

ПРОБЛЕМА ТРЕХЦВЕТНОГО ФЛАГА — К ВОПРОСУ О РАЗВИТИИ И РЕГУЛЯЦИИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ

Л. ВОЛЬПЕРТ

(Медицинская школа Миддлсекской больницы)

Пытаясь ввести процесс развития в рамки некой общей теории, в нем удобно различать процессы, протекающие в основном во времени, и процессы, идущие в пространстве. Такое разделение отражает также современный подход к проблеме развития. Большинство текущих исследований в области эмбриологии затрагивает главным образом процессы развития во времени, проявляющиеся в дифференцировке клеток. Точнее, в этих работах изучаются последовательные процессы, связанные с регуляцией синтеза специфических макромолекул; это направление исчерпывающе рассмотрено одним из участников данного симпозиума [1]. Пространственные аспекты процессов развития, которым уделяется значительно меньше внимания, включают в себя регионализацию, или образование пространственной структуры (pattern formation), и морфогенез, или возникновение формы.

Центральная проблема развития — это проблема о том, как из яйца, кажущегося недифференцированным и простым в структурном отношении, развивается сложный организм. В одной из наших прежних работ о значении теории информации для проблем развития [2] мы высказали предположение, что развитие сложного организма легче понять, если допустить, что яйцо содержит лишь программу того, как строить организм, а не полную спецификацию всего организма, который из него разовьется. На наш взгляд, значительно проще написать программу для создания сложного организма, чем запрограммировать самый организм. Некоторое экспериментальное подтверждение подобной точки зрения было получено при изучении клеточных основ морфогенеза у зародыша морского ежа [3]. Исходя из полученных результатов, мы высказали предположение, что большинство изменений формы зародыша в ходе раннего развития обусловлено клеточной активностью двух типов: контактом между клетками и образованием псевдоподий. Разумеется, запрограммировать эти два типа активности значительно проще, чем форму возникающих в результате структур. Более того, клеточная активность может оказаться связующим звеном между действием генов и возникающими структурами.

В формулировке Уоддингтона проблема образования пространственной структуры «заключается в том, чтобы определить непосредственные причины разделения однородной области на отдельные элементы, расположенные в пространстве в определенном порядке». Если о морфогенезе (возникновении формы) можно составить какое-то представление на основе указанных выше данных, проблема возникновения пространственной структуры значительно менее ясна [4]. Нам необходимо знать природу клеточной активности, связанной с образованием пространственной структуры, не только потому, что это важная эмбриологическая проблема, но и потому, что это может иметь значение для всех наших представлений о природе развития. Это особенно относится к регуляции развития, играющей большую роль в возникновении пространственной структуры. Именно восстановление пространственной структуры, которое Уоддингтон назвал *гомеорезом* [5], обычно имеют в виду, когда говорят о канализации развития или о регуляции, сопровождающей удаление какой-либо части организма. С другой стороны, современные представления о регуляции, например ингибирование и репрессия конечным продуктом, затрагивают исключительно процессы, протекающие во времени. (Следует, однако, отметить, что и возникновение пространственной структуры и морфогенез всегда включают в себя дифференцировку во времени.)

Мы рассматривали проблему возникновения пространственной структуры [4] лишь на примере простых осевых структур, потому что они, во-первых, легче поддаются анализу и, во-вторых, достаточно хорошо изучены экспериментально. Существование этой проблемы лучше всего пояснить на нескольких примерах.

1 Зародыш морского ежа на ранних стадиях развития разделяется, по анимально-вегетативной оси на эктодерму, энтодерму и мезенхиму. Хотя соотношение этих областей можно изменять как оперативным путем, так и с помощью химических воздействий, система характеризуется устойчивой тенденцией к регуляции, направленной на сохранение нормального соотношения. Например, если удалить микромеры, т. е. те клетки зародыша, из которых в норме образуется первичная мезенхима, то из прилежащего участка образуется более или менее обычное количество мезенхимных клеток [6].

2. У слизистого гриба клеточная форма может развиваться из одной амебной клетки, вышедшей из споры. Из этой клетки путем роста и деления образуется популяция клеток, которые в конечном счете собираются в комок, напоминающий по форме патрон; у *Dictyostelium* эти клетки мигрируют. Передние клетки образуют стебелек, а задние — спорангий, и соотношение этих двух типов клеток может оставаться неизменным даже при больших колебаниях общего числа клеток. Более того, это соотношение сохраняется и при удалении части клеток мигрирующей массы [7].

3. Многие гидроиды характеризуются, по существу, осевой организацией; например, *Tubularia* по своей оси подразделяется на ротовой конус, дистальные щупальца, гонофоры, проксимальные щупальца и стolon. При этом гидроиды обнаруживают значительную способность к регуляции, восстанавливая характерную для них структуру после удаления какой-либо части [8, 9].

Способность к восстановлению осевой структуры, проиллюстрированная на этих примерах, может быть прослежена и во многих других системах. Некоторыми наиболее характерными чертами таких систем являются: а) постоянство (в известных пределах) соотношений между частями в структурах разных размеров; б) способность части системы воспроизводить всю систему или (опять-таки в известных пределах) способность любой части системы превратиться в любую другую часть; в) сохранение полярности системы, т. е. образование частей системы в правильном положении по отношению друг к другу и к исходной системе. Мы обобщили эти аспекты регуляции пространственной структуры с тем, чтобы их было легче подвергнуть теоретическому анализу.

Поведение таких систем резко отличается от так называемого «мозаичного», или нерегуляционного, образования структур, при котором удаление какой-либо части приводит к повреждению системы, тесно связанной с удаленной частью. Однако, как подчеркнул Вейс [10], различие между регуляционным и мозаичным типами развития, может быть, лишь отражает различия в сроках, после которых регуляция уже невозможна. Мозаичные структуры обычно рассматривают как предструктуры, и можно предположить, что при этом всегда имеется фаза регуляции.

Экспериментальный подход к этой проблеме привел к тому, что был сформулирован ряд интересных и упрощающих проблему концепций, связанных с представлениями о градиентах и доминантности [9, 11]. Поразительно, однако, насколько мало внимания было уделено теоретической стороне проблемы, в частности созданию работающих моделей. Мне известна лишь одна серьезная попытка создания модели, способной к развитию и регуляции осевой структуры [12]. Если говорить о более общих работах, то лишь очень немногие, и среди них Спигелман [13], обратили внимание на эту сторону проблемы. Как указал Спигелман, одна из характерных черт регенерации заключается в том, что потенциальными к образованию определенной части структуры обладает более обширная область, нежели та, из которой эта часть в действительности развивается. Он высказал предположение, что подобная система должна руководствоваться «принципом ограниченной реализации». Это могло бы осуществляться посредством по крайней мере двух различных механизмов, один из которых заключается в подавлении реализации потенциалов, а другой обеспечивает возникновение различий между частями систе-

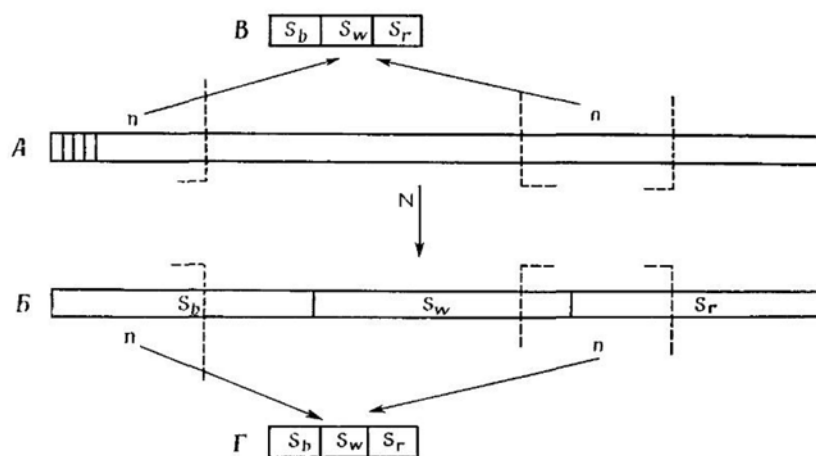
мы. Спигелман полагал, что если, например, две части системы способны к образованию определенной области, а делает это только одна из частей, то необходимо, чтобы эти части отличались друг от друга и чтобы одна часть подавляла развитие другой. Он подчеркнул, что одно лишь различие между двумя частями, проявляющееся, например, в виде какого-либо градиента, не может само по себе служить адекватным механизмом. В течение некоторого времени мы считали эти выводы правильными и рассматривали их как «Первую теорему образования пространственной структуры». Однако проведенный нами анализ ясно показал, что эти выводы требуют существенного пересмотра: принцип ограниченной реализации приложим лишь к спонтанным самоограничивающимся реакциям, и постоянно существующие различия между частями системы вовсе не являются необходимыми.

Формализация проблемы. Рассмотрим осевой ряд из N сходных элементов. Каждый элемент может находиться в k взаимно исключающих состояниях S_p ($p = 1..k$). Состояние S_p любого элемента определяется лишь входными сигналами и его предшествующим состоянием. Проблема заключается в том, чтобы определить входные и выходные сигналы, свойства элемента и природу связи между ними, приводящие к подразделению системы вдоль продольной оси на r участков, расположенных в определенном порядке. Каждый из этих участков содержит n элементов и характеризуется специфическим состоянием S_p , так что $n_p / N = A_p$ (т. е. число элементов в данном состоянии представляет собой некоторую постоянную часть общего числа элементов). Эта конфигурация должна сохраняться при нарушениях системы, вызванных удалением отдельных ее частей. Удобнее рассматривать частный случай для $r = 3$ и для $A_1 = A_2 = A_3 = 1/3$. Если S_1 , S_2 и S_3 — это синий, белый и красный цвета и обозначаются соответственно S_b , S_w и S_r , то мы получим структуру, аналогичную французскому (трехцветному) флагу, которая должна восстанавливаться при удалении любой части (фиг. I). Эту ситуацию можно считать типичным примером возникновения структуры, и она представляет собой обобщение приведенных выше конкретных биологических примеров. (Более сложной проблемой является случай двумерной структуры — британский флаг.)

Несомненно, существует какой-то общий путь решения этой проблемы, и я очень надеюсь, что он будет найден. Поскольку в настоящее время такого пути нет, мы можем продвигаться лишь ощупью. И первым шагом на этом пути было построение простых работающих моделей и изучение их общих свойств.

Модельные системы. Прежде чем перейти к рассмотрению наших собственных моделей, я хотел бы упомянуть о механизмах, предложенных Розом [12], и не только потому, что им предпринята единственная серьезная попытка создания модели, но и потому, что при обсуждении пространствен-

ной структуры и градиентов неоднократно использовались в той или иной форме идеи, лежащие в основе его модели. Роуз высказал предположение, что происхождение пространственной структуры может быть следствием целой иерархии самоограничивающихся реакций и распространением ограничивающей или тормозящей информации от одного дифференцирующегося участка к другому, а также градиентом скоростей дифференцировки, сходным с осевыми градиентами Чайльда. В такой системе реакции будут идти с наибольшей скоростью в верхней точке градиента, а доминирующей окажется реакция, находящаяся на вершине иерархии. Эта реакция является самоограничивающейся, и следующая реакция происходит в прилежащем участке — таким образом градиент скоростей дифференцировки обеспечивает пространственное выражение иерархии в реакциях. Хотя на первый взгляд эта система и может показаться привлекательной, ее анализ показывает, что она неудовлетворительна в качестве системы, генерирующей пространственную структуру, и что она не способна к регуляции [4]. Нам вообще не удалось создать никакой модели на основе градиента скоростей реакции. Еще более важная черта модели Роуза состоит в том, что размер участка определяется продолжительностью реакции; на такой основе модель трехцветного флага нам создать не удалось.



Фиг. 1. Проблема трехцветного флага.

A. Осевая система, образованная из N сходных элементов (лишь несколько таких элементов изображено на левом конце).

Каждый элемент может находиться в состоянии S_b , S_w или S_r .

B. Образуется трехцветный (французский) флаг, поскольку левая треть окрашена в синий, средняя — в белый и правая — в красный цвет.

B. Если изолировать часть системы A из n элементов, то эта часть также образует трехцветную структуру.

Г. Если изолировать часть системы, уже имеющей трехцветную структуру,

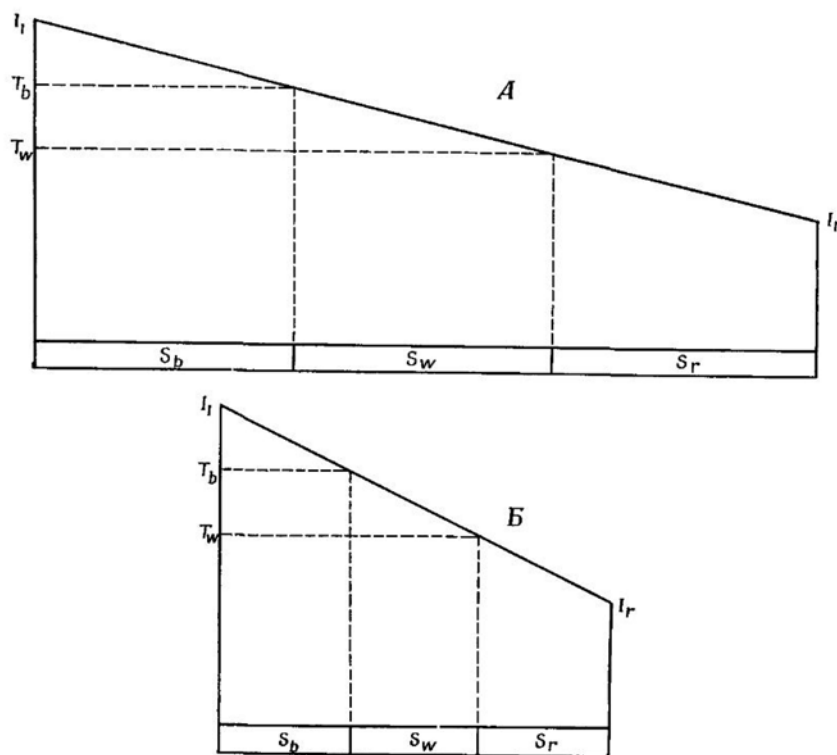
то эта часть также дает трехцветную структуру меньшего размера.

Наши попытки решить проблему трехцветного флага показали, что существуют, по-видимому, два главных пути ее решения. Прежде всего это разработка механизма, посредством которого элемент может точно высчитать свое положение в системе и «решить», в каком состоянии он должен находиться. Простой механизм, который может это обеспечить,— это наличие двух строгих градиентов, возникающих на обоих концах системы. Отдельный элемент может рассчитать свое положение на основе значений двух градиентов и перейти в соответствующее состояние. Модель этого типа можно назвать «моделью с установившимся градиентом». В модели второго типа отдельный элемент не может вычислить свое положение в системе относительно двух ее концов. В основе этого механизма лежит «баллотировка», или «уравновешивание» размеров участков по отношению друг к другу. Примером такого механизма может служить модель порогового градиента Уэбстера [14]. В этой модели один участок S_b , образует легко диффундирующее вещество, а прилегающий участок S_w разрушает его. Элементы обратимо переходят из состояния S_b в состояние S_w до тех пор, пока концентрация вещества не станет постоянной. В модели Уэбстера есть градиент порогов, который обеспечивает расположение элементов, изменяющих свое состояние, между участком S_w и участком S_b . Пропорции участков определяются скоростью образования и разрушения диффундирующих веществ. Теперь мы рассмотрим эти две модели несколько более подробно.

Но прежде было бы полезно подчеркнуть различия между глобальными, или системными, свойствами, характерными для системы в целом или для отдельных ее элементов, когда они входят в систему, и локальными, или элементарными, свойствами. Не следует также чересчур поспешно отождествлять элементы с клетками.

Модель установившихся градиентов. Допустим, что элементы имеют фиксированные пороги T по отношению к единственному веществу I , так что концентрация этого вещества определяет состояние клетки. Тогда, если $I > T_b$, то элемент будет находиться в состоянии S_b ; если $T_b > I > T_w$, то элемент будет в состоянии S_w ; если же $T_w > I$, то элемент будет в состоянии S_r . Это локальные свойства системы. К глобальным ее свойствам относится установление линейного градиента, абсолютные значения которого на двух концах системы равны I_i и I_r (фиг. 2). Тогда, если $I - T_b = T_b - T_w = T_w - I_r$, система образует трехцветный флаг. Система будет способна к весьма совершенной регуляции, если при удалении какого-либо участка значения I на обоих концах восстанавливаются до I_i и I_r , а градиент I между ними остается линейным (фиг. 2). Такая регуляция может быть достигнута в том случае, если элемент в левом конце служит единственным источником вещества I , образующегося в количестве I_i , а элемент в правом конце служит «стоком»

вещества I , причем скорость его выведения такова, что концентрация I в этом участке равна I_r . При этих условиях вещество I станет диффундировать от левого конца к правому, а градиент концентраций будет линейным [4]. Ясно, что такая система нуждается в механизме, который определял бы поведение элемента в зависимости от того, свободен ли левый конец системы (источник), не свободен ни один из концов или свободен правый конец (сток). Это, конечно, означает, что каждый элемент поляризован.



Фиг. 2. Схема модели фиксированных градиентов.

- А. Система трехцветного флага устанавливается посредством градиента концентраций вещества I .
- Б. Если удалить участок с правой стороны, то устанавливается новый градиент, поскольку концентрация I в правом конце равна I_r , и структура восстанавливается.

У такой системы, способной к весьма совершенной регуляции, есть несколько интересных особенностей. Пороговые характеристики элементов фиксированы, и диффундирует лишь одно вещество независимо от того, на сколь большое число участков подразделяется система. Особый *интерес представляет тот факт, что участки S_b , S_w и S_r не взаимодействуют* и что размеры одного из них не влияют на размеры любого другого. Межклеточные связи возможны лишь между элементами, получающими входные сигналы от соседних элементов: если с какой-либо их стороны расположен

еще один элемент, то либо образование, либо разрушение вещества I в них подавлено; если этот элемент расположен справа, то подавлено разрушение и происходит образование вещества I , так что его концентрация составляет I_i ; если же этот элемент располагается слева, то подавлено образование I .

Модель уравнивания. Эта модель сходна с моделью порогового градиента Уэбстера [14], но она не нуждается ни в каких градиентах. Рассмотрим сначала систему, разделенную на два участка S_b и S_w , так что $A_b = 1/3$, а $A_w = 2/3$. Элементы спонтанно переходят в состояние S_b к образуют вещество I_b со скоростью k_b на 1 элемент; это вещество индуцирует клетки к переходу в состояние S_w , и к образованию вещества I_w со скоростью k_w . Оба вещества I_b и I_w быстро диффундируют и характеризуются сходными непродолжительными периодами полусуществования. Правило для перехода в состояние S_b или S_w таково, что если I_w больше, чем I_b , то элементы переходят в состояние S_b ; если же I_b больше, чем I_w , то элементы переходят в состояние S_w , однако изменять состояние может лишь тот элемент, который расположен между элементами, находящимися в состояниях S_b и S_w , т. е. на границе. Из этого последнего правила есть лишь одно исключение: элемент, находящийся на левом конце, может переходить в состояние S_b и S_w , если $I_b = 0$, а элемент на правом конце — в S_w из S_b , если $I_w = 0$. Очевидно, что пограничные элементы будут переходить из одного состояния в другое до тех пор, пока концентрации веществ не станут равными, т. е. $I_b = I_w$, поэтому если $k_b = 2 k_w$, то система будет регулироваться так, чтобы $A_b = 1/3$, а $A_w = 2/3$. Подобное рассуждение можно легко расширить, подразделив элементы в S_w , с тем чтобы образовался трехцветный флаг — система, которая будет регулироваться столь же хорошо. Модель этого типа можно противопоставить первой, поскольку в ней нет градиента и элемент не может вычислить своего положения в системе. Этот момент очень важен, поскольку он показывает, что существование градиентов не обязательно для регуляции структуры.

Общие принципы. Модели этих двух типов, по-видимому, представляют вполне приемлемые решения проблемы трехцветного флага. Поэтому мы можем рассмотреть некоторые их характеристики более подробно, с тем чтобы выделить черты, общие для всех моделей, позволяющих решить проблему трехцветного флага. Очевидно, можно выделить три необходимых условия. Первое условие состоит в том, что система должна быть поляризованной, т. е. каждый элемент должен обладать механизмом, посредством которого определяется тот конец системы, который находится в состоянии S_b ; для того чтобы создать трехцветный флаг, всегда должен быть определен конец, который будет синим. Второе условие, общее для всех моделей, заключается в том, что элементы должны обладать пороговыми свойствами. Это означает, что состояние элемента будет зависеть от некоторых значений

входных сигналов и что элемент будет переходить из одного состояния в другое при критических значениях этих сигналов. Эти пороги могут зависеть не только от сигналов как таковых, но и от какой-то зависящей от них сложной функции. Наличие порогов может быть свойственно отдельным элементам (модель установившихся градиентов) или системе в целом (модель порогового градиента Уэбстера [14]). Третье условие, также общее для всех моделей, определить труднее. Я бы назвал его потребностью хотя бы в одной спонтанной самоограничивающейся реакции. Называя ее «спонтанной», мы имеем в виду, что реакция может идти в любом элементе, если она не подавляется какой-либо другой частью системы; определение «самоограничивающаяся» означает, что она подавляется в результате реакции, происшедшей в какой-либо другой части системы; в этом-то и состоит механизм подавления. В модели установившихся градиентов имеются две спонтанные самоограничивающиеся реакции: образование вещества I и его выведение. Эти реакции локализованы на концах системы. В модели «уравновешивания» спонтанная самоограничивающаяся реакция заключается в том, чтобы перейти в состояние S_b . Эта реакция самоограничивается, поскольку элементы S_b образуют вещество I_b , вызывающее переход элементов из состояния S_b в S_w . Спонтанная самоограничивающаяся реакция — это единственная часть системы, для которой необходим принцип ограниченной реализации Спигелмана и не нужен градиент различий между частями. Следует отметить также, что спонтанная самоограничивающаяся реакция может лежать в основе динамической регуляции.

Хотя я прекрасно сознаю всю наивность моего подхода к проблеме трехцветного флага, мне все же представляется, что для ее решения необходимы (и, быть может, достаточны) эти три условия: полярность, пороги и спонтанная самоограничивающаяся реакция. Я очень надеюсь, что кто-нибудь предложит значительно более общее и изощренное решение этой проблемы. Было бы важно установить, действительно ли эти три условия необходимы для развития и регуляции системы трехцветного флага. Если это так, то на их основе можно было бы оценивать модели и, что более важно, попытаться идентифицировать их в биологических системах; было бы заманчиво, например, сопоставить спонтанную самоограничивающуюся реакцию с понятием доминантности.

Интересно рассмотреть регуляцию системы трехцветного флага в связи с гомеостазом и гомеорезом. Поскольку мы считали систему трехцветного флага дефинитивной пространственной структурой, не претерпевающей дальнейших изменений, ее строение неизбежно следует рассматривать как пример гомеостаза, а не гомеореза, так как система всегда возвращается к неизменному состоянию, а не к определенному морфогенетическому пути. (В сущности, мне не вполне ясно, что представляет собой морфогенетиче-

ский путь на клеточном уровне.) Практически многие структуры типа трехцветного флага в биологии не являются просто дефинитивными. Так, из трех примеров, упомянутых во введении, зародыш морского ежа на ранних стадиях и масса клеток слизистого гриба — это переходные стадии развития в значительно более длинной последовательности морфогенетических процессов. Поэтому необходимо выяснить, в какой степени развитие пространственной структуры включает в себя последовательное образование систем трехцветного флага, участки которых затем развиваются в системы двуцветного флага и т. д. Для рассмотрения таких проблем длительного образования пространственной структуры и модификации потребуются, невидимому, дальнейшие теоретические разработки. Можно, однако, надеяться, что обсуждение сравнительно простой системы, связанной лишь со структурным гомеостазом, послужит хорошей отправной точкой для дальнейших исследований. В заключение можно отметить, что такие концепции, как гомеостаз, гомеорез и эпигенетический ландшафт, представляют собой, возможно, лишь описания логических свойств систем и даже не пытаются проникнуть в механизмы возникновения этих свойств. Поэтому они не связаны с факторами полярности и спонтанной самоограничивающейся реакцией, которые, как мне кажется, являются основными свойствами, необходимыми для регуляции пространственной структуры, а также с пространственными аспектами развития.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Goodwin B. C.*, Temporal organization in cells, Acad. Press, 1963 (Б. Гудвин, Временная организация клетки, изд-во «Мир», М., 1966.)
2. *Apter M., Wolpert L.*, *J. Theoret. Biol.*, 8, 244 (1965).
3. *Gustafson T., Wolpert L.*, *Int. Rev. Cytol.*, 10, 163 (1963).
4. *Wolpert L., Webster G.*, 1968, in preparation.
5. *Waddington C. H.*, The strategy of the genes, Allen and Unwin, 1957.
6. *Hörstadius S.*, *Biol. Rev.*, Cambridge, 14, 132 (1939).
7. *Raper K., J. Elisha Mitch.* *Sci. Soc.*, 56, 421 (1940).
8. *Webster G., Wolpert L.*, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 16, 91 (1966).
9. *Huxley J. S., de Beer G. R.*, The elements of experimental embryology, Cambridge Univ. Press, 1934. (Гексли и де Бер, Экспериментальная эмбриология, М., 1946).
10. *Weiss P.*, Principles of development, Holt, 1939.
11. *Child C. M.*, Patterns and problems of development, Univ. of Chicago Press, 1941.
12. *Rose S. M.*, *Amer. Nat.*, 86, 337 (1952).
13. *Spiegelman S.*, *Q. Rev. Biol.*, 20, 121 (1945).
14. *Webster G.*, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 16, 123 (1966).