

Наша «шагренева кожа» — это наша проблема. Нам ее и решать. 6. Возврат долга

В. А. Кордюм

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина
E. mail: kordium@imbg.org.ua

Правда всегда странна, более странна,
чем вымысел.

Дж. Байрон

Анализируется проблема пространственно-временной организации метаболических циклов в клетке. В этой связи освещены вопросы, не имеющие ответа, и предлагаются варианты их решения. В контексте рассматриваемых представлений проводится оценка общего количества промежуточных продуктов и их утечки из активных центров ферментов метаболических циклов. Утечка метаболитов связывается с повреждением макромолекул, чем и объясняются (с учетом особенностей мутационного процесса) возрастные изменения.

Ключевые слова: вода в клетке, метаболические циклы, каналирование, мутационный процесс, незначимые последовательности.

Чистосердечное признание. Не знаю, как у читателя, но у автора все время существовало какое-то очень смутное, почти подсознательное, чувство внутренней неудовлетворенности. Все пять предыдущих разделов [1—5] должны были убеждать. Но что-то все же вызывало какую-то неуверенность в убедительности изложения. Не то чтобы автор вешал читателю «лапшу на уши». Вообще-то такой способ навязывания своей точки зрения достаточно распространен. Но тут было все иначе — автор в первую очередь убеждал себя. Вешать же «лапшу на уши» самому себе смысла не имело никакого. А что-то «не такое» оставалось и действовало крайне раздражающе (во всяком случае на автора). И тогда было решено сформулировать эти самые «раздражающие вопросы», т. е. определиться, что же в описанных построениях «не так». После придиричиво-критического (почти злобного) анализа стало понятно, что в лучших традициях построения

гипотез (формулировок положений, создания теорий и т. д.) автор упускал нечто, чего объяснить не мог. Пришлось сформулировать эти слабые (вернее, отсутствующие) моменты. А сформулировав, попытаться найти ответы, которые бы все объясняли (хотя бы в общем виде, качественно), объединяя известную феноменологию с известными механизмами в действительно единое целое.

Формулировка таких «слабостей» (фактически пропусков) в построении привела к весьма необычным (а иногда даже совершенно невероятным), с точки зрения современных представлений, вопросам. И нет ничего удивительного в том, что попытки ответить на них оказались тоже крайне необычными. Единственным оправданием здесь является то, что и для формулирования вопросов, и для ответа на них автор не прибегал к допущениям, противоречащим или несовместимым с современной наукой. Все вытекало из известного, но складывалось в нечто совсем необычное. Итак (в очередной раз), начнем «сначала».

Умение «не видеть» как фундаментальная основа существования науки. Обычно считают наоборот — основой науки, является умение видеть. И, конечно же, это так. И это, умение видеть, безусловно, — фундаментальная основа существования науки. Еще одна. Здесь все настолько очевидно, что доказывать вообще ничего не надо. Другое дело — умение не видеть. Хотя, пожалуй, в этом все еще более очевидно. настолько, что его как очевидное, обыденное, вообще не замечают.

Любое новое всегда противоречит чему-то старому. Любое новое положение всегда сопровождается большим (очень большим) количеством вопросов, на которые в тот момент нет ответов. Допущений, которые ставят новые вопросы, на которые опять же нет ответов. А сами объяснения чего-то, что хотят объяснить, приводят ко многим, не способным быть объяснимыми, новым вопросам, приходят в противоречие с уже хоть как-то воспринимаемыми (допускаемыми, установленными, общепринятыми и т. д.) положениями. Так во всем и всегда. Даже когда Коперник постулировал вращение Земли, ему очень аргументированно возражали, что центробежная сила от такого вращения вышвырнула бы все с поверхности планеты и вещи падали бы вверх, а не вниз. Кому еще что-то непонятно, поворачивайте вокруг себя на веревочке какой-нибудь предмет и отпустите — наглядно до абсолюта. Разве это не очевидно? А до Ньютона с его всемирным тяготением оставалось еще больше века. В довершение на защиту старого становятся еще и традиции, учебники, курсы обучения, общественное положение ученых (они что, дурнее того, кто предлагает новое, и его сами до того не видели?) и т. д. Поэтому для того, чтобы предлагать что-то новое, надо уметь не видеть (или делать вид, что не видишь) все те несоответствия, противоречия, невозможность ответа на абсолютно аргументированные вопросы и пр.

Но если бы так все обстояло только с новым! И в существующих представлениях достаточно на каждый устоявшийся ответ задать очередное «почему?» и очень скоро все и всегда упираются в необъяснимое. А часто уже даже на первое «почему» ответа нет или он абстрактно-уклончивый. И чтобы познать, идти дальше, составить (и поддерживать!) картину мира, явления, процесса надо уметь не видеть всех этих несоответствий, противоречий, нестыковок и т. д. Иначе все в растерянности остановятся и жизнь замрет. Чтобы идти

вперед в науке, надо уметь не только видеть, но и уметь не видеть. Поэтому ничего удивительного не было в развиваемом в первой публикации [1] положении о том, что клетка — это молекулярная машина.

Эдак, между прочим, автор использовал хорошо всеми понимаемый термин «машина», привел некоторые ему подтверждения и, взяв далее за основу как теперь уже очевидное, начал возводить на этом следующие построения. Вообще-то обычно так и поступают. Это не более чем один из примеров умения не видеть. И все бы ничего, но, начиная с какого-то момента, стала, вначале очень смутно, затем все более и более внятно нарастать внутренняя неопределенность. Неопределенность представлений о том, что же такое «молекулярная машина» применительно к клетке. То, что было применено как аргументация, носило характер аналогий. А чтобы перейти на желаемый этап — полного разрешения, необходимо знание механизмов. Они, вроде бы, все просто-таки на виду — во всех учебниках, обзорах, курсах лекций, учебных (и даже сугубо профессиональных) видеофильмах.

Клетка сегодня изучена настолько, что, казалось бы, в ней уже ничего непонятного нет. Разве что осталось все белки, образуемые в данный момент функционирующими генами, собрать в «естественно существующие» комплексы, посчитать их во взаимодействии, составить на такой основе модель в супер-ультра-экстра-очень большом и мощном компьютере, скорость работы и емкость которого будут хотя бы на 15—20 порядков выше, чем у существующих, и все станет ну просто-таки абсолютно ясно, понятно, расчетно, прогнозируемо и как угодно (и во что угодно) тут же, немедленно реализуемо. А то, что пока таких компьютеров нет, значения особого не имеет — появятся через 10 лет. Можно и подождать. Главное же, что все принципиально ясно. И такие Программы, как Протеомика, Функциональная геномика, Структурная биология и т. п., тому абсолютно наглядное подтверждение — они конкретизируют (уже!) принципиально, концептуально установленное. Все, вроде бы, хорошо, логично, последовательно.

Собственно говоря, это все и есть физиология, биохимия, молекулярная биология и прочее. Однако анализ именно этих представлений и привел к появлению необычных вопросов. Начнем с самого «очевидного» — абсолютно надежно установленное, бесконечное количество раз экспериментально

воспроизведенного, вошедшего как база во все учебники — клеточного метаболизма, являющегося составляющей «молекулярной машины». Он состоит из взаимосвязанных цепей и циклов ферментативных реакций. Состоит — и это (именно это) надежно установлено и является основой современных теорий и практики. Но для того, чтобы «состоять», он, метаболизм, должен быть соответствующим образом организован — во времени, пространстве, динамике, взаимодействии. И здесь даже самые простые элементы анализа показывают, что то, которое «состоит» (реально!), существовать, согласно распространенным представлениям, не может категорически. Не может потому, что не может быть организованным в реальном пространстве, осуществляться в реальном времени и протекать в реальной динамике и последовательности тех самых цепей и циклов.

Начнем с самого-самого, просто-таки незыблемо очевидного — субстанции, в которой протекают биохимические процессы. Совершенно понятно и абсолютно надежно установлено, что такой субстанцией в клетке всегда является вода (за редчайшими исключениями, когда ферментативные процессы осуществляются в липидной фазе мембран). Но если теперь от всех этих общих и надежных экспериментальных (но всегда частных и часто вообще косвенных) данных и их удивительно прямолинейных экстраполяций на клетку перейти к реальным, не менее надежным, непосредственно к проблеме соотношенным данным, то все выглядит, мягко говоря, совсем не так.

В отношении воды ситуация в наших представлениях вообще находится далеко за гранью любой фантастики. Согласно существующим взглядам, все процессы в клетках протекают в водной фазе. Иначе никакой диффузии, переноса мелких молекул, движения макромолекул и т. д. просто не может быть. Вода — колыбель жизни, ее среда (для кого только внутренняя, а для кого и внутренняя и внешняя). В процентном соотношении вода составляет основную массу организмов: она все переносит, растворяет и одновременно пространственно организует за счет гидрофильных, гидрофобных, водородных, зарядовых и прочих связей и взаимодействий; участвует почти во всех химических превращениях, всех ферментативных и неферментативных реакциях; организует (вернее, реализует заложенную в первичной последовательности) пространственную структуру всех макромолекул (да и

немакро- тоже) и очень многое прочее. Все это абсолютно, безоговорочно, непреложно так и только так. В общем виде.

А вот переходя к конкретике, к деталям, ситуация разительно меняется. Если оценивать все усредненно, то воды в клетке не просто много — ее в несколько раз больше, чем всего остального вместе взятого (таблица).

И, казалось бы, все в клетке должно в воде буквально плавать. До недавнего времени так и считалось. Вопросы о правомерности подобных представлений возникли после того, как начали определять в клетке истинное состояние внутриклеточной воды. Когда количество независимых определений такого состояния стало минимально достаточным для сравнений, появились комментарии. И первым выводом оказалось то, что те самые абсолютно надежные экспериментальные данные очень часто в независимых экспериментах показывают очень противоречивые результаты [7]. Так, количество внутриклеточной воды для сердца в 10 независимых определениях у разных исследователей колебалось от $1,81 \pm 0,59$ до $4,32 \pm 0,24$ мл H_2O на 1 г сухого остатка [8].

Объясняется такой разброс методическими трудностями. Надо определить воду не в органе или ткани, а именно в клетках этого органа или ткани, т. е. каким-то образом разделить воду внутриклеточную, межклеточную, в сосудах и т. д. Но и это — опять же только для суммарного определе-

Примерное содержание (%) воды и других составляющих в клетке Escherichia coli и печени крысы

Компонент	<i>E. coli</i>	Печень крысы*
H_2O	70	69
Белок	15	21
Аминокислоты	0,4	—
ДНК	1	0,2
РНК	6	1,0
Карбогидраты	3	—
Липиды	—	3,8
Гликоген	2	6
Другие мелкие молекулы	0,2	—
Неорганические ионы	1	0,4

П р и м е ч а н и е. При суммировании цифр колонок сумма не дает 100 %, что, по-видимому, связано с усреднением данных разных независимых экспериментов. *Данные приведены не усредненно на печень (т. е. и на клетки, и на межклеточный материал), а строго на сами клетки [6].

ния воды в клетке. Главные же проблемы заключаются в оценках состояния этой внутриклеточной воды. «Сухой остаток» клетки — это, в основном, энергично (и в значительных количествах) адсорбирующие воду макромолекулы — белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды. Примем усредненные (по разным экспериментам) соотношения вода/сухой остаток за 3,0, т. е. на 3 мл воды — 1 г биополимеров (в основном). Это 25 %-й раствор. Взять, например, альбумин или ДНК в виде 25 %-го раствора. Попробуйте экспериментально получить такую смесь. В каком состоянии в ней будет вода? Не надо никаких специальных измерений, чтобы стало ясно, что на капельно-жидкую воду, ту самую, которую имеют в виду, когда рассматривают внутриклеточные процессы, рассчитывать не приходится.

