных путей, макроэрги (как единицы молекулярных взаимодействий, сопровождающихся поглощением энергии) должны находить своих партнеров и пространственно-прецизионно размещаться. Существующие представления основаны на идеях компартиментализации всех этих процессов в виде локальных участков мембраны клеточного матрикса, на которых происходят отдельные этапы различных циклов. Сборка комплексов макромолекул в требуемом количестве и сочетаниях для их адекватного функционирования в пространстве клетки в самом общем виде описывается как внутриклеточный транспорт везикул, осуществляемый подвижными элементами цитоскелета. А внутри везикул расположен «полезный груз» – макромолекулы. Мембраны таких везикул сливаются с определенными участками мембран матрикса и таким способом перемещают макромолекулы. Любые расчеты и любые допущения не позволяют на подобной основе объяснить прецизионные формирования ферментных цепей, их взаимодействие, сигналинг и т. д. Такой транспорт макромолекул (внутри везикул) обеспечивает решение иных задач. Для объяснения поиска партнеров, формирования цепей и комплексов, образования компартиментов предлагается и обосновывается концепция поисково-адресных систем доставки в виде сканирующих пространство клетки микровезикул. Они собирают на своей поверхности соответствующие цепи ферментов, участков сигналинга, их взаимодействия. Такие микровезикулы и являются компартиментами, обеспечивающими и прецизионность процессов, и их взаимодействие.

Ключевые слова: метаболизм, клетка, компартиментализация, везикула, транспорт макромолекул, прецизионность процессов.

На заре развития молекулярной биологии существовал юмористический лозунг: «От ложного знания к истинному незнанию!» При всей своей кажущейся несерьезности он очень точно отображал состояние науки и жизни в то время. Нечто подобное можно экстраполировать и на современную фундаментальную биологию. Не в смысле того, что наши знания неправильные или их мало. Прогресс идет

гигантский, более того, с постоянным ускорением. Открываются новые явления, новые процессы, новые функции и т. д. Количество экспериментального материала зашкаливает за пределы возможностей его полной обработки (не говоря уже об осмыслении). И по фону всего этого с предельной ясностью выступает парадокс развиваемого уровня познания.

По мере накопления информации о клетке (от экспериментов до глобальных идей) – центральной

единице всего живого на планете Земля – реальная работа реальной клетки (т. е. согласованная совокупность процессов, протекающих в ней в пространстве и времени) становится все менее понятной. Более того, любая попытка представить себе, как все это может выполняться в клетке, неизбежно приводит к абсолютно очевидному выводу о невероятности такового. Проанализируем это конкретно – посмотрим на клетку «как она есть на самом деле».

Изучение клетки исторически происходило так, что возник критический пробел. Развитие микроскопической техники привело к почти исчерпывающему описанию клетки и ее структур. Но для этого клетки необходимо было фиксировать, так как при анализе живого материала разрешение при микроскопии оказывалось очень низким. И вся цитология – это мгновенный срез структурной организации объекта исследований. Такое изучение позволило реконструировать клетку, но тоже в мгновенном срезе. Предметом биохимических исследований, наоборот, являлись процессы – ферментативные реакции, циклы метаболизма, этапы биосинтеза, энергетика и пр. И постепенно вырисовывалась функциональная картина, апофеозом которой стала полноразмерная карта метаболизма.

К области молекулярной биологии, опять же в силу исторических причин, как и раньше, во время ее становления, относится детальное изучение структуры макромолекул, их пространственной организации и ее динамики, взаимодействия макромолекул, изменения пространственной структуры при разных взаимодействиях и т. д. Понятие клетки усложнилось, появились представления о регуляции, сигнальных цепях, циклах, разрозненные процессы объединили в функционально единые сигнально-метаболические оси. Открытие мира низкомолекулярных РНК еще более разнообразило картину жизни клетки.

С развитием методов молекулярной генетики стало возможным выявлять информационно-феноменологические последовательности процессов. А генные технологии позволили воплотить все это в производство нужных продуктов. И поскольку все это не только изучалось, но и адекватно экспериментально воспроизводилось и промышленно реализовывалось, все сводилось к накоплению новых данных,

компьютерному моделированию, конструированию нужных молекул, введению их в клетки и анализу происходящих при этом событий. А там все, как и должно было быть, происходило «само собой».

В результате выпало из внимания самое главное – то звено, которое было определено термином «само собой». Это «само собой» и не изучалось, так как «само собой» происходило. А означало оно нечто основополагающее – пространственно-временную организацию всех процессов.

Первое, что стало понятным в смысле «просто так быть не может», – это организация процессов метаболизма [1]. Вообще-то достаточно посмотреть на карты метаболизма, их отдельные цепи, сопряжения цепей, чтобы возник очевидный вопрос – а как это может реализоваться в клетке? От такого вопроса уходили общими ответами вроде того, что в клетке все компартментализовано, в каждом компартменте все «свое», сопряжение идет через контакты компартментов и т. д. [2]. Затем появилась «детализация» типа того, что ферменты не плавают даже в компартментах, а закреплены на мембранах и не вообще, а так, чтобы образовались циклы. Наконец, когда измерили кинетику процессов, уровень реакционной способности промежуточных продуктов, просчитали вероятность событий, то стало понятно, что никакие компартменты, никакие закрепления в рамках имеющихся представлений ничего не решают – все в клетке за счет абсолютно необходимого метаболизма мгновенно, за секунды превратится в хаос всеразрушающих реакций. И тогда, чтобы объяснить отсутствие хаоса, ввели некое условие функционирования всех необходимых метаболических цепей и их сопряжений. Согласно ему, все ферменты в циклах (любой степени сложности, разветвленности, сопряжения и т. д.) получают от предыдущего фермента цепи обработанный им промежуточный продукт метаболизма и, соответственно, передают свой промежуточный продукт последующему ферменту, тоже строго «из рук в руки», т. е. точно из активного центра одного фермента непосредственно в активный центр другого [3]. Никаких, даже гипотетических, механизмов (но не «вообще», а подтвержденных если не экспериментально, то хотя бы теоретическими расчетами расстояний между активными центрами,

скоростей реакций, размещений молекул ферментов цепи и т. д.), объясняющих, как такое может происходить, не существует. Более того, любые расчеты показывают, что, согласно имеющимся представлениям, такое не может быть даже гипотетически. Но иначе – хаос. А в реальной клетке его нет. Значит, механизм «из рук в руки» существует, только мы о его организации в пространстве и динамике никакого понятия не имеем.

Следующим элементом процессов является энергетика. Образующиеся при всевозможных реакциях промежуточные продукты – различные радикалы, пероксиды, молекулы, содержащие напряженные связи, и т. д., полностью всеразрушающи. Количество их колоссальное. Для того чтобы не происходило мгновенного саморазрушения, прецизионность сопряжения всех процессов должна приближаться к теоретически абсолютной. Так оно в клетках и происходит. Но даже нарисовать такое с соблюдением скоростей всех процессов, пространственных совмещений, четкости происходящего и т. д. в терминах расстояний (ангстремах и их десятых) и временных параметрах индивидуальных процессов (милли- и микросекундах) не удастся категорически. Не удастся потому, что в каждом цикле индивидуальных процессов много. И согласовать реально происходящее сопряжение при переходе на реальные размеры, расстояния, время при каждой отдельной ферментативной реакции и всего цикла в рамках существующих представлений невозможно. Рисуют кубики, кружочки, треугольники (как на детских картинках) или моделируют химические реакции, обусловленные ферментами, и серьезно утверждают, что так оно в клетке «на самом деле» и работает.

Наконец, дошло дело до регуляции. Всеми процессами клетка как-то управляет. Все процессы в ней взаимосогласованны. Выяснение, «как» это осуществляется, привело к установлению сложнейших сигнальных цепей и каскадов, охватывающих всю клетку и все в ней происходящее [4]. Цепей с направленностью процессов линейных, организованных в каскады, теперь уже на уровне взаимодействующих каскадов, усиливающих и отменяющих уже идущие сигналы и т. д. Здесь даже абстрактного представления «из рук в руки» недостаточно.

Стоит лишь посмотреть на них, а потом спроецировать на карты метаболизма и энергетике и мысленно или компьютерно (*in silico*) внести в клетку, как станет даже не смешно от допущения того, что все это может строго, четко, точно, неограниченно долго надежнейшим образом «само собой» функционировать. А тут еще «подросли» низкомолекулярные РНК, которые дополнительно все контролируют, регулируют, проверяют и обеспечивают. На уровне абстрактных взаимодействий «молекула–молекула» такое рисуют. И даже как-то рассчитывают. В пробирках – в системе *in vitro* – доказывают экспериментально. Вводя отдельных их представителей (определенные гены, белки, РНК) в клетки, получают отдельные (и адекватные) эффекты. «Само собой» работает безотказно. Но в исследованиях это «само собой» вообще опускают, молчаливо исповедуют по принципу «черного ящика»: ввели–получили, ибо спроецировать такое на реальную клетку в ее реальных измерениях пространства и времени даже не пытаются. А их, все эти сигнальные цепи, каскады, микроРНК, в свою очередь, тоже как-то необходимо регулировать: время образования, последовательность взаимодействия, локализацию, количество и т. д.

Функционируют же и реализуются все эти циклы и каскады в клетке не как сумма единичных макромолекул, а как комплексы, состоящие из многих (часто десятков) отдельных макромолекул [5]. А сами эти комплексы во многих случаях (если не в большинстве) лабильные, переформирующиеся. В каждом комплексе свой состав макромолекул, их надо выбрать из синтезирующегося пула, собрать по всей клетке (где они синтезируются), правильно сориентировать в пространстве, как-то локализовать в нужном месте и в нужное время. Если соотнести теперь размер молекулы сигнальных каскадов и расстояния, которые они должны пройти, чтобы обеспечить регуляцию, то невозможность такового за счет «само собой» становится очевидной (рис. 1). Все это «само собой» пока даже не то, что не изучается, а даже не обсуждается. И получается, что вся молекулярная биология – это реально статика. Реальную динамику изучают только на уровне конформационных переходов отдельных макромолекул или их комплексов, уже «готовых»,

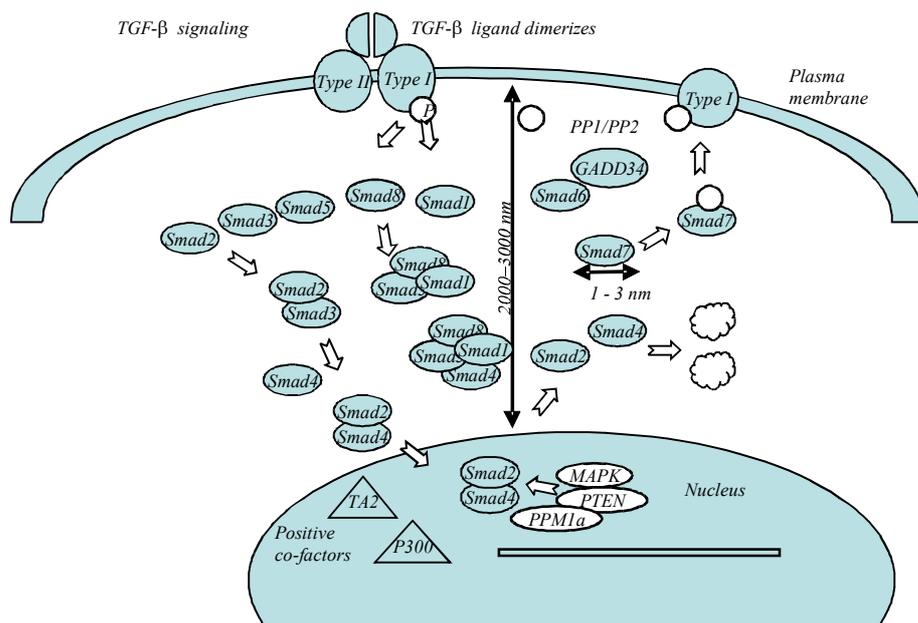


Рис. 1. Соотношение размеров и расстояний в клетке (урощенная схема TNF-β сигналинга)

собранных воедино всех составляющих. Но и для них непонятно, как они все вместе правильно собираются. Ведь даже если допустить их присутствие в микрообъеме уже в готовом качественном и количественном составе, то как из случайного взаиморасположения и случайной ориентации правильно образуются такие комплексы? И все вместе взятые геномика, протеомика, метаболомика, регуломика ни в принятых концептуально схемах, ни в поставленных согласно этим схемам экспериментах, ни *in silico* по сути существующих представлений, принципиально, фундаментально (в рамках этих представлений) не решают (и не могут решить) проблемы жизни клетки, сколько бы еще новых данных ни накапливалось. В конце концов исчерпывающе выяснят, из чего именно состоит клетка, какие в ней имеются макро- и иные молекулы, какие циклы, цепи, каскады в них есть и из каких макромолекул все состоит. Но все это будет статика, как склады готовой продукции, собранных узлов и даже (когда-нибудь) всего «изделия» – клетки. Это только усилит понимание масштабов неизбежного хаоса, как только «все» начнет функционировать. «Готовое» быстро разрушается и требует замены (самообновления), но как это происходит в пространстве и времени – непонятно.

Очень сложно обстоит проблема «субстрата», в котором находятся макромолекулы клетки. Фор-

мально воды в клетках млекопитающих (в том числе и человека) много. Но, скорее всего, практически вся она структурирована, т. е. адсорбирована, как бы «закреплена» на макромолекулах. Хотя определение скорости распространения в клетке и макро-, и мелких молекул («константы диффузии») показывает вполне измеряемые величины, они по своим количественным значениям ничего не объясняют. Отметим также, что эти данные получены только на активно метаболизирующих клетках. Для покоящихся клеток подобных измерений нет (или их не проводили, или они не давали «корректных результатов»). И о механизмах такого перемещения молекул (там, где его наблюдали в активно метаболизирующих клетках) данных тоже нет. А сам термин «диффузия» и механизмы процесса, определяемого таким термином, перенесены из физики «в чистом виде».

Спроецируем теперь имеющиеся в ней процессы на клетку с ее динамичностью и «константами диффузии» макро- (и иных) молекул. При скоростях всех этих процессов и перемещениях образующихся при этом продуктов (согласно «константам диффузии») хаос, за секунды превращающий клетку в аутомикрогомогенат, становится буквально наглядным. И это не «общие соображения». Это подтверждается конкретными расчетами на основе экспериментальных данных. Согласно имеющимся

оценкам, полученные величины можно следующим образом представить на примере коэффициента диффузии БСА (молекулярная масса (м. м.) 68000 кДа), меченного флюоресцеином, $\cdot 10^{-8}$ см²/с [6]:

В клетках фибробластов, 5 °С	0,3
В клетках фибробластов, 22 °С	1,0
В клетках фибробластов, 37 °С	1,6
В клетках фибробластов, предварительно обработанных колхицином, 5 °С	1,1
В 61 %-м растворе сахарозы, 30 °С	1,0
В буфере, 20 °С	68,0

А что произойдет далее, согласно представлениям о перемещении молекул в клетке «самих по себе», наглядно иллюстрируют такие расчеты:

1 нм = 10 Å; 10^{-8} см в секунду – это 0,1 нм (или 1 Å) за 1 с. При $t = 37$ °С коэффициент диффузии БСА в фибробластах равен $1,6 \cdot 10^{-8}$ см²/с. Это путь в 0,16 нм (или 1,6 Å) за 1 с. При среднем диаметре молекулы белка 20 Å (это 2 нм) за 1 с он переместится на 0,08 Å своего диаметра.

Для небольшой молекулы (флюоресцеин, м. м. = 374 Да) вычислен коэффициент диффузии $> 4 \cdot 10^{-8}$ см²/с. Это > 4 Å за 1 с. Если принять за некое среднее скорость обработки субстрата в цепях метаболизма за 100 оборотов в секунду (это один оборот за 0,01 с), то за это время субстрат преодолеет расстояние, несколько большее, чем 0,04 Å, а за 1 с – на > 4 Å. При таких скоростях вокруг активных центров ферментов, которыми оканчиваются цепи, образуются скопления их продуктов.

А белкам, чтобы собраться в цепи, потребуются многие сутки. Спроецируем теперь это на энергетику. Примем массу исходной средней клетки 10^9 г. Это при удельной массе, равной единице (1 г/мл), составит объем 1000 мкм³. Примем также, что в такой усредненной клетке содержится 10^9 макромолекул, обладающих ферментативной активностью. Для оценки правдоподобности сделанного допущения проверим, что получится. При средней молекулярной массе белка 50 кДа суммарная масса их числа 10^9 составит $8,3 \cdot 10^{-11}$ г, что соответствует вполне приемлемой части от принятой массы средней клетки (8,3 % ее массы). При сред-

ней скорости ферментативных реакций 100 циклов за 1 с в пересчете на 1 сут это отвечает $8,64 \cdot 10^{15}$ молекулам продуктов таких реакций. Это следует из расчета: 100 (циклов за 1 с) \cdot 86400 (количество секунд в 1 сут) \cdot 10^9 (количество молекул с ферментативной активностью в клетке) = $8,64 \cdot 10^{15}$. Подавляющее большинство ферментативных реакций в клетке являются промежуточными в различных циклах. Все они обладают высокой реакционной способностью и должны немедленно пройти дальнейший путь преобразований. При средней массе метаболита 34 Да (это м. м. пероксида водорода) в принятой средней клетке за 1 сут образуется примерно $487,6 \cdot 10^9$ г метаболитов – почти в 500 раз больше самой клетки принятых размеров (массой 10^9 г и объемом 1000 мкм³). Это подтверждается расчетом: 34 (м. м. условного промежуточного метаболита, Да) \cdot $1,66 \cdot 10^{-24}$ (масса 1 Да, переведенная в граммы) \cdot $8,64 \cdot 10^{15}$ (количество условных промежуточных метаболитов) = $487,6 \cdot 10^9$.

Конечно же, это все в динамике – непрерывном преобразовании. Но в сумме, т. е. посчитав все, что образовалось и просуществовало, пока не преобразовалось далее по циклу, такая величина действительно имеет место. К чему это приведет при организации перемещения всех участников событий «само собой», без обеспечения всех событий специальными механизмами, не требует обсуждения. И по всем «существующим представлениям», такая клетка ни возникнуть, ни существовать категорически не может. А клетка «на самом деле» живет и функционирует с высочайшей точностью, надежностью и эффективностью.

Чтобы от общих фраз (типа «белки находят своих партнеров») перейти к попыткам (хотя бы попыткам) найти, идентифицировать, предугадать реальные механизмы пространственно-временного выполнения клеточных процессов, сформируем те условия, при которых такие механизмы смогут действовать. Это адресное пространственно-временное перемещение макромолекул, целевой пространственно-временной поиск партнеров функциональных комплексов, собирание их в нужной (для выполнения ими функций) номенклатуре, доставка к «месту назначения» и это все – в реальном масштабе времени. Наконец, регуляторные каскады,

тоже собранные, взаимно пространственно расположенные, последовательно и в пересечениях между собой, нужно (тем же механизмом или набором необходимых механизмов) в пространстве и времени спроецировать на собранные и взаимно расположенные ферменты метаболических цепей (или соответствующие гены, если мишенью являются они) для того, чтобы регуляция их регулировала. И делать это все надо непрерывно в течение всей жизни клетки. Или, что, по-видимому, более адекватно, – в активном ее состоянии. Если исходить из существующей терминологии («внутриклеточный транспорт», «транспортные средства», «внутриклеточная сортировка белков», «доставка», «компарменты» и т. д.), то следует отметить, что она, терминология, вроде бы, включает определения соответствующих механизмов. Но по сути такие определения, как правило, относят к принципиально иным процессам и явлениям.

Исторически сложилось так, что первым ключевым звеном в выяснении механизма «внутриклеточной сортировки белков» стало открытие лидерного пептида [7]. Многие белки синтезируются с дополнительной аминокислотной последовательностью на N-конце. Эта последовательность специфически узнает мембраны внутриклеточных органелл, сорбируется на них, проводит через мембраны всю молекулу белка и отщепляется специализированными мембраносвязанными ферментами. Так формируется нужный для функций органелл состав белков [8]. Кроме того, подобно образуются и выводимые из клетки продукты [9]. При этом, как конкретно белки достигают нужной мембраны, которую должен узнать тропный к ней лидерный пептид, не обсуждается. Если достигает (а то, что это действительно так, сомнений не вызывает), значит, «само собой» все и происходит, как надо. А вот движение к наружной мембране и между органеллами, компарментами цитоплазмы описывается весьма детально и изучено почти исчерпывающе [10]. Осуществляется это микровезикулами, отпочковавшимися от аппарата Гольджи [11, 12]. Целевой белок за счет своего лидерного пептида проникает внутрь везикулы. Сама везикула «одевается» некими так называемыми «белками опознавания» [13] и далее эта транспортная система мигрирует к цели.

Подобное представление было сформировано достаточно давно [14]. С тех пор концептуальные положения о внутриклеточном транспорте не изменились. Уточнялись лишь конкретные элементы – состав белков, покрывающих такие везикулы, их присоединения к подвижным филаментам и т. д. [15, 16]. Вот пример в виде цитаты из публикации 2010 года: «Универсальным свойством эукариотических клеток является присутствие во внутриклеточной мембране компарментов, которые обмениваются липидами и белками посредством промежуточных мембраноограниченных транспортных носителей, таких как везикулы или тубуло-везикулы (обычно описываемые как «транспортные средства»). Внутриклеточное перемещение требует тесной координации между образованием транспортных средств от донорной мембраны, их движением вдоль цитоскелета и их заякориванием и слиянием с той, что надо, акцепторной мембраной» [17]. Все это, безусловно, имеет место, детально изучено и играет свою роль в жизни клетки. Только к центральной проблеме пространственно-временной организации жизни клетки, анализируемой выше, все это не относится. Описываемый транспорт выполняет совсем иные функции и в том виде, как он детально проработан, описан и реализуется, обеспечить формирование, взаимодействие, динамику метаболических и регуляторных (сигнальных) цепей, циклов, каскадов не может по сути своей организации. На самом деле это даже не попытка объяснения происходящего, а попытка уйти от него. Ибо здесь то, что действительно имеет место, ненавязчиво переносят на то, что хотят, чтобы имело место. Даже сам термин «компармент» и что под ним подразумевают – достаточно неопределенные. Они призваны объяснить пространственную локализацию каких-то процессов, событий, состояний. И в подтверждение тому приводят не вызывающие никаких сомнений «компарменты» – митохондрии, лизосомы, пероксисомы и очень немногие иные, столь же понятные (как компарменты). А далее на все остальное навешивают то же самое понятие (доказательства «по аналогии»). Но где компарменты биосинтеза аминокислот, нуклеотидов, липидов и т. д.? И как, кроме общих соображений типа «локализации на мембранах», это все расположено? Где

конкретно в клетке все эти компартменты цепей метаболизма? Для того чтобы начать поиск таких механизмов, посмотрим на клетку еще раз и обратим особое внимание на то, что принимаем как должное, как «то, что есть», «так устроена жизнь» и т. д.

Начнем с самого что ни есть «банального» – состава белков клетки и продемонстрируем, как распределены белки по процессам на примере мезенхимальных клеток [18]:

Функциональная группа	Общее количество белков, %
Цитоскелет и движение	36
Метаболизм	22
Биосинтез белка, укладка и деградация	27
Биосинтез нуклеотидов и сохранность (генома)	6
Клеточный сигналинг	9

Весь метаболизм клетки обеспечивают 22 % белков от общего состава (номенклатуры) всех белков клетки. Биосинтез белка, его сборку и деградацию выполняют 27 %. А на долю того, что организует подвижность и цитоскелет (фактически тоже белков движения, хотя и по несколько иному механизму – поляризации ↔деполяризации), приходится аж 36 % перечня всех клеточных белков. Почему? Что это за функция, которая требует «элементов» перемещения больше, чем очевидные по своей абсолютной значимости и разнообразию «самые-самые» важные, основные, базовые, фундаментальные и т. д. составляющие клетки, обеспечивающие ее жизнь? И даже более того – составляющие фактически всю клетку как «единицу жизни», т. е. обеспечивающие ее самодостаточность. Ибо все белки собственного биосинтеза и процессов сборки и деградации вместе с белками биосинтеза нуклеиновой составляющей (ДНК и РНК вместе взятые) и обеспечения их сохранности составляют 33 %. А то, что связано с движением (всех типов) – 36 %. Да и регуляция всего этого более чем скромная. В таком виде она способна обеспечивать максимальную скорость процессов. Конечно же, это изучено в деталях. И роль «белкам движения» отводят адекватную – функцию перемещать. Но далее идет

ограничивающая конкретизация – что перемещать? Здесь перечень еще достаточно обширный – перемещается как сама клетка, так и ее внутренние структуры – ядро, митохондрии, лизосомы, вакуоли, везикулы, описанные для разных видов транспорта заключенного в них материала [19]. Неопределенности начинаются при оценке «зачем?» Для самих клеток их перемещение в организме понятно. Везикулы переносят свое содержимое между компартментами внутри клетки, а также извне внутрь и изнутри наружу. Функции движения остального уже описываются в общем виде. И это – все. Как-то очень уж немного выполняет то, что по составу в клетке доминирующее.

Наблюдая за жизнью мезенхимальных клеток, мы обнаружили в них особый тип структур. Они представлены в виде образований микроразмеров, высокодинамичных, интенсивно перемещающихся и массово присутствующих (рис. 2, см. вклейку). Их величина неодинакова и колеблется в пределах десятых микрометра (рис. 3, см. вклейку). Время существования лежит в широком диапазоне. Скорость движения, как и направление, переменчивы даже у одного образования (рис. 4, см. вклейку). А количество зависит от месторасположения в клетке – максимально вокруг ядра и убывает к периферии. Так, по прямому определению, в одной из типичных клеток средняя концентрация на 1 мкм² (в фокусной плоскости объектива) таких образований вблизи ядра составляет 2,5; между ядром и клеточной мембраной (по короткой оси клетки) – 1,5, а в примембранной зоне – 0,7. Наблюдение за этими образованиями и характером их поведения навело нас на мысль о том, что они выполняют функции поиска, выборки, сборки, набора соответствующих белков и их комплексов, взаимодействия таких белков и комплексов, а также транспортировки и адресной доставки к «месту назначения». Для этого на них должны находиться «улавливающие структуры» – своеобразные макромолекулярные «платформы», с которыми, по известным принципам строго специфического белково-белкового узнавания, будут соединяться адекватные такому узнаванию макромолекулы.

Синтез необходимых для каждого комплекса набора макромолекул далеко не точечный, он про-

исходит на иРНК, выходящих из ядра, и уже в силу этого разнесен – начиная от некоторых относительно ограниченных участков пространства до хаотического по всей цитоплазме. Исключения составляют лишь рибосомы, для которых существуют особые структуры в самом ядре. Поиск требуемой номенклатуры макромолекул проводится везикулами сканирующе, статистически. Сама выборка искомого осуществляется за счет принципа узнавания (как и при самосборке) определенных доменов востребованных макромолекул на комплементарных доменах везикулы (или собираемого в ней комплекса). Адресная доставка происходит таким же сканированием со взаимоузнаванием доставляемого и его мишени (после того, как самосборка уже произошла, а домен/домены узнавания мишени готовы к контакту). Собирается «нужное» – отдельные макромолекулы или их последовательно формируемые функциональные комплексы. В итоге в пространстве клетки везикула «по дороге» сканирования ею цитоплазмы («рыскания») не только собирает «нужные» макромолекулы, но и при таком же сканировании передает найденное мишени. Вероятностный дрейф везикулы прецизионно собирает комплект макромолекул из пространственно разбросанных элементов, создавая детерминированный структурно-функциональный комплекс.

Дальнейшее поведение проведенной сборки может быть двояким. Вероятны доставка в компартмент и последующее функционирование в нем. А возможно функционирование на самом подвижном микрообразовании в виде «метаболосомы». Ее поверхность может содержать большое количество «платформ», на которых находятся и ферменты метаболических циклов, и белки регуляторных каскадов. Все это на микрочастицах будет интенсивно перемещаться и взаимодействовать. Как уже отмечалось выше, здесь существенно то, что плотность микрочастиц вокруг ядра максимальна, убывая от него к периферии цитоплазмы. Какова же природа таких микрочастиц? И если все это так, то почему их до сих пор не нашли? Причины могут быть разные. Одна из них связана с возможностью того, что они не являются чем-то принципиально новым. Это не столько новые структуры, сколько уже описанные с дополнительными функциями. В клетке хо-

рошо известны микровезикулы с определенными функциями: лизосомы, отпочкования от аппарата Гольджи и т. д. Они все имеют некий общий принцип строения. Это мелкие везикулы – внутренняя полость, ограниченная мембраной. И всю их роль сводят к процессам, происходящим внутри мембраны [20]. Снаружи расположены белки, задачи которых ограничены узнаванием других мембран и слиянием с ними. А «платформы» по своему предполагаемому назначению должны локализоваться на наружной мембране для улавливания целевых макромолекул и организации их сборки в функционально активные комплексы. Наличие таких «платформ» снаружи никак не повлияет на то, что происходит внутри. Их на фотографиях, возможно, и видят, но относят к общепринятому – тому, что «должно быть».

Но есть и другое объяснение. Такие везикулы на окрашенных препаратах выглядят как грубая денатурация цитоплазмы, как некачественная фиксация, т. е. воспринимаются как артефакт. А на «хороших» препаратах они не видны, по-видимому, вследствие разрушения. А тех, что видны, – оценивают как везикулы с общепринятыми функциями, описанными выше. И только при сравнении фотографий из фильма живой клетки и «некачественно фиксированной» видна их адекватность.

Тогда клетку можно рассматривать как систему структур всего диапазона стабильности и консервативности. И все это объединяет, организует и обслуживает высокодинамичная пространственно-транспортная поисково-наборная система. Метаболизм и сигналинг происходят в основном (конечно же, не только) не на неподвижных структурах клетки, а на мобильных поисково-наборных системах. Они обеспечивают пространственное взаимодействие участков метаболизма и сигналинга, расположенных на них непосредственно, а также между консервативными структурами.

Представленный выше материал и его интерпретация состоят из экспериментальных данных и не вытекающих из них, а постулированных применительно к ним концептуальных предположений. Это может вызвать неприятие концепции. Но здесь следует отметить (еще раз), что все (!) концепции метаболизма и регуляции носят принципиально та-

кой же характер. Они основаны на экспериментальных данных о процессах и постулируют, что они, все эти процессы, как-то происходят в пространстве клетки. А кубики, треугольники, продукты реакций, расположенные в нужной последовательности и изображающие такие процессы, наглядно демонстрируют, что так (в виде постулатов, а не экспериментального материала) все и происходит. В приведенных выше данных показано наличие в клетке механизма, который реально способен обеспечивать пространственную реализацию того, что экспериментально установлено в виде процессов. Постулируется, что это и есть тот самый механизм и делается попытка чисто теоретически объяснить, как транспортная система клетки может выполнять подобное. А скорость перемещения везикул достаточна для того, чтобы согласовать временные параметры процессов. Главным, центральным положением предлагаемого объяснения является смена парадигмы функционального пространства клетки.

По существующим представлениям, все процессы реализуются в виде закрепленных на стационарных структурах макромолекул, собранных в нужной последовательности (циклы, цепи, каскады и т. д.) в нужном месте (клеточные компартменты) [2]. И в них, в эти компартменты, проникают все участники событий. Для белков механизмом проникновения считают лидерные последовательности, обеспечивающие транспорт через мембраны (как внешние, так и внутренние). Собственно, все идеи транспорта и вращаются вокруг этих лидерных последовательностей. И даже возможность транспорта белка в компартменте при посредстве везикул, отпочковавшихся от аппарата Гольджи, основана на том, что внутрь цистерн за счет лидеров проходят белки. А далее они путешествуют в везикулах, отделившихся от аппарата Гольджи, и затем (вследствие слияния мембран) из них выходят в свой компартмент. Согласно развиваемым в данной работе представлениям, все организовано в клетке «с точностью до наоборот». В основном и метаболизм, и сигналинг происходят на поверхности интенсивно перемещающихся мембранных микроструктур, взаимодействующих и с неподвижными структурами, и между собой. Но это взаимодействие высокодинамично как в пространст-

ве, так и во времени. За его счет осуществляется и формирование метаболических циклов (на таких подвижных структурах), и их контакты для полномасштабного функционирования, а также формирование и достижение мишеней участниками сигналинга. Эти микрообразования – высокодинамичные, сканирующие пространство клетки и выбирающие из него нужные формирования функциональных мультимолекулярных комплексов – и являются микрокомпартаментами, некими структурными единицами метаболизма – «метаболосомами». В подобные динамичные компартменты могут вовлекаться не только отдельные молекулы, но и мелкие внутриклеточные образования. Например, митохондрии продуцируют АТФ и ряд других продуктов, которые включаются во внемитохондриальный метаболизм. Они выходят из митохондрий при помощи расположенных в их мембранных системах специальных переносчиков. Далее они могут доставляться «к месту назначения» за счет того, что митохондрии прикрепляются к внутриклеточным сократительным элементам и, таким образом, способны интенсивно перемещаться. Но может быть и иначе: к митохондриям присоединяются микровезикулы с расположенными на них ферментативными циклами; образуются лабильные комплексы; их размеры (даже при конфигурации типа «сэндвич») окажутся в диапазоне экспериментально регистрируемых величин. Так, при диаметре мелких везикул примерно по 0,2 мкм суммарный поперечник митохондрии с везикулами составляет примерно 0,6 мкм. Из таких полифункциональных мультимикроструктур могут возникать лабильные динамичные мультикомпартаментами, отвечающие состоянию активности и направленности метаболизма клетки. А каждая отдельная микроструктура в процессе сканирования своего участка клетки собирает нужные функциональные макромолекулярные комплексы, обеспечивает подачу на них регуляторных сигналов, функциональное взаимодействие с другими комплексами и т. д.

Метаболосома может выполнять и еще одну критическую функцию – некоего демпфера, динамичного депо, балансера продуктов метаболического цикла. При любой не абсолютно сбалансированной передаче «из рук в руки» будут накапли-

ваться промежуточные метаболиты (или возникать их нехватка). В микровезикуле они могут проникать через ее мембрану, какое-то время локально сохраняться и уравнивать весь процесс. Живая клетка – это не только «обмен веществ и энергии», это пространственная динамика, обеспечивающая реализацию «обмена веществ и энергии». И предлагаемый принцип организации и функционирования внутриклеточных процессов на экспериментально регистрируемых высокодинамичных микровезикулах позволяет это объяснить. При обычной, нормальной, повседневной жизни клетки в ней происходят непрерывные перемещения всех составляющих. И неизбежна такая же непрерывная деформация любого внутриклеточного мембранного матрикса. При этом будут на нанометры меняться расстояния между заякоренными в подобных компартментах ферментами метаболических циклов. Прецизионная связь «из рук в руки» становится невозможной. Потому все структуры, в которых циклы реализуются локально автономно, целостные: митохондрии, рибосомы, пероксисомы и т. д. Они сохраняют прецизионность своего содержания. Так же будут вести себя и метаболосомы. Клетка – это удивительная система, в которой одновременно существуют и интенсивные перемещения, и прецизионная стабильность.

V. A. Kordium, V. I. Andrienko, O. A. Maslova, N. S. Shuvalova, D. M. Irodov, T. A. Ruban, E. M. Sukhorada, L. I. Likhacheva, S. P. Shpileva

Fundamental gap in fundamental biology

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnoho St., Kyiv, Ukraine, 03680

Summary

The article raises the problems of intracellular spatial and temporal organization of metabolism, signaling, and energy supply of these processes. To provide cell functions, the enzymes of metabolic chains, molecules of signaling pathways, and macroergs (as units of molecular interactions, accompanied by energy consumption) should find their partners and get their precise spatial relationship. The current views are based on ideas of compartmentalization of all processes as local sites of cellular matrix membrane, where specific stages of different metabolic cycles take place. The assembly of complexes of macromolecules in the number and combinations, required for their adequate functioning in the space of a cell, is generally described as intracellular transport of vesicles, implemented by mobile elements of cytoskeleton. Inside the vesicle there is «effective load» – macromolecules. The membranes of these vesicles fuse with specific sites of the matrix membranes and therefore relocate macromolecules. Neither calcula-

tions nor assumptions allow explaining precise formation of enzymatic chains, their interaction, signaling, etc. on this basis. Such transport of macromolecules (inside vesicles) enables solving other tasks. The concept of search-and-address systems in the form of space-scanning micro vesicles is proposed and well-grounded for purposes of searching for partners, forming chains and complexes, and building compartments. The micro vesicles collect corresponding chains of enzymes, signaling, and ensure the interactions on their surface. These micro vesicles are exactly those compartments, which provide for both precision of processes and their relationship.

Keywords: metabolism, cell, compartmentalization, vesicle, transport of macromolecules, precision of processes.

V. A. Кордюм, В. І. Андрієнко, О. А. Маслова, Н. С. Шувалова, Д. М. Іродов, Т. О. Рубан, О. М. Сухорада, Л. І. Лихачева, С. П. Шpileва

Фундаментальна прогалина у фундаментальній біології

Резюме

У публікації поставлено проблему внутрішньоклітинної просторово-часової організації метаболізму, сигналіну та енергетичного забезпечення цих процесів. Для функціонування клітини ферменти метаболічних ланцюгів, молекули сигнальних шляхів, макроерги (як одиниці молекулярних взаємодій, що супроводжуються поглинанням енергії) повинні знаходити своїх партнерів і мати просторово-прецизійне взаєморозташування. Існуючі уявлення засновано на ідеях компартменталізації усіх цих процесів у вигляді локальних ділянок мембрани клітинного матрикса, де відбуваються окремі етапи різних циклів. Збирання комплексів макромолекул у необхідній кількості і комбінаціях для їхнього адекватного функціонування у просторі клітини у самому загальному вигляді описується як внутрішньоклітинний транспорт везикул, який здійснюється рухливими елементами цитоскелета. А всередині везикул розташований «корисний вантаж» – макромолекули. Мембрани таких везикул зливаються з певними ділянками мембран матриксу і таким чином пересувають макромолекули. Будь-які розрахунки і припущення не дозволяють на подібній основі з'ясувати прецизійні формування ферментних ланцюгів, їхню взаємодію, сигналінг тощо. Такий транспорт макромолекул (усередині везикул) забезпечує вирішення інших завдань. Для пояснення пошуку партнерів, формування ланцюгів і комплексів, створення компартментів пропонується і обґрунтовується концепція пошуково-адресних систем доставки у вигляді скануючих простір клітини микровезикул. Вони збирають на своїй поверхні відповідні ланцюги ферментів, ділянок сигналіну, їхньої взаємодії. Такі микровезикули і є компартментами, що забезпечують і прецизійність процесів, і їхню взаємодію.

Ключові слова: метаболізм, клітина, компартменталізація, везикула, транспорт макромолекул, прецизійність процесів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Metzler D. E., Metzler C. M., Sauke D. J. Biochemistry: The chemical reactions of living cells / 2nd ed.–New York: Acad. press, 2001.–Vol. 1, 2.
2. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell / 4th ed.–New York: Garland Sci., 2002.–1616 p.
3. Ovadi J., Sacs V. On the origin of intracellular compartmentation and organized metabolic systems // Mol. Cell. Biochem.–2004.–256–257, N 1–2.–P. 5–12.

4. Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Zipursky L., Darnell J. Molecular cell biology / 5th ed.—New York: W. H. Freeman and Co., 2003.—1052 pp.
5. Nelson D. L., Cox M. M. Lehninger principles of biochemistry / 4th ed.—New York: Worth Publ., 2004.
6. Salmon E. D., Saxton W. M., Leslie R. J., Karow M. L., McIntosh J. R. Diffusion coefficient of fluorescein-labeled tubulin in the cytoplasm of embryonic cells of a sea urchin: video image analysis of fluorescence redistribution after photobleaching // *J. Cell Biol.*—1984.—**99**, N 6.—P. 2157–2164.
7. Claros M. G., Brunak S., von Heijne G. Prediction of N-terminal protein sorting signals // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—1997.—**7**, N 3.—P. 394–398.
8. Watari H., Blanchette-Mackie E. J., Dwyer N. K., Glick J. M., Patel S., Neufeld E. B., Brady R. O., Pentchev P. G., Strauss J. F. 3rd. Niemann-Pick C1 protein: obligatory roles for N-terminal domains and lysosomal targeting in cholesterol mobilization // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—1999.—**96**, N 3.—P. 805–810.
9. Gerber S. H., Sudhof T. C. Molecular determinants of regulated exocytosis // *Diabetes.*—2002.—**51**, suppl. 1.—S3–S11.
10. Mostov K., Apodaca G., Aroeti B., Okamoto C. Plasma membrane protein sorting in polarized // *J. Cell Biol.*—1992.—**116**, N 3.—P. 577–583.
11. Spang A. On vesicle formation and tethering in the ER-Golgi shuttle // *Curr. Opin. Cell Biol.*—2009.—**21**, N 4.—P. 531–536.
12. Pfeffer S. R. Multiple routes of protein transport from endosomes to the trans Golgi network // *FEBS Lett.*—2009.—**583**, N 23.—P. 3811–3816.
13. Jackson T. Transport vesicles: coats of many colours // *Curr. Biol.*—1998.—**8**, N 17.—R609–R612.
14. Robinson D. G., Hinz G., Holstein S. E. The molecular characterization of transport vesicles // *Plant. Mol. Biol.*—1998.—**38**, N 1–2.—P. 49–76.
15. Bryksin A. V., Laktionov P. P. Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in vesicular transport from Golgi apparatus to endoplasmic reticulum // *Biochemistry (Moscow).*—2008.—**73**, N 6.—P. 619–625.
16. Chaineau M., Danglot L., Galli T. Multiple roles of the vesicular-SNARE TI-VAMP in post-Golgi and endosomal trafficking // *FEBS Lett.*—2009.—**583**, N 23.—P. 3817–3826.
17. Miserey-Lenkei S., Chalancon G., Bardin S., Formstecher E., Goud B., Echard A. Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex // *Nat. Cell Biol.*—2010.—**12**, N 7.—P. 645–654.
18. Angelucci S., Marchisio M., Di Giuseppe F., Pierdomenico L., Sulpizio M., Eleuterio E., Lanuti P., Sabatino G., Miscia S., Di Ilio C. Proteome analysis of human Wharton's jelly cells during *in vitro* expansion // *Proteome Sci.*—2010.—**8**—P. 18.
19. Wolosewick J. J., Porter K. R. Microtrabecular lattice of the cytoplasmic ground substance. Artifact or reality // *J. Cell Biol.*—1979.—**82**, N 1.—P. 114–139.
20. Levine T., Loewen C. Inter-organelle membrane contact sites: through a glass, darkly // *Curr. Opin. Cell Biol.*—2006.—**18**, N 4.—P. 371–378.

UDC 579.245
Received 17.12.10

Figures to article by V. A. Kordium et al.

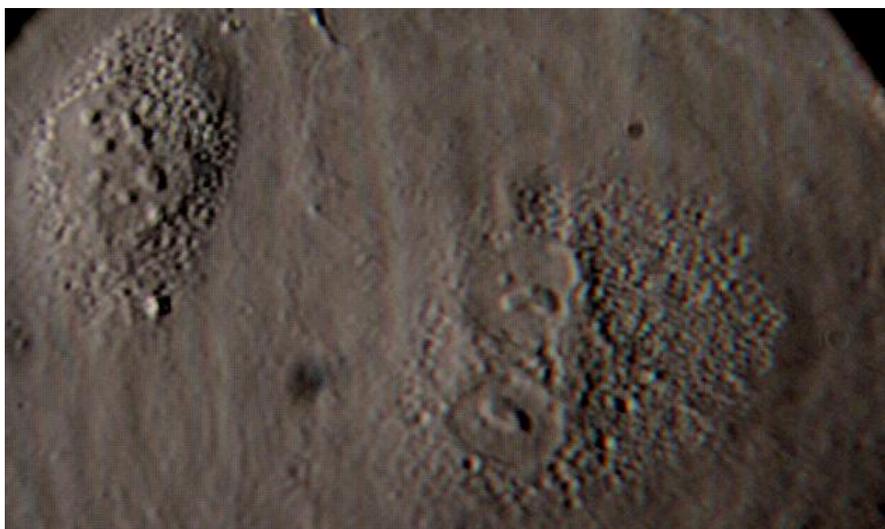


Рис. 2. Высокодинамичные структуры в клетке визуализированы при помощи интерференционной микроскопии

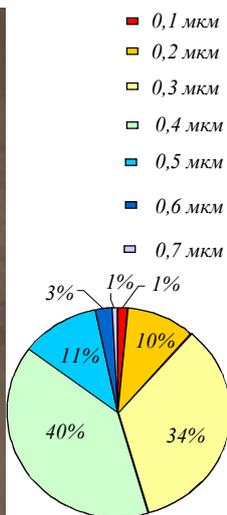
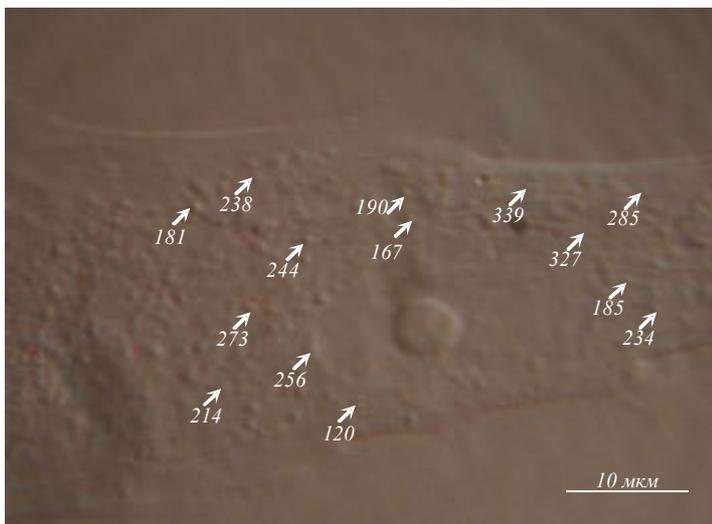


Рис. 3. Диапазон размеров наблюдаемых частиц (в нм). Размеры видимых структур колеблются в пределах десятых микрометра

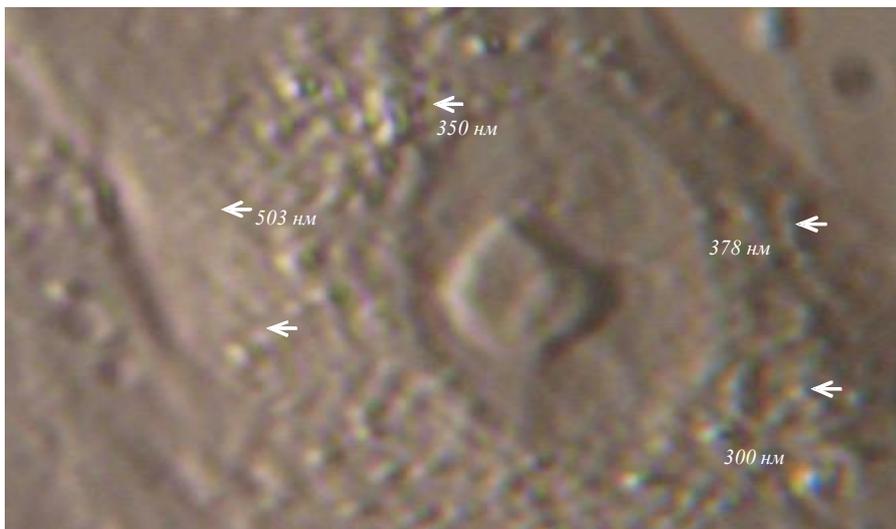


Рис. 4. Перемещение частиц за 5 с (скорость переменчива даже у одного образования) см. видео на www.biopolymers.org.ua