Но если это принять как действительность, то тогда надо признать, что в клетке нет условий для реально имеющих место скоростей биохимических процессов с их реальными непрерывными массопотоками из-за диффузии между всеми реальными промежуточными и конечными взаимосогласованными циклами. Нет потому, что скорости перемещения вследствие диффузии в таком вязком растворе резко замедляются.

И тогда производят спасающий ситуацию перерасчет. Для связанной воды дают оценки, эквивалентные кристаллизационной воде в химически чистых реагентах. А именно — количество молекул воды, прочно связанной с биологическими макромолекулами: 10—11 молекул воды на пару оснований нуклеиновых кислот [9]; 14—18 молекул воды на одну молекулу липидов [10]; 0,4 г воды на 1 г сухого белка [11] и т. д. А уже на основании таких расчетов количество связанной воды принимается (в среднем) за 0,3 г на 1 г сухой массы клеток сердца [8]. И это при том, что ранее выполненные скрупулезные эксперименты показали, что 0,3 г H_2O на 1 г сухой массы не хватит даже для того, чтобы вокруг макромолекул клетки образовался хотя бы мономолекулярный слой воды [12].

Как же обстоит дело с остальной водой? По современным представлениям, в классическом капельно-жидком состоянии она содержится только в вакуолях. Вне их, т. е. в цитоплазме (нуклеоплазме) вода находится в каком-то структурированном состоянии. Диапазон такой структурированности, по мнению разных авторов, варьирует. Одним из наиболее сложных (но оставляющих хоть какое-то

место относительно свободной воде) является представлением о том, что заряды основных и кислых групп белков, заряды на других макромолекулах, распределение гидрофильных и гидрофобных доменов и, наконец, коллективное поведение молекул составляют причину образования зон толщиной примерно 6 нм (60 Å), в которых вода подвижна так же (или почти), как при ее капельно-жидком состоянии и в ней могут быть растворены и свободно диффундировать мелкие молекулы [7, 13]. Но при всем том состоянии воды (пока совершенно непостижимым образом) изменяется физиологически — по команде самих клеток [14]. Это в общем-то давно известные переходы гель—золь, описанные феноменологически еще лет сто тому назад и даже в общих чертах на уровне механизмов неизвестные и поныне. Таким образом, все основные процессы в клетке протекают не в той водной фазе, которую имеют в виду, т. е. не в свободной — «капельно-жидкой» воде. Наоборот. В клетке содержание воды в зонах метаболических процессов жестко контролируется. А капельно-жидкая вода (действительно, часто в избытке) присутствует либо в сосудах, полостях, либо в межклеточном пространстве. Внутри же клетки — в специальных компартментах — вакуолях.

Там же, где осуществляются ферментативные процессы, вода присутствует в связанном виде — адсорбирована многослойно (что допускает, но лишь в определенной мере, свободу движения) на поверхности макромолекул. И вся система нормально функционирует без капельно-жидкой воды. А наглядным примером такого состояния являются клетки организмов, вообще не потребляющие воду как таковую. У некоторых из них капельно-жидкой воды как таковой нет даже в вакуолях. Желая проверить такое могут поймать моль (лучше не в стадии личинки, а в стадии имаго, т. е. мотылька) и убедиться в этом методом «прямого эксперимента». Передвигаться в таких условиях мелкие молекулы еще как-то могут по слоям адсорбированной воды, а вот макромолекулам диффундировать просто не в чем.

В изучении «сухого» анабиоза (т. е. анабиоза, достигаемого высушиванием) имеются очень яркие примеры того, сколько надо воды для протекания ферментативных процессов. Вот один из них. Цисты водного ракообразного *Artemia salina* являются стадией жизненного цикла, приспособленного к сохранению при пересыхании водоемов. При влаж-

ности цист менее 30 г воды на 100 г их сухой массы (это те самые 0,3 г воды на 1 г сухого вещества, которые считают «связанной») все процессы прекращаются (как указывалось выше, при этом H_2O не хватает даже для образования монослоя вокруг макромолекул). Но когда влажность повышается до 35 г воды на 100 г сухой массы цист, начинают функционировать метаболические пути углеводов, аминокислот и цикла Кребса [15]. То есть начинают функционировать даже не отдельные ферменты, а сложные биохимические циклы. Что и как на молекулярном уровне в таких условиях может двигаться? Но даже в нормальных обводненных клетках при точных измерениях делают совершенно однозначные заключения о том, что ни вода, ни ионы «просто так» за счет диффузии не могут перемещаться на значительные расстояния [16].

Итак — свободной воды, в которой все может плавать, диффундировать, где «всем хорошо», в клетке нет, и условий для быстрых, точных, согласованных, взаимосвязанных и т. д. биохимических реакций не существует. Стало быть, согласно существующим представлениям, вся биохимия клетки в реальной сложности, согласованности и скорости протекания процессов иметь место не может. А она место имеет. Значит что-то не так. Что? Самое простое — это предположить, что все данные об отсутствии свободной воды в клетке (вне вакуолей) — не более чем недостаточно, неполно, фрагментарно и т. д. изученные грани куда более сложного явления и потому не отражают реальности. Доизучают и окажется, что вода в клетке подвижна, в ней все буквально купается (или хотя бы вполне уютно хлюпает) и вообще никаких «водных» проблем не существует. Рассмотрим этот вариант. Примем, что подвижной воды в клетке столько, сколько «надо», и все диффузионные процессы осуществляются беспрепятственно. Как не парадоксально, но такое допущение приводит для клетки к еще более тяжелым последствиям. При отсутствии легко подвижной воды клетка, согласно существующим взглядам, замрет — в ней не смогут идти метаболические процессы. А вот при наличии свободной воды, также по общепринятым представлениям, клетка должна немедленно погибнуть. Что же это за такие «общепринятые представления»? Выстроим их в логичную, внутренне не противоречивую последовательность событий.

Каждая ферментативная реакция представляет собой химический процесс с активацией энергетического

состояния молекул, участвующих в этом процессе. Активацией, сопровождающейся выделением, поглощением или переносом энергии. Энергии — в виде очень короткоживущего (или не очень) возбужденного, энергетически неустойчивого, а поэтому чрезвычайно реакционно активного состояния. Молекула фермента так организована, что все эти энергетически активные и неустойчивые состояния возникают в активном центре, который не только обеспечивает собственно катализ, но еще и охрану (себя и окружения) от несанкционированных реакций таких состояний. Энергетически активным и неустойчивым состояниям атомов (или атомных групп) все равно, на что сбросить избыточную энергию и перейти в устойчивое состояние. И если организация активного центра фермента не обеспечивает процесса «как надо» с переносом энергии «куда надо» и тепловым рассеиванием остатка от выполненной «правильно» реакции, то разрушится и сам фермент, и его окружение. Но даже в идеале, после определенного количества циклов фермент «портится» и в проточном режиме, когда нет недостатка в продукте, а метаболиты непрерывно удаляются, реакция затухает. Даже в этих условиях имеют место несанкционированные высокоэнергетические процессы, инактивирующие молекулу.

Вообще-то сколько-нибудь детальный анализ количества промежуточных метаболитов, образующихся в клетке (да еще с экстраполяцией на весь организм), приводит к таким невероятным величинам, что его, такой анализ, предпочитают не делать. Ибо если его произвести, то крайне неприятные выводы напрашиваются сами собой. Тем не менее, попробуем сделать такой анализ. Что такое клетка (любая реальная клетка человека — мышечная, фибробласт, гепатоцит и т. д.) по своему молекулярному (функционирующему в реальном масштабе пространства и времени) составу? Это примерно полтора метра общей длины ДНК, в составе которой имеется от 30 до 40 тысяч (по разным оценкам) генов. Из них примерно 10000 генов функционируют в каждый данный момент. В клетке (в среднем) примерно $10 \cdot 10^9$ молекул ферментов (со средним временем оборота 10 мс, которые должны работать согласованно по метаболическим цепям). Образуемые ими ежесекундно примерно 10^{11} промежуточных метаболитов: $10 \cdot 10^9 \cdot 10^2$ (из которых почти каждый по своему статусу «промежуточности» является высокоэнергонеустой-

чивым, химически высокоактивным, способным взаимодействовать с очень многими группами белков, нуклеиновых кислот, липидов и т. д.) по своей природе и «задачам» относятся к числу способных разрушать все структуры клетки. Ведь даже при расчете на условную «активную группу» такого метаболита (с молекулярной массой, усредненно оцениваемой в 34, т. е. эквивалентной перекиси водорода H_2O_2) и массе клетки 1 нг (что при удельном весе 1 составляет объем 1000 мкм^3) в сутки на каждую клетку придется масса «активных групп», почти в 500 (!) раз превышающая таковую самой клетки. Такая кажущаяся невероятной величина вытекает из следующих расчетов: 34 (масса H_2O_2) $\cdot 10^{11}$ (количество образуемых молекул метаболитов в клетке за 1 с) $\cdot 1,66 \cdot 10^{-24}$ (единица атомной массы, выраженная в граммах) $\cdot 8,64 \cdot 10^4$ (количество секунд в одних сутках) = $487,64 \cdot 10^{-9}$ г. Принимаемая усредненная масса клетки объемом 1000 мкм^3 составляет $\approx 1 \cdot 10^{-9}$.

Самые страшные по своей разрушительной силе, образуемые в организме при нормальном метаболизме агенты представлены перекисями и радикалами. А самым массовым их поставщиком является дыхание — использование кислорода для энергетических потребностей. При одноэлектронном пути утилизации O_2 в организме человека в сутки образуется 5,24 кг (!) перекисей и радикалов в количестве $9,6 \cdot 10^{25}$ молекул [17]. Как это происходит, хорошо видно на примере одного из путей восстановления O_2 (рис. 1). Но такая величина в общем пуле возникаемых в клетках перекисей и радикалов — лишь какая-то их часть.

В очень многих самых обычных реакциях образуется энергетический агент со столь необычными свойствами, что его и сегодня предпочитают сопровождать термином «гипотетический». Это гидрид-ион H^- . Он участвует в различных химических превращениях, являясь, таким образом, массовым промежуточным продуктом ферментативных процессов. Для успешного протекания биосинтетических реакций как обязательное условие образуются специальные «активирующие» группы, высокореакционноспособные и нестойкие при физиологических температурах тела. Но и большинство промежуточных продуктов реакций тоже высокореакционноспособны. И в большинстве случаев долго (даже в активном центре) они не сохраняются — прореагируют обязательно. Либо с самим ферментом, либо с его ближайшим окружением. А теперь

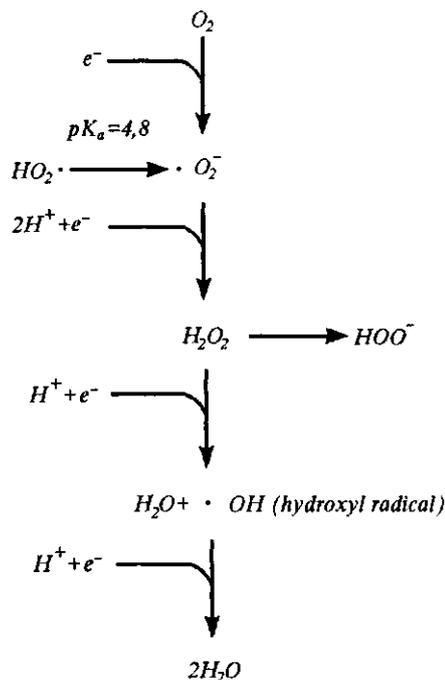


Рис. 1. Последовательность реакций при восстановлении кислорода по одноэлектронному пути [по 18]

экстраполируем все это на реальные и абсолютно надежно установленные в бесчисленных экспериментах процессы в клетке. Никакая диффузия ничего, даже в бесконечно далеком приближении, обеспечить для нормальной работы метаболического цикла не может. Время существования одного промежуточного продукта с химически активной группой («не самого по себе», а в активном центре фермента) очень мало: «среднее» время одной ферментативной реакции оценивается в 0,01 с. А в окружении других молекул с активными группами (и всех остальных, что и есть в своей совокупности клетка) такие группы прореагируют практически мгновенно. Никаких сложных процессов не будет. Это понимали давно. Но только относительно недавно было предложено то, что просто неукоснительно должно вытекать из самого факта существования биохимических циклов, — идею передачи промежуточных продуктов ферментами «из рук — в руки», т. е. непосредственно от одного активного центра предыдущего фермента строго в активный центр фермента последующего. История того, как к этому шли, очень интересна [19]. И так — по всем циклам и их взаимодействию. Вообще-то иначе и быть не может. При простой диффузии все эти освободившиеся промежуточные продукты с активными группами за считанные секунды разнесут

клетку в молекулярные клочья. Но как можно себе представить, согласно существующим представлениям, организацию такой передачи «из рук в руки»?

Возникает «интересный вопрос» — каким образом такое происходит?

Можно было бы, конечно, предположить, что фермент, проведя реакцию, удерживает образовавшийся продукт в активном центре и диффундирует с ним (т. е. перемещается и одновременно хаотически «кувыркается»), пока не встретит так же случайно диффундирующий (т. е. тоже как-то перемещающийся и «кувыркающийся») в компартменте следующий фермент метаболического цикла и, столкнувшись с ним, не вообще, а только в месте «активный центр к активному центру» передаст «из рук в руки» свой продукт, он же субстрат следующего фермента. И так — этап за этапом. Но такое нельзя воспринять ни с какими натяжками и допущениями (разве что в виде юмора на молекулярные темы). Нельзя потому, что такая картина независимо от состояния воды в клетке (как отмечалось выше) противоречит абсолютно всему, что хорошо установлено экспериментально и не вызывает никаких сомнений, — времени ферментативных реакций отдельных ферментов, времени нахождения образовавшегося из субстрата продукта в активном центре, времени прохождения всего цикла (от момента поступления субстрата к первому ферменту цикла до освобождения конечного продукта из активного центра последнего фермента цикла) и т. д. А ведь, кроме этого, каждый конечный продукт одного цикла должен переходить в цикл последующий. И лишь очень немногие продукты могут запасаться (и реально накапливаются) в клетке «впрок». И если в колбе (пробирке, капсуле) успешно реализуются отдельные ферментативные реакции (в достаточно редких случаях 3—4), то циклы — не идут никак. Даже в *in vitro* системах из экстрактов (гомогенатов, выжимок), т. е. в полуприродных комплексах, получают (за редчайшим исключением) только очень ограниченные, быстро затухающие (часто протекающие не так, как в клетке) метаболические процессы. Клетка — не колба со смесью всего, что в клетке есть. Чем же еще, кроме «общих соображений» относительно того, что все процессы в клетке пространственно организованы, колба, если в ней «все есть», отличается от клетки? И в чем конкретно эта организация? Из того, что известно, такой органи-

зацией могли бы (по своим свойствам) быть достаточно сложные белковые комплексы. И именно их выдвигают на роль механизмов организаций метаболических циклов. Но почти все они (по крайней мере, из известных) обеспечивают не метаболические циклы, а сложно и тонко настроенную регуляцию одного процесса, одной реакции. И все элементы, компоненты, домены и т. п. таких комплексов обуславливают взаимодействие с другими белками, регуляторными молекулами, цепями сигналинга, организуют начало, протекание, интенсивность, окончание отдельных реакций. А для метаболических цепей такие комплексы (на уровне всей цепи) неизвестны.

Выше принято как допущение, что в клетке свободной, подвижной воды достаточно для диффузии. И все ферменты могут свободно в ней перемещаться. Но перемещаться фермент с промежуточным продуктом в активном центре в ожидании, когда он случайно (по законам диффузии) столкнется точно с активным центром другого фермента, передаст ему «из рук в руки» свой полу- (четверть, осьмушку и т. д.) продукт, затем сам продиффундирует, пока не встретится с предшественником, чтобы получить точно из активного центра в активный центр новую порцию и, получив ее, станет диффундировать пока ... и т. д., может только на иллюстрациях, в компьютерном дизайне или на уроках рисования в школе. Даже самые приближенные оценки показывают, что долго фермент (почти любой) в активном центре активированный полупродукт не удержит. Реакционноактивная группа прореагирует. И сам фермент, и его ближайшее окружение будут микроразрушены. Даже при самой что ни есть благоприятной диффузии. Но диффундировать пришлось бы среди других макромолекул с их гидрофобными, гидрофильными, заряженными и т. д. группами, которые по своим связывающим (сорбирующим) свойствам перекрывают все созданные для очистки разных продуктов специальные и высокоактивные сорбенты. Да и сама молекула любого фермента несет такие группы. Ей и самой есть, чем взаимодействовать, и вокруг есть, с чем прореагировать. Свободная диффузия превращается в молекулярный слалом. Времени же на него для каждой молекулы фермента в реальной клетке отведено в циклах (очень усредненно) всего-то 10 мс. А физиологическое состояние в дополнение ко всему переводит содержимое клетки то в гель, то в золь.

И мы опять приходим к вопросу — как такое может быть?

Наиболее приемлемой (опять же с позиций современных представлений) была бы организация ферментативных процессов (в виде связанной жесткой последовательностью цепи переходящих один в другой промежуточных продуктов) на каких-то соответствующих белковых комплексах. Именно через посредство белковых комплексов сегодня пространственную организацию циклов так и представляют. Действительно, имеются гигантские многомономерные белки, ассоциированные с ферментативными процессами. Они сами конформационно подвижны и готовы к передаче своего продукта «из рук в руки». Как пример можно привести синтез АТФ (из ADP) или НАДН — убиквитиноксидаз. Они действительно обеспечивают минициклы. Но промежуточный продукт обрабатывается в самих таких комплексах. А передают то, что выходит из комплекса, «из рук» уже не «в руки», а в некое каналированное «свободное плавание», как в случае АТФ. Или куда-то «вообще», как в случае НАДН, — «в митохондриальный матрикс».

Имеются и гигантские подвижные макромолекулярные комплексы, способные перемещать «что-нибудь» на любые (по масштабам клетки) расстояния. Но движения таких систем уже теряют гибкость и становятся слишком медленными. Можно предположить существование белково-белковых сплошных систем передачи при процессах трансляции [20]. Сложные комплексы и очень короткие циклы (а часто даже не циклы) делают такие передачи реальными. Описано образование мультимолекулярных белковых комплексов, в которые входят некоторые ферменты, например, репликосома. Но в таких комплексах (действительно, очень лабильных) входящие в них неферментные белки выполняют контрольно-регуляторные функции по отношению к ферменту. Это надзор, а не перемещение. Для подавляющего количества ферментов и именно тех, которые участвуют в метаболических циклах, комплексы с другими белками вообще отсутствуют (по крайней мере, не описаны). А если и возникают, то, опять же, только в процессе регуляции и только временно.

Сами же ферментативные циклы в своей основной массе просто гигантские. Да еще все между собой сопряжены. Иначе никакого метаболизма не получится. И если для внутримембранной цепи электронного транспорта в силу особенностей пере-

мещаемого продукта, способного переноситься на расстояния, да еще с учетом структурной организации митохондриальных мембран, пространственное построение таких циклов еще как-то можно допустить, то для «материальных» (метаболических) циклов исходя из реально известного — такое допущение невозможно.

И тем не менее, передачу «из рук в руки» объясняют всегда и только за счет каких-то белково-белковых «сплошных» взаимодействий. Сплошных — в смысле непосредственно на всем протяжении расположенных рядом белковых молекул. Термин, предложенный вначале и сохраняющийся поныне, для такой передачи — «каналирование» — уже не отвечает имеющимся экспериментальным данным. Каналирование имеет смысл, по определению, как передача по каким-то каналам. В некоторых случаях каналы в виде внутримолекулярных полостей действительно описаны. Но они имеют место при передаче промежуточного продукта из одного активного сайта в другой в пределах одного сложного полифункционального фермента. Согласно корректным экспериментальным данным, транслокация продукта с одного сайта на другой в таких ферментах, как триптофансинтетаза, аспарагинсинтетаза и некоторые другие, осуществляется каким-то образом через внутримолекулярный туннель [21].

Так, например, туннель триптофансинтетазы имеет длину 25 Å (рис. 2), а перенос по нему осуществляется за счет аллостерических изменений в течение очень короткого времени — $\geq 1000 \text{ с}^{-1}$. Собственно такая структура и есть «канал». В тех же случаях, когда передача происходит внутри цикла (даже короткого), каналов как таковых не обнаруживают и механизм каналирования объясняют не каналами. Как пример можно привести очень детально описанный (с тонкими структурными определениями) перенос продукта центральным (в смысле расположенного в центре, а не главного по значению) ферментом (дигидроиноилацетилтрансферазы) в трехчленном (состоящем из трех ферментов) цикле дегидрогеназных комплексов 2-окси кислот. Для того чтобы шла передача из «рук в руки» (при концепции белково-белковых объединений), в ферменте должны быть подвижные «руки» (arm). Ибо сам фермент (и это показано в работе) не разворачивается в пространстве, он в комплексе неподвижен (кроме, естественно, аллостерических изменений). А расстояния между ак-

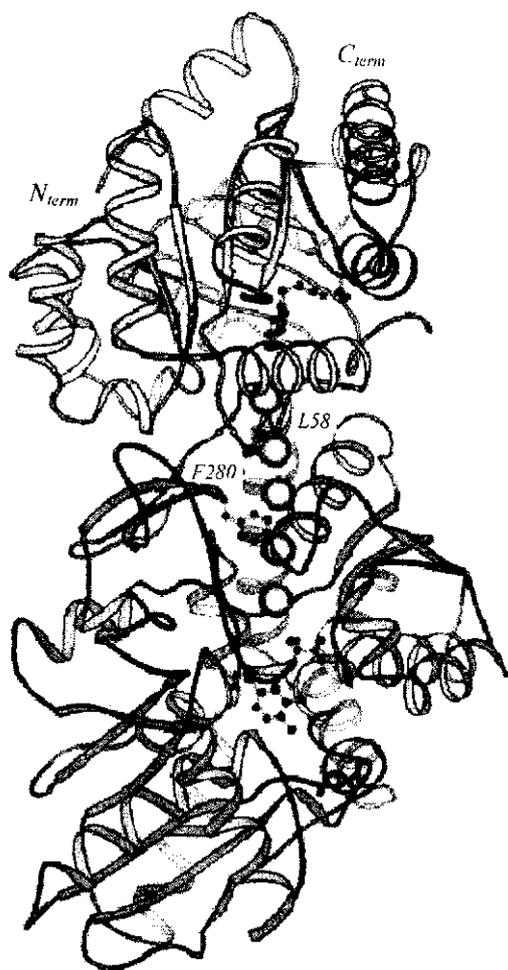


Рис. 2. «Туннель» внутри молекулы триптофансинтазы. Предполагаемый путь субстрата от одного активного центра к другому отмечен кружочками [по 21]

тивными центрами отдельных ферментов данного цикла, измеренные разными независимыми методами, достигают значительных длин. Например, для достижения дитиоланового кольца промежуточный продукт должен пройти до цели расстояние в 200 Å. Никакой «руки» для этого не хватит, и постулируется необходимость в дополнение к «руке» еще и присутствия протяженного подвижного линкера [22].

Но даже «рука» на линкере — не более чем некое пространственное пожелание, ибо активные центры создаются сложной трехмерной укладкой молекулы, состоят из разных, разнесенных по первичной аминокислотной последовательности участков и никак на «руке» находиться не могут (и не находятся). Поэтому непонятно, как перемещение «руки» может перемещать реакционноактивный

субстрат из активного центра одного фермента в другой. И это все возникает при скрупулезном структурном анализе только одного фермента минимально (всего три фермента) короткой цепи. В тех же случаях, когда описывают передачу из «рук в руки» в сложных циклах (для которых тонкие структурные построения неизвестны), ограничиваются просто кружочками (или иными фигурами) и постулируют, что это и есть каналирование. А сами циклы именуют «метаблонами», тем самым еще раз подчеркивая их белково-белковую пространственную организацию [23]. Наверное, в каких-то отдельных случаях такое тоже имеет место — нельзя исключить возможность существования для определенных задач чисто белкового каналирования. Несмотря на все слабые места и явные несоответствия, на основе имеющихся данных принципиально можно выстроить цепочку белково-белковых непосредственных передач из «рук в руки». Такая цепочка будет отличаться от представлений, обычно используемых для ее построения (подвижные «руки», гибкие линкеры и т. д.) Но для ограниченных задач выстроить ее можно внутренне не противоречиво и в полном соответствии с имеющимися данными.

Выше уже упоминалось, что имеются мультифункциональные ферменты с внутренним «туннелем». Как по туннелю, строго направленно может перемещаться химически активное соединение, не прореагировав «по дороге», да еще точно, «как надо», пространственно ориентировано попасть во второй активный центр, автор представить себе не может. Но передача из «рук в руки» при такой конформации вполне возможна по своеобразному «конформационно-пружинному» механизму. При прохождении реакции изменившийся (за счет этой реакции) продукт и освободившаяся (или поглощенная) энергия способны (пусть пока чисто теоретически) «сплющить» молекулу белка. Тогда активные центры белковой молекулы соприкоснутся, а «туннель» окажется тем пространством, которое наряду с общим изменением конформации пространственно разрешит такое сближение. После передачи — возврат в исходное состояние. А после реакции во втором активном центре — «конформационное растяжение» и передача в активный центр следующего фермента (рис. 3). Наверное, будут обнаружены и другие возможные построения. И, как это всегда имеет место в клетке, разные процессы дублируются и перекрываются. Но для

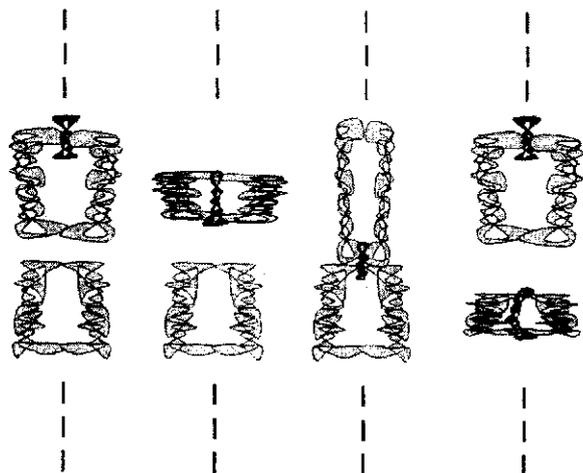


Рис. 3. Так можно представить организацию передачи «из рук в руки» по цепям на основе чисто белково-белковых непрерывных цепей. Такая организация возможна на основе двухцентровых ферментов. Наличие двух каталитических центров, канала внутри молекулы и конформации «пружинного» типа (сжатие молекулы, сближающее ее каталитические центры с передачей из «рук в руки», а затем растягивание — с передачей субстрата из каталитического центра одного фермента другому) позволяет в рамках известного построить белково-белковые цепи. Но для этого нужна структура белковой молекулы, имеющаяся у очень немногих ферментов

сложных, многоферментных циклов для передачи по всей цепи процессов из «рук в руки» на основе белково-белковых построений нет ни экспериментальных структур, ни адекватных теоретических расчетов.

Каждый цикл сам по себе — грандиозное построение (рис. 4). Но ни один цикл не существует автономно. Для своего функционирования они должны быть сопряжены между собой с высочайшей точностью — в пространстве, во времени и по массопотокам. Да к тому же каким-то образом совмещены в единый процесс по разным клеточным компартментам. А именно в таких (и только в таких) условиях реализуются метаболические циклы. Как такое может быть? Чтобы понять как, попробуем на языке конструкторов составить некие «технические требования», абстрагируясь от чего-то заранее обязательного (тех же только белково-белковых сплошных цепей).

«Технические требования» на пространственно-временную организацию метаболических циклов и их реализация в клетке. Первое требование уже известно — каждый фермент цикла должен получать от предыдущего фермента и далее передавать последующему продукт такой конвейерной переработки только «из рук в руки», т. е. непосред-

ственно из активного центра в активный центр. Следующее требование будет касаться механизма такой передачи. Должно быть некое «устройство», на котором закреплены молекулы ферментов цикла. Закрепление должно быть строго адресным — для каждой молекулы цикла конкретное «место посадки» — и достаточно прочным. Но несмотря на прочность, необходима легкая и быстрая при необходимости (например, в случае инактивации) сменность. При нарушении молекулярной структуры закрепленного фермента он должен «открепиться» и уступить место полноценному. «Устройство» должно менять свое пространственное расположение так, чтобы приводить в очень близкое, точно определенное место (назовем его «соприкосновением») два активных центра двух молекул ферментов: передающего обработанный продукт и принимающего его для дальнейшей обработки. Поскольку в цикле ферментов несколько (может быть 10 и более), то такая передача должна осуществляться строго последовательно и строго адресно. Наконец, должен быть какой-то сигнал для того, чтобы началось перемещение для соприкосновения каждой конкретной приемно-передающей пары именно в тот момент, в который предыдущая молекула фермента приняла продукт и начала его обработку. А время такого перемещения молекул пары ферментов «для соприкосновения» должно быть соизмеримо со временем обработки продукта в активном центре.

Диаметр молекулы среднего глобулярного белка очень приблизительно и очень усредненно можно оценить в 2 нм (20 Å). Величина оборотов большинства ферментов в метаболических циклах лежит обычно в интервале от нескольких десятков до нескольких сотен в секунду. Примем для простоты эту величину как некое среднее за 100. Тогда (чисто условно) среднее время обработки одной (промежуточной) молекулы продукта составит 10 мс. За такое время «устройство» должно свести приемно-передающую пару молекул ферментов и развести в исходное состояние (т. е. в соприкосновение с предшествующей для принятия от нее очередного промежуточного продукта), не мешая при этом независимым движениям всех остальных молекул ферментов цикла, которые в это время тоже обрабатывают свои промежуточные продукты и должны их тоже передавать «из рук в руки», т. е. соответствующим образом перемещаться. Для 10 молекул средним диаметром 2 нм общая

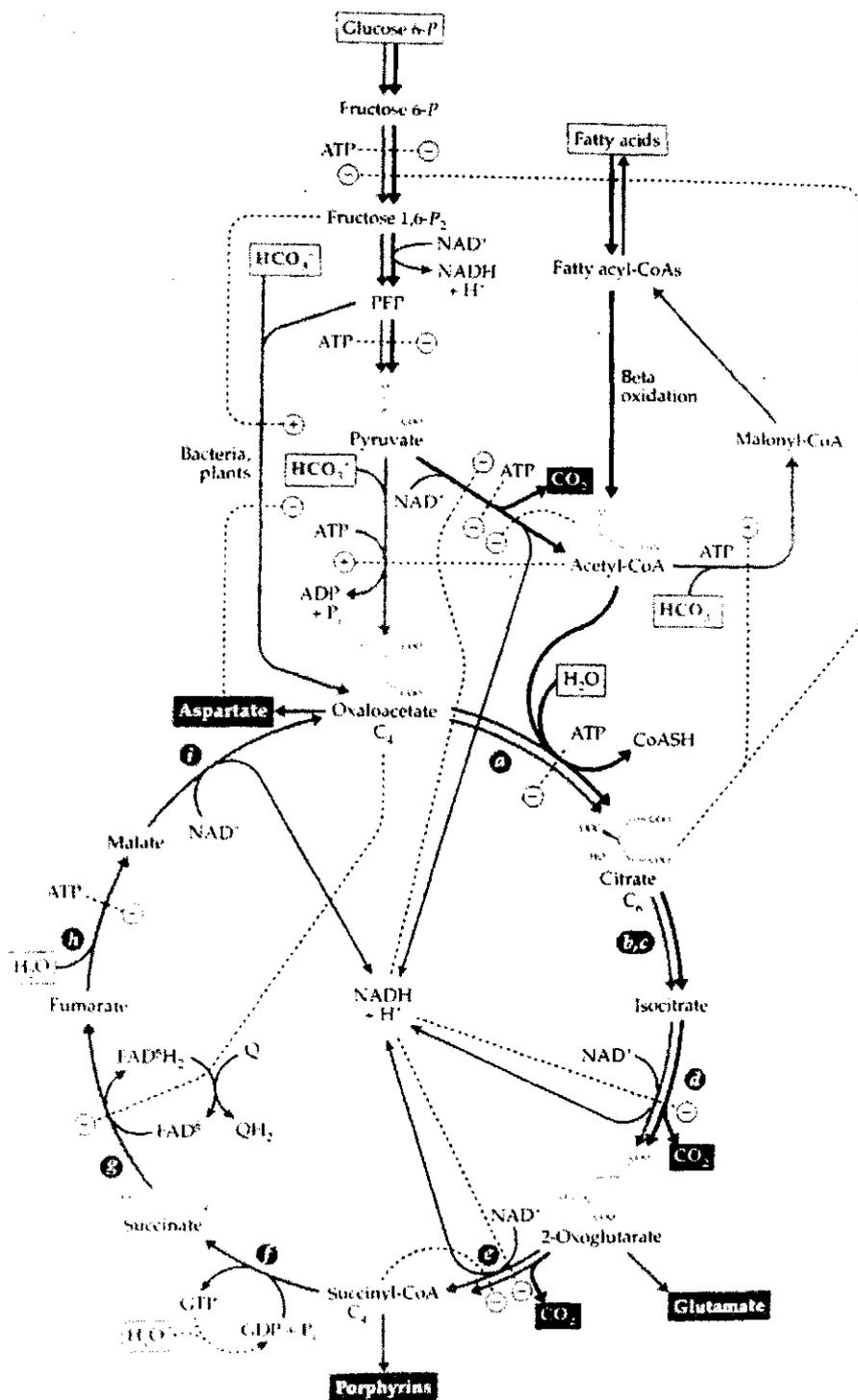


Рис. 4. Цикл Кребса [по 18]

длина составит 20 нм (200 Å). Но для перемещения должно быть еще какое-то пространство между молекулами. Даже если принять его равным размерам самих молекул ферментов, то весь такой «абсолютно минимальный» размер составит контурную длину 40 нм (400 Å). И так — для каждого

цикла. Теперь посмотрим, что может в клетке служить таким устройством. Как упоминалось выше, молекулярные белковые комплексы (по общей аналогии с праймосомами, репликативными комплексами и тому подобное) для этого не подходят (возможно, за некоторыми исключениями, которые

также рассматривались выше), так как не обладают способностью (и, скорее всего, вообще, по принципиальным ограничениям, не могут обладать) к таким многообразным быстрым, строго адресным перемещениям на требуемые расстояния вследствие уж очень громоздких мультимолекулярных построений. В клетке имеется великолепный набор подвижных сократительных белков цитоскелета. Но их перемещения строго квантованы и по состояниям, и по геометрии, да еще требуют энергии — АТР. Для перемещений молекул ферментов метаболических циклов они не пригодны. Имеется также очень сложный набор белков, составляющих ретикулум, и внутренние мембраны клетки, ограничивающие различные компартменты. Но ничего подобного «техническим требованиям» к перемещающим «устройствам» многих сотен различных метаболических циклов и их совмещений они не имеют. Хотя для закрепления фактически чего угодно, в том числе и перемещающих устройств, и коротких чисто белковых циклов, подходят (и реализуются) идеально. В то же время, учитывая общее количество всех молекулярных циклов всех метаболических цепей, количество перемещающих «устройств», молекулярные размеры и строжайшее соответствие каждому типу циклов (т. е. индивидуальности), а также их значительное разнообразие, становится очевидным, что они просто не могут оставаться до сих пор незамеченными. Они гарантированно давно хорошо известны, но для чего-то иного. А как «устройства» перемещения их просто никто никогда не рассматривал. Всем таким требованиям в клетке, с одной стороны, только, а с другой, — полностью отвечают РНК.

Наглядным примером таких возможностей является рибосома. В случае наиболее изученной бактериальной рибосомы ее малая (30S) субъединица организована 16S РНК, на которой в точных местах посадки находится около 20 белков. Большая субъединица (50S) организована 23S РНК, на которой (тоже в строго конкретных местах посадки) закреплено более 30 белков (в состав большой субъединицы входит также 5S РНК, обеспечивающая сочленение обеих субъединиц) [24]. Таким образом, приведенный пример большого количества строго конкретных мест посадки разных белков принципиально и практически подтверждается. Следующий существенный момент был установлен после того, как с использованием техники с высоким разрешением определили структуру функцио-

нально активированной малой рибосомной субъединицы. Обнаружено, что структурные изменения обеспечивают вытянутые спиральные элементы РНК,двигающиеся внутри такого сложного моно-РНК-мультиспирального комплекса [25]. Но рибосома (при всей своей конформационной лабильности в отдельных сайтах) в целом — весьма прочно объединенная субъединичная структура. По этому показателю она является неким относительно «структурно-стабильным рибонуклеопротеидом».

Примерами сменных и лабильных, но тоже строго локализуемых и до тех пор, пока они не выполняют своей функции, достаточно прочно закрепленных на РНК белков, могут служить «рибо-регуляторы». Они узнают специфические сайты и достаточно прочно с ними связываются. А при соответствующих воздействиях — отсоединяются. Свойства таких сайтов, их структура и специфичность вводятся уже как элемент идентификации различных РНК (VT Resource <http://bighost.area.ba.cnr.it/bia/UTRHome>). Такие лабильные комплексы можно назвать «адаптивно-функциональными рибонуклеопротеидами».

Как аналогия, для ДНК (очень близкой по составу к РНК, что аналогию оправдывает) таких сайтов в 5'-нетранслируемой области великое разнообразие — это все те элементы регуляции, которые определяют транскрипцию. Это все — отдельные частные примеры выполнимости в реалиях уже известных некоторых соответствий «ТТ на систему перемещения». Если же оценивать РНК по ее «принципиальным возможностям», то картина получается полная. По своим свойствам РНК (пока рассмотрим их как таковые, без привязки к какому-то конкретному типу) способны образовывать обширные, сложно организованные, легко кооперативно меняющиеся структуры как в целом, так и локально. РНК образуют структуры, узнаваемые различными доменами различных белков, с которыми они, РНК, могут образовывать (и реально образуют) системы любой степени сложности и практически абсолютной специфичности. РНК могут взаимодействовать между собой и закрепляться, заякориваться на специфических сайтах других структур (того же самого ретикулума, например). Все это так и все это хорошо. Но сегодня РНК известны почти все, поштучно. А с учетом выведенных последовательностей из полностью секвенированного генома вообще ничего неизвестного быть не может. Так где же эти самые «устройства»?

И здесь опять же приходится обратить внимание на хорошо известное. После того как технически стало доступным получение кДНКовых клонов информационной РНК, появилось очередное «очевидное невероятное». Началось все с экзонно-интронной структуры. Для части РНК все укладывалось в более или менее логически приемлемые рамки. Смысл мозаичности стал понятен, а колебание размеров интронов возводило в некий разброс. Но когда размеры интронов на порядки превышают размеры экзонов и все это молекулярное безобразие, требующее абсолютно неоправданного, бессмысленного расхода материала и энергии, тиражируемое в каждой клетке, бескомпромиссно поддерживается отбором на протяжении всего времени существования *Homo sapiens*, а до него — его предшественников, а до них ... и т. д., то возникает вопрос — а с чего бы это? И если бы только поддерживалось! А оно в ряде случаев с какой-то непонятной настойчивостью еще и увеличивается в процессе эволюции.

Так, интроны гомологичных генов *P38* и *JNK* у человека в среднем в 10 (!) раз длиннее, чем у губки [26]. Далее более. Оказалось, что не только интроны могут быть бессмысленно гигантскими. Довольно большая часть информационных РНК имеет очень странную структуру. С 5'-конца у них находится вполне умеренная нетранслируемая область, затем идет также вполне «разумных» размеров экзонно-интронная последовательность и все это занимает, ну, например, 500—600 нуклеотидов. А далее, после терминатора трансляции и до поли-А-тракта тянется категорически нелогичная последовательность в несколько тысяч нуклеотидов. Зачем? Например у FgF рецептора 1 такая 5'-нетранслируемая область (т. е. последовательность от стоп-кодона до начала поли-А-сайта) имеет размер 11172 нуклеотида [27]. И такое неразумное материально-энергетическое расточительство жестко поддерживается эволюционно. На чуть ли не бесконечных интронах, на многотысячных нуклеотидных последовательностях (охраняемых от деградации с 5'-конца структурной частью, а с 3'-конца — поли-А трактом) могут разместиться и как угодно перемещаться с реально требуемой скоростью молекулы ферментов любых циклов. И еще вдоволь останется места для закоривания на ретикулуме (или иных зонах клетки), объединения с «механизмами» перемещения других циклов и всего чего угодно еще. Тринуклеотид линейно имеет протя-

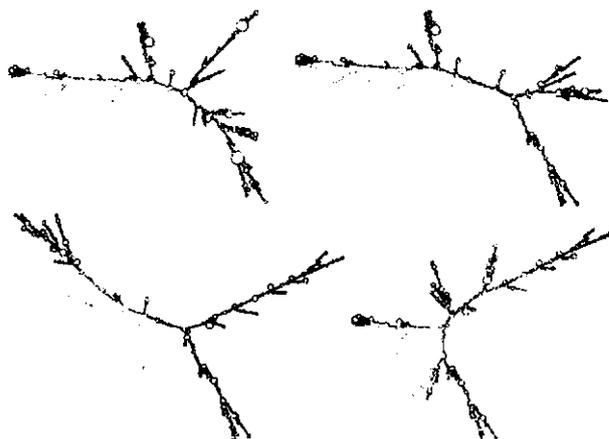


Рис. 5. Четыре произвольно выбранные структуры РНК фактора роста фибробластов I из 20 флуктуирующих конформаций с близкой энергией. Бледным серым тоном отмечена кодирующая часть общей последовательности; черным — некодирующая. Вторичные структуры мРНК человека FgF-1 построены с помощью программы Mfold (mfold server: 1995—2005, Michael Zuker, Renasselaer Polytechnic Institute, <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna>) на основании последовательности мРНК NM_000800, опубликованной NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Общая длина мРНК составляет 2259 п. н.; кодирующая область — 35—502 п. н. (468 п. н.). Соответственно 5'-нетранслируемая последовательность равна 34 п. н., 3'-нетранслируемая — 1757 п. н.

женность $\approx 10 \text{ \AA}$ (1 нм). Контурная длина РНК, состоящей из 3000 нуклеотидов, даст величину $\approx 10000 \text{ \AA}$ (1000 нм). А для «абсолютно-минимального» перемещающего устройства в случае цикла из 10 ферментов (как отмечено выше) надо в пределе всего-то 400 \AA (40 нм). Такого с лихвой хватит, если рассматривать только нетранслируемые области. Но ведь «механизмом» перемещения может быть и любая «обычная» информационная РНК вся целиком.

Как показывает анализ систем белок—РНК (сайты посадки РНК-зависимых РНК-полимераз, их терминаторов, регуляторов и т. д.), специфичность посадки белка на РНК обусловлена как пространственной структурой РНК, так и последовательностью оснований (хотя чаще всего эти факторы взаимосвязаны). Пока пространственную трехмерную (3D) структуру РНК строить не умеют. Но даже по двумерной структуре видны почти неограниченные возможности разнообразия структур доменов РНК. В тех же исключительных случаях, когда удастся корректно определить и вторичную, и третичную структуру РНК, становятся наглядно зримыми ее бесконечные конформацион-

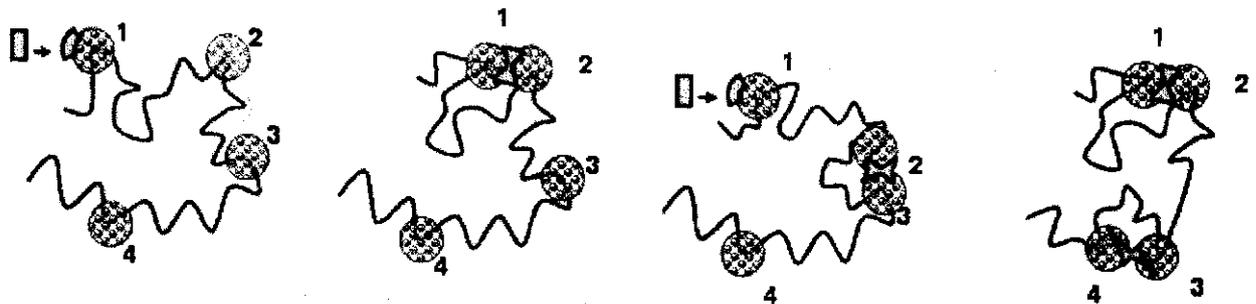


Рис. 6. Схематическое изображение предполагаемого варианта «системы перемещения». На нити молекулы РНК расположены ферменты. При их функционировании происходит локальное конформационное изменение РНК, обеспечивающее сближение молекул белков и передачу «из рук в руки» обрабатываемого субстрата

ные возможности. Таким уникальным случаем является определение пространственной структуры РНК в рибосоме и (уже на этой основе) корректное построение ее двухмерной структуры. По таким своим возможностям, как разнообразие доменов, РНК не уступает белкам. А, скорее, значительно превосходит их, несмотря на четырехбуквенный состав в отличие от двадцатибуквенного (по последним данным, двадцати одной) в белках. Но, с позиций анализа РНК как «системы перемещения», особое значение имеет конформационная подвижность и конформационное разнообразие одной и той же молекулы РНК в близких термодинамических диапазонах. В этом она не только не имеет себе равных среди всех биополимеров, но и просто-таки идеально подходит к требованиям для «системы перемещения». Почти любая протяженная РНК способна образовывать десятки различных конформационных структур в узких термодинамических рамках. И чем длиннее РНК, тем больше и разнообразнее набор ее конформаций. Для примера приведем набор только из четырех вторичных структур FgF1 РНК человека в диапазоне термодинамических величин (рис. 5), приводящих к флуктуирующим при физиологической температуре конформационным изменениям одной и той же молекулы. И при такой конформационной гибкости РНК обладает требуемой для выполнения своих функций устойчивостью к деградации. С 5'-конца она защищена всеми имеющимися для сохранения кодирующей части способами защиты. А с 3'-конца — поли-А-трактом, фланкирующим 3'-нетранслируемую область, каких бы размеров она ни была. А бывает, как отмечалось выше, она размеров просто-таки необъятных, никак не коррелирующих с областью кодирующей.

Так лабильность и многообразие конформационных состояний РНК могут обеспечить перемеще-

нием не то что практически, а даже теоретически все имеющиеся циклы. А время конформационных переходов у РНК меньше, чем время любой ферментативной реакции. Особенно если учесть, что для ферментативной реакции в циклах не требуется изменений всей конформации молекулы РНК. Нужны только (и их достаточно) локальные изменения для обеспечения той самой передачи субстрата «из рук в руки». Чисто условно такое можно представить схематическим рисунком в предельно упрощенном двухмерном изображении (рис. 6). Даже из общих соображений представляется просто невероятным, чтобы за 4 млрд лет эволюции такие возможности РНК не были реализованы жизнью.

Способна РНК обеспечить и сопряжение между циклами. Это может достигаться соединением между собой двух молекул РНК. Именно через РНКовое соединение функционально лабильно связаны между собой две субъединицы рибосомы [28]. Но описаны и нерибосомные соединения РНК, которые обеспечивают специальные белки [29]. По тем же общим принципам РНК-белковых взаимодействий, РНК может заякориваться и на матриксе (как одной молекулой с находящимися на ней ферментами цикла, так и сопряженными, в виде нескольких молекул). Поскольку же число циклов (при всей его значительности) ограничено, то на ретикулуме, внутренних мембранах может находиться конечное количество мест крепления РНК — носителей разных циклов. Сами же «места крепления» как ферментов, так и доменов, сочленения и заякоривания могут иметь строго организуемую локальную структуру, не меняющуюся при подвижности общей (или региональной) структуры РНК. По крайней мере, для определенных сайтов РНК такие строго принимаемые молекулой структуры описаны, рассчитаны и постулированы как важнейшие функциональные элементы [30].

Что же касается «включателей перемещения», то ими могут быть изменения конформации каждого связанного с РНК фермента в процессе ферментативного акта и возвращения в исходную конформацию при передаче субстрата в активный центр последующего фермента цикла, т. е. конформационная готовность принятия перерабатываемой молекулы от предыдущего фермента.

Изменение конформации РНК может осуществляться и под действием протонного переноса, возникающего в результате функциональной активности белков, находящихся в контакте с такой РНК. Очень существенно, что при этом изменение конформации возникает локально.

Так (пока только качественно) можно объяснить, как реально способна действовать молекулярная машина. Белково-белковые циклы как одна составляющая для коротких и ряда специализированных переносов и РНК-белковая как вторая составляющая для сложных (и, возможно, иных) переносов. Но даже качественное объяснение принципа ее действия позволяет понять, каким образом сложные, прецизионно точные, идеально согласованные, быстротекущие метаболические циклы организованы в пространстве клетки и ее компартаментах. Поскольку такое представление является новым, никто в этом направлении и не работал. Поэтому прямых экспериментальных подтверждений ему нет. Даже косвенных очень мало. Но кое-что все же имеется. Так, наличие очень больших некодирующих последовательностей РНК — факт, надежно установленный. И на вопрос — а зачем это? Зачем интроны имеют длину, часто во много (иногда в десятки и даже сотни) раз превышающую длину экзонов, ответа нет. Безусловно, альтернативный сплайсинг очень важен для разнообразия белков [31]. Но для этого более чем достаточно коротких (или хотя бы умеренных) интронов. Ведь на каждый лишний нуклеотид последовательности тратится энергия (и немалая). Уж что-то, а бессмысленное расточительство эволюция (в ходе естественного отбора) должна была бы убрать. И уж во всяком случае в эволюционном ряду миллиардолетий редуцировать. В действительности же все странным образом происходит «с точностью до наоборот» — интроны практически отсутствуют у прокариотов, появляются у эукариотов и размер их увеличивается по мере возрастания сложности организации [26]. Создается впечатление, что для чего-то такое усложнение необ-

ходимо. Очень интересны данные о протяженных нетранслируемых 3'-последовательностях. Кроме непонятных (с общепринятых позиций) размеров, они еще в ряде случаев имеют альтернативную длину. Она обусловлена альтернативной транскрипцией 3'-конца. И каждая такая альтернативная форма закрыта от деградации своим поли-А-трактом (для чего имеются предсуществующие альтернативные терминаторы с альтернативными поли-А-обеспечивающими сайтами). В исключительных случаях, когда все это прослеживается по циклу развития, выясняется и специфичность таких альтернативных 3'-нетранслируемых областей, которые иначе, как функциональными, не назовешь. Так, в соматических клетках мыши транскрипция гена β -4-галактозилтрансферазы дает две РНК размерами 3,9 и 4,6 тыс. н., а в клетках развивающихся половых зачатков самцов — 2,9 и 3,1 тыс. н. [32]. И такие различия имеют место именно за счет 3'-нетранслируемой области. Но в клетке имеется достаточно большой набор и тканеспецифичных, и РНК-подобных нетранслируемых РНК [33], функции которых никакого объяснения не имеют.

Со временем (а также при более тщательном литературном поиске) появятся и другие косвенные, а затем и прямые доказательства (как надеется автор). Но даже из общих пока представлений о составе и принципе действия молекулярной машины в части обеспечения «системы перемещения» можно сформулировать некоторые предположения как о формировании самой машины, так и о ее функциях. В плане формирования машины принципиальное значение имеет то, что 3'-нетранслируемая область и интроны (за исключением сайтов сплайсинга) могут изменяться вне связи с экзонами, т. е. с кодирующей областью. Это значит, что эволюционировать они могли под свои особые задачи независимо от эволюции транслируемого участка. У прокариотов такого нет. У них «система перемещения» и структурная область совмещены, а эволюция и изменчивость достигались горизонтальным переносом и только. Эволюция же многоклеточных требовала куда более сложной молекулярной организации и куда более длительной продолжительности жизни.

Кроме горизонтального переноса, необходимо обеспечение очень сложной альтернативности функций, обусловленной клетками различных типов. А время жизни в активном состоянии без деления

всех клеток в системе «многоклеточный организм» должно быть несоизмеримо большим, чем у одноклеточных (о связи «системы перемещения» и времени жизни несколько ниже). И началось развитие «системы перемещения».

Альтернативность размеров машины — это разные наборы «мест посадок», т. е. сборка метаболических циклов «под задачу». А задач у живого много — это и адаптация, и тканеспецифичность, и этапы развития, и многое другое. Альтернативность состава белков (альтернативные транскрипция, сплайсинг, редактирование и т. д.) — это одна составляющая, а наборы «мест посадки», т. е. формирование циклов из пула белков, — вторая. Она и более оперативная. При наличии ферментов, которым не на чем закрепиться для воссоздания цикла и вследствие чего они неактивны, достаточно только соответствующей альтернативной транскрипции соответствующей «машины перемещения» — и требуемый (под задачу) процесс может начинаться. Следует отметить, что сегодня нетранслируемым РНК уделяют очень большое (и непрерывно возрастающее) внимание. Так, кроме упоминавшейся выше иРНК-подобной группы, описаны (и сведены в специальную базу данных) 25 семейств нетранслируемой РНК [34]. Но всем им приписывают функции, не имеющие ничего общего с «механизмом перемещения» (или вообще ничего не приписывают). Да и самые обычные, хорошо известные иРНК с их альтернативным процессингом (альтернативный сплайсинг, транскрипция, редактирование и т. д.) способны, кроме известных матричных функций, выполнять разнообразные функции тканеспецифичных систем перемещения. Сами же такие функции перемещения могут совершенствоваться (за счет нетранслируемых областей) в процессе эволюции без изменений транслируемых участков гена (так же, как транслируемые последовательности могут меняться независимо от систем перемещения). Это значит, что хотя белки и системы их перемещения кодируются одними и теми же общими генами, но в то же время их эволюция протекает независимо. Кроме циклов, в клетке достаточно много и «нециклов». Многие такие «нециклы» связаны с обслуживанием ДНК. Это полимеразы, топоизомеразы, ферменты репарации и т. д. Но и они используют нуклеиновую кислоту как некий «элемент крепления», а в случае перемещения по ней или вдоль нее — еще и как направляющую. ДНК для них, с одной стороны,

субстрат, а с другой, — система крепления и перемещения. Не связанные с нуклеиновыми кислотами ферменты (и другие белки) имеют иные задачи, не относящиеся к массопереносу, поэтому у них могут быть (а часто и есть «на самом деле») другие молекулярные решения, причастные к обеспечению перемещения. Интересным примером такого решения служит протеасома. Она представляет собой крупную структуру типа «обратной рибосомы». Рибосома протягивает через себя иРНК и синтезирует на основе ее информации белок. А протеасома, протягивая через себя белок (за счет особенностей субстрата — нити аминокислот первичной последовательности белков), расщепляет его.

Теперь, проанализировав организацию циклов и принципы перемещения ферментов, субстратов, передачу «из рук в руки», можно понять особенность структуры воды в клетке. Поскольку системы перемещения, рассмотренные выше, функционируют как таковые, т. е. «сами по себе», то в широком диапазоне состояний вода для них принципиального значения вообще не имеет. Единственное требование к ней — не мешать (а лучше — способствовать) всем типам перемещений молекулярной машины. Вода в клетке, конечно же, абсолютно необходима, но ее роль имеет иной смысл, чем во многом принято считать. Вода уже в пределе, в монослое на макромолекулах (как это имеет место в цистах артемии, о чем писалось выше) обеспечит работу системы перемещения. Такое имеет место и для всех переносов «из рук в руки» на основе сплошных белково-белковых цепей. А дальнейшее ее реально необходимое для каждого организма и каждого типа его клеток количество — проблема надмолекулярной эволюционно обусловленной организации. Решается она уже с иных позиций.

И с учетом РНК как системы обеспечения реальной организации в пространстве и функционирования во времени метаболических циклов (а, возможно, не только их) функциональная геномика, функциональная протеомика и многое другое должны будут в значительной мере по своим подходам к расчетам (а концептуально — «локально») измениться. Если, конечно, развиваемые представления о «системе перемещения» подтвердятся. Все, что известно, конечно же, так, но только совсем иначе. Структурная часть генов определяет белки. А неструктурная — протяженные 3'-нетранслируемая область и интроны (а в некоторых случаях вся совокупность — и транслируемые и нетранслируе-

мые участки) — определяет, как белки будут (и будут ли вообще) функционировать. Не все, не всегда, но многие и часто. Это и есть «все, что известно, конечно же, так, но только совсем иначе». Так обстоит дело с молекулярной машиной. А теперь рассмотрим ее роль в одном частном, но очень важном приложении.

Нетрадиционное представление о влиянии генотипа на фенотип, фенотипа на генотип и последствий всего этого. Центральным событием, вокруг и ради которого построено все вышеизложенное, является старение. И, возможно, читатель уже обратил внимание на то, что анализ именно этого центрального события сколько-нибудь детально в предыдущих разделах не проводился. В общем, конечно, о нем упоминалось много раз, но так, вскользь, как о чем-то всем хорошо известном. И что такое старение, действительно знают все. И действительно, все очевидно. Ему, старению, посвящено безмерное количество публикаций, начиная с первобытных, дошедших до нас текстов. Только все это, включая полную очевидность, касается феноменологии. Казалось бы, уж что-что, а старение с его абсолютной безысходностью имеет ну просто-таки очевидные механизмы. Стареее все, закон природы не знает исключений и абсолютно не понятно, кто и в чем здесь может сомневаться. На самом же деле ясно только то, что в понимании механизмов старения, которые бы последовательной причинно-следственной связью объяснили первичные, исходные события с дальнейшей их цепочкой, ведущей к очевидной феноменологии, ясности нет. Все, что только известно науке или только предполагается, постулируется, утверждается и т. д., когда-то уже объявлялось «механизмами старения» [35]. Многое из всего этого какое-то частное отношение к проблеме и имеет. Но не более. Неопределенность начинается с определений старения как явления. Почти все определения состоят из самых общих фраз. Типа «угасания жизненных сил...» или «снижения функциональной активности...». Единственное четкое определение, учитывающее реальность и способное ее просчитать, принимает как конечную точку отсчета жизни — ее прекращение, т. е. смерть. И определяет старение через продолжительность жизни, т. е. фактически подменяет процесс его конечным результатом. При такой трактовке действительно многое просчитывается, но только на статистическом, популяционном уровне. Для популяции причины смертности дейст-

вительно разные. А для индивидуума всегда свои, конкретные. Если же убрать все эти частные причины, исключить несчастные случаи, радикально излечить ведущие патологии, создать идеальную экологию, полностью обеспечить все мыслимые бытовые и социальные условия, т. е. убрать все внешние неблагоприятные факторы и болезни, то, как показывает опыт тех единиц, которые все это реализовали, остается неустранимая природа старения — полное одряхление организма, при котором существование становится уже несовместимым ни с какими его самыми распрекрасными условиями. Вот такой «сухой остаток» и принимается как старение. И именно его механизмы, его первооснову и пытаются объяснить теории, которые в пределе сводятся к двум группам — стохастической (сумме нехороших случайных событий) и программируемой (старение — это заложенная природой, эволюцией и т. д. программа). Иногда, правда, их пытаются объединить по принципу: старение — это программа случайных событий. В сверхкратком анализе попробуем разобраться, что приводит к убеждению в правильности каждой из этих групп теорий (или что лежит в основе таких представлений) и какие противоречия не позволяют ни одной из них объяснить старение.

Представления о том, что смерть индивидуумов (всех и у всех видов) запрограммирована, основаны как на неких общих соображениях, так и на достаточно своеобразном, но совершенно достоверном экспериментальном материале. Общие соображения сводятся к тому, что старые организмы занимают экологическую нишу, имеющую вполне конечную емкость для заселения, и, таким образом, «не пускают» в жизнь молодняк. Поэтому смерть предусмотрена программой, так как «полезна для вида». И как яркие примеры тому приводят бабочек, которые, заложив будущее потомство, тут же отмирают, поскольку в них (стало быть, чтобы не уклонялись от немедленного самоуничтожения) даже не предусмотрены органы питания. Что есть в запасе от куколки, на том (и столько времени) живут. Или, как пример, однолетние растения — сезон прожили, семена образовали и умерли по программе. Варианты — растения двухлетние (но с тем же исходом) или многолетние, но обязательно погибающие сразу после единственного плодоношения. Все это так и все это имеет место. Но только к старению никакого отношения не имеет. Включается не старение, а самоуничтожение в молодом, т.

е. полном сил возрасте. И зачем это надо виду, абсолютно непонятно, так как близкие виды и цветут, и живут, и многократно плодоносят, что не мешает их потомству.

Другая группа примеров связана с очень хорошо изученной запрограммированной клеточной смертью в организме (представителей разных видов, в том числе и человека). Это — апоптоз. Программа самоуничтожения клеток по пути апоптоза очень совершенна. Но апоптоз как пример запрограммированной смерти к старению (по аналогии) тоже никакого отношения не имеет. Клетки самоуничтожаются в любом возрасте (начиная с эмбриогенеза), что либо необходимо для развития, либо происходит вследствие каких-то (но совершенно конкретных) событий, делающих их потенциально опасными для организма. Программа смерти клеток нужна, чтобы организм жил дольше, а не меньше. Но, пожалуй, наиболее «любимым» примером именно запрограммированного старения является обнаруженная еще Хелфиком ограниченность числа удвоений клеток человека (так называемый лимит Хейфлика). Когда обнаружили механизм такого явления — укорочение теломер с каждым делением соматической клетки за счет инактивации в них теломеразы, тут же провели, казалось бы, безупречную экстраполяцию на весь организм: старение — это следствие укорочения теломер и прекращения деления соматических клеток. Но даже такая, на первый взгляд, безотказная теломераза, ослабление которой при старении приводит к замедлению, а затем и полному прекращению репликации клеток, и та ведет себя только «внешне прилично». А когда взялись за нее всерьез и получили нокаутных по теломеразе мышей, то они совершенно непристойно не приобретали фенотипа ускоренного старения, хотя в целом (том самом «среднем») продолжительность их жизни и снижалась. Но не из-за одряхления, «неделимости» клеток, а от совершенно иной причины — повышения нестабильности генома [36], которая приводила к различным (особенно онкогенным) тяжелым патологиям. Если же соматические клетки стимулировать каталитической составляющей теломеразы TERT, то это может привести для клетки к очень непростым последствиям, поскольку она (каталитическая составляющая теломеразы) ассоциирована с активностью клеточного онкогена *c-мус* [37].

Вообще же вся эта история с теломеразой, к

которой пытаются свести старение, имеет смысл только для получения финансирования. В организме клеточное добавление/замещение осуществляют стволовые клетки, у которых теломераза активна и теломеры исправно восстанавливают свои размеры. Что же касается дифференцированных соматических клеток, то укорочение теломер приводит к прекращению удвоения в культуре — репликативному старению, которое может иметь отношение только к клональной экспансии.

Есть и иные аргументы, но они противоречат другим хорошо установленным фактам. Но если такая программа действительно бы существовала в организме человека, то это создало бы идеальный вариант достижения бессмертия. Достаточно выключить (заменить, добавить и т. д.) несколько генов — и бессмертие станет повседневностью. Да и просто по чистой случайности мутации воспроизвели бы какое-то количество молодых, цветущих, не стареющих, бессмертных индивидуумов. К сожалению, истории ничего об этом не известно. И у других видов такого нет. А жаль.

Вторая группа теорий — стохастическая. И хотя она подразумевает все виды случайных нарушений, затрагивающих все виды макромолекул, центральное внимание все же уделяется геному клетки. Связано это с тем, что в клетке непрерывно и очень мощно самообновляются все макромолекулы и структуры. Но первоосновой, с которой начинается такое самообновление, является информация, носителем которой есть ДНК. Информация полноценная (ДНК не изменена) — самообновление полноценное. Информация нарушена (ДНК изменена) — самообновление происходит с вовлечением в него теперь уже неполноценных макромолекул, их комплексов, структур и т. д.

Логика стохастических теорий «в общем виде» старение объясняет: мутации накапливаются, ферменты начинают работать все хуже, самообновление приводит к накоплению все большего количества «испорченных» макромолекул и т. д. И в таком общем виде все вроде бы правильно. Но старение — это постепенное одряхление. Реально же обнаруживаемым количеством мутаций и реально обнаруживаемыми изменениями ферментов объяснить одряхление нельзя. Если попытаться вывести одряхление организма из описываемых мутаций (как количественно, так и качественно) и последствий таких мутаций, то внутренне не противоречивой причинно-следственной связи не пол-

учится. Современные представления о мутациях и одряхление оказываются несовместимыми.

Вот некоторые противоречия стохастических представлений. Определение количества мутаций в соматических клетках разных органов на специальном введенном репортерном гене у трансгенных (по этому гену) мышей разного возраста показало, что оно близкое по величине. И у молодых (3,5 месяца), и у старых (32 месяца), т. е. фактически дряхлых, мышей частота определяемых мутаций составляла единицы $\cdot 10^{-5}$ и была у старых (дряхлых) всего в 3—4 раза выше, чем у молодых [38]. Столь небольшое различие никак не укладывается в причины одряхления. Это совпадает и с активностью ферментов. Определение их активности и у животных, и у людей молодого и старого возраста показывает «полный разброд». Активность одних ферментов падает, других — не меняется, третьих — возрастает [39]. А ведь произвольно идущие мутации должны были бы, согласно существующим представлениям, гасить активность всех и «в среднем» одинаково. Да и основа основ — система репарации (правда, в модельной системе старения — культуре человеческих диплоидных фибробластов кожи и трабекулярных остеокластов), оцененная по уровню репарации УФ-индуцированных повреждений (как общей, так и отдельных индивидуальных генов домашнего хозяйства), не различалась у молодых и старых клеток [40]. Так почему тогда идет старение?

Таких несоответствий уже накопилось немало. Но здесь как пример, который в последнее время вообще почти никогда не приводят (уж больно он «ни в какие ворота» теорий не входит), можно упомянуть крайне необычные материалы столетней давности — первые опыты (на людях) по «омоложению», начатые Штейнкоком и продолженные другими [41]. У пожилых мужчин (таких нашлось не много, но достаточно для демонстрации эффекта) проводили перевязку половых протоков. Результаты часто оказывались фантастическими — восстанавливались все функции, включая внешность. «Омоложение» происходило фенотипически буквальное. Но цена его всегда была непомерная. Через несколько месяцев наступало крутое одряхление с быстрым трагическим финалом. Что же происходило, если попытаться совместить это с современными стохастическими теориями? Исчезли мутации? Конечно же, нет. Так почему же произошли такие обратные старению фенотипические

изменения? Разве фенотип не есть результирующая генотипа? А если уж изменения произошли, то почему так ненадолго и с таким «вдруг» обвальным одряхлением? Нехорошо как-то все это. Но сам факт фенотипического реверса возраста (пусть даже временного) показал его принципиальную возможность. И это — несмотря на накопленные мутации. Хорошо было бы понять причину финала — стремительного (быстрее, чем при прогерии!) одряхления. Ведь и ко взлетам и к падениям причастны какие-то механизмы. Какие? Жаль, что существующие представления здесь «не работают».

В то же время в стохастической теории старения «что-то есть». Пусть «в общем», но одряхление она объяснить пытается. Надо понять, что же отсутствует в представлениях, не позволяющих внутренне не противоречиво воссоздать всю цепочку событий от изменения состояния генома клеток до одряхления. Попытаемся еще раз разобраться в мутациях.

Мутагенез изучен чуть ли не исчерпывающе. Но имеется один участок данного процесса, которому не уделяют сколько-нибудь существенного внимания. И не потому, что он методически непомерно сложен, а в силу его полной очевидности. Это — промежуток времени между возникновением повреждения (нарушения) в ДНК и его репарацией. Промежуток же такого времени насыщен определенными событиями. События эти лежат вне механизмов и мутагенеза, и репарации. Они как предмет исследования оказались «ничейными». На них и не обращают внимания. Ну есть промежуток, так ведь иначе и не бывает — все совершается во времени. Но именно эти события, их зависимость (качественная и количественная) от времени между повреждением ДНК и репарацией для многих процессов являются определяющими. Подавляющее большинство нарушений ДНК (практически все виды повреждений, кроме делеций и двунитчатых разрывов) репарируется чаще всего правильно. И число мутаций (т. е. неправильно зарепарированных повреждений) по отношению к количеству повреждений, которые возникают и репарируются, ничтожно мало. Но между возникновением повреждения и его репарацией проходит время, часто, по масштабам внутриклеточных процессов, весьма значительное. И пока повреждение не зарепарировано, оно функционально блокирует транскрипцию, т. е. фенотипически проявляет себя как мутация. И не как мутация вообще (т. е. любое

изменение в последовательности, включая синонимические замены оснований), а как мутация, полностью исключающая появление функционально полноценного продукта. При мутациях физическое появление продукта (т. е. продукта экспрессии такого мутантного гена) в подавляющем большинстве случаев имеет место, но нарушена (да и то далеко не всегда, а только при мутациях с ярким фенотипическим проявлением) его функциональная полноценность. А при повреждении, начиная с момента его (повреждения) появления и до репарации (любой) — правильной, т. е. с полным исправлением, или неправильной, т. е. с реализацией повреждения в мутацию, транскрипция вообще не происходит, она стопорится на повреждении. И пока репарация не произойдет, основания ДНК не примут своей привычной для ДНК-зависимой РНК полимеразы пространственной структуры, продукт гена не синтезируется, ибо это время он (как вновь синтезируемый) отсутствует физически. Поскольку же повреждений возникает (и какое-то время существует) на порядки больше, чем реализуемых (вследствие неправильной репарации этих повреждений) мутаций, то фенотипически идентичный мутациям эффект при одинаковой скорости репарации будет зависеть от количества повреждений. Попробуем оценить, что это значит количественно. Количество спонтанных повреждений на геном каждой соматической клетки человека колеблется, по разным оценкам, от 120000 до 300000 в сутки. Условно среднюю величину оценим в 200000. Примем, что среднее время репарации одного повреждения составляет 1 ч. За 1 ч в геноме клетки произойдет $\approx 8,3 \cdot 10^3$ повреждений. Сегодня считается, что в геноме человека имеется ≈ 40000 генов, которые (в пределе) занимают 5 % его общей величины. Гаплоидный геном человека состоит из $\approx 3 \cdot 10^9$ п. н. Таким образом, на некий абстрактный средний ген приходится $3,75 \cdot 10^3$ п. н. Но геном соматической клетки диплоидный. В нем $\approx 6 \cdot 10^9$ п. н., и одно повреждение за 1 ч придется на $\approx 7,2 \cdot 10^5$ п. н. Это составляет одно повреждение на 200 генов. Примерно 10 % генов обеспечивают жизнеспособность клетки, составляя ее «домашнее хозяйство». Таким образом, непрерывно (!) в каждой клетке (!!) 20 жизненно необходимых генов (обеспечивающих метаболизм клетки и соответственно всю систему деградации—восстановления) не функционируют (если функционально активны оба аллеля, то в данное время не функционирует один

из них). А если еще и скорость репарации замедлится, то от произведения этих величин. Хотя яркость проявления повреждения будет ослаблена за счет ранее (до нарушения в гене) синтезированных продуктов (убывающих числом без «подпитки» из-за остановки синтеза и, там, где возможно, вторым аллелем). Приходится вводить новое понятие — динамическое феномутационноподобное состояние. И хотя такие события происходят в геноме, но состояние это охватывает всю клетку, так как геном — первооснова всех последующих событий. Клетка функционирует в условиях постоянного (и массового), но флуктуирующего мутационно-имитированного процесса. Как пример, в культуре клеток НЕК293 при УФ облучении возникают массовые повреждения ДНК. Они в основном восстанавливаются, но далеко не сразу — 1,4 УФ повреждений на 1000 нуклеотидов ДНК в среднем за 12 ч [44]. А пока не репарированы, для гена — это нарушения такие же, как в случае инактивирующей мутации — ген не функционирует. Ген «ждет» репарации. И пока она не произойдет (все равно какая — правильная или неправильная) транскрипция заблокирована. Поэтому неудивительно, что транскрипция «торопит» репарацию, облегчая ее, давая «целеуказание» на поврежденное место, сигнал о таком повреждении, обуславливает «склонность» поврежденного гена к его восстановлению [45].

А теперь спроецируем такое состояние на процесс старения. Согласно стохастическим представлениям, старение — это следствие накопления случайных повреждений макромолекул. Поскольку же динамическое феномутационное состояние (да плюс еще и мутации «в чистом виде») распространяется на все клеточные процессы в виде недосинтеза макромолекул, то теперь надо найти следующий этап всей цепочки, ведущей к одряхлению. Но перед этим определимся с тем, что же такое одряхление, если его рассматривать на «следующем» молекулярном уровне, т. е. не на первооснове всех процессов — ДНК, а на уровнях последующих (но еще молекулярных и надмолекулярных). На молекулярном уровне — это массовое, усиливающееся со временем, стохастическое (но тоже молекулярное) повреждение всех макромолекул, ведущее к замедлению и нарушению осуществляемых ими процессов и состоящих из них надмолекулярных образований с (в свою очередь) нарушением функций таких надмолекулярных образований и

образуемых ими субклеточных структур с (в свою очередь) и т. д. Что же может быть причиной (не первопричиной, т. е. событиями на уровне генома) той непосредственной, «послегеномной», «последней» составляющей, которая обуславливает усиливающиеся со временем повреждения макромолекул? Такой причиной в цепи событий между геномом и одряхлением является то, на что не обращают внимания — динамичность состояния. Но теперь уже динамичность состояния не ДНК, а других макромолекул.

Одряхление — это непрерывно нарастающее увеличение разрыва во времени между повреждаемостью макромолекул, их надмолекулярных структур и т. д. и их исправлением, ресинтезом, восстановлением. Увеличение разрыва в повреждающе-восстановительном динамическом состоянии на уровне фенотипа. Повреждающе-восстановительно, а не неисправимого принципиально. Возрастающее уровня (т. е. абсолютного количества) поврежденных макромолекул, которые можно заменить неповрежденными и которые непрерывно действительно замещаются. Но с все меньшей и меньшей скоростью, приводящей к накоплению поврежденного материала. Имеются ли какие-нибудь экспериментальные подтверждения таким представлениям? Имеются и очень показательные.

Так, например, при ингибировании протеасом происходит преждевременное старение нормальных фибробластов человека со всеми признаками, свойственными одряхлению [46]. При снижении активности протеасом снижается скорость разрушения белков, т. е. замедляется их самообновление. А скорость нарушений остается прежней. Результатом является увеличение разрыва между повреждениями и ресинтезом, накапливаются нарушенные макромолекулы.

В рост уровня нарушений и их разнообразие феноменология одряхления (и молекулярная, и общеорганизменная) укладывается вполне. И остается последнее (перед геномом как первоосновой) звено цепи событий — каков механизм, обуславливающий такое нарастание разрыва?

Выше уже отмечалось, что разнообразие и общее количество энергоемких промежуточных соединений цепей ферментативных процессов в клетке исключительно велико. Немало образуется и конечных высокоэнергетических соединений. Даже сигнальные молекулы могут представлять собой перекисные и радикальные формы. Клетка, если

рассматривать ее с позиций содержания в ней в каждый момент времени за счет непрерывного (в течение всей ее жизни) образования высокоактивных химических соединений, в пересчете на единицу массы является своеобразным «эталоном». На 1 г сухой массы ткани человека в сутки образуется (в сумме — за счет распада и ресинтеза) только одного АТФ 3 г. А человек весом 70 кг, потребляющий за одни сутки 3000 калорий, производит $2 \cdot 10^4$ эрг \cdot г $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$ энергии, что на четыре (!) порядка (!!) больше, чем производит энергии 1 г массы Солнца — 2 эрг \cdot г $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$ [47]. Поэтому в норме, при идеально сбалансированном метаболизме, чему повреждать макромолекулы имеется в избытке. Да и сами повреждения полностью перекрывают все возможные их типы. А единственно возможной (и реально функционирующей) системой устранения всего, что повреждено, является самообновление, непрерывная и массовая деградация поврежденного материала и его замена вновь синтезированным. Непрерывно и тоже массово. Поскольку же повреждения возникают самые разные, то далеко не все их могут опознать системы избирательной (т. е. только нарушенных макромолекул) деградации. А убирать надо. И в клетке это решается радикально — деградирует все, но поврежденное — избирательно и быстро, а все без разбора, чисто статистически — относительно медленно [48]. Такой принцип деградации предопределяет небольшой срок жизни всех макромолекул и их надмолекулярных образований. А чтобы такая деградация не нарушила (вместо помощи) всех процессов, то с такой же скоростью (т. е. каким-то образом синхронизированно) происходит непрерывный синтез всех этих макромолекул и образование ими идентичных надмолекулярных комплексов (или замена в таких комплексах старых, деградировавших макромолекул, вновь синтезированными). Клетка непрерывно сама себя разрушает и воссоздает заново [49]. И происходит это в каком-то вполне конкретном диапазоне возможностей.

Запас мощности воссоздания нового в молодой клетке (молодого организма) должен компенсировать (и реально компенсирует) весьма широкие колебания разрушительных воздействий, возникающих внутри самой клетки (всякие нарушения метаболизма) и достигающих ее извне. Если же компенсация невозможна, повреждений слишком много — включается апоптоз, та самая программа самоуничтожения. Но апоптоз — это крайний слу-

чай. Если им увлечься, то весь организм очень быстро превратится в сплошной комок растекающейся слизи. В организме имеются сигналы, не только включающие в клетках апоптоз, но и запрещающие его. Поэтому далеко не всегда при избыточных нарушениях клетка само- (или не само-) уничтожается. А вот количество агентов, разрушающих макромолекулы, таких ограничений не имеет. Даже теоретически, при самом идеальном ферментативном процессе какая-то (пусть самая ничтожная) часть промежуточных метаболитов, т. е. реакционноактивных соединений, уходит из активного центра. Такая утечка в значительной мере и вызывает повреждения макромолекул. И как бы ни был мал процент подобной утечки, с учетом всех ферментов в клетке и скорости катализа количественно он весьма значителен. Ферменты — разные, скорость их оборота — разная и время жизни — тоже разное. Но статистика позволяет все усреднять. При оценке сложных событий это становится необходимым.

Выше уже отмечалось, что при работе фермента «очень средне» он через 1000 циклов процесс прекращает. Что-то с ферментом происходит. Такое возможно только за счет утекающих метаболитов, реакционноспособные группы которых реагируют с молекулой фермента теперь уже не в активном центре (или в нем, но несанкционированно). Это значит, что как минимум один реакционноактивный промежуточный продукт из 1000 (т. е. 0,1 %) утекает и вызывает повреждение. На самом деле их должно быть существенно больше — вероятно, для повреждения фермента продуктов, вызывающих повреждение, не может быть строго 1:1. Примем минимум (но тоже «в среднем») — один утекающий продукт разрушает фермент, такой продукт производящий, а еще один утекающий идет на разрушение другой макромолекулы. И будем учитывать только этот «другой». Из вышеприведенных расчетов следует, что в сутки масса только одних реакционных центров утекающих промежуточных метаболитов составляет половину массы клетки (общее количество образуемых метаболитов примерно в 500 раз превышает массу клетки, а утекает (и идет на повреждение других макромолекул) $\approx 0,1\%$ их общего количества). Но клетка примерно на 75 % состоит из воды. В ней лишь 25 % сухого вещества (в основном макромолекул). Значит, в сутки на них обрушивается двойная масса активных групп! Это (в абсо-

лютно минимальном варианте) сотни активных групп на каждую макромолекулу (масса средней макромолекулы в сотни раз превышает массу принятой «активной группы»). И все они с чем-то реагируют. Самое же существенное то, что утечка зависит от совершенства организации циклов, их точной и взаимосогласованной работы. А это означает, что уже по самой своей природе функционирования циклов нарушение слаженности в них увеличит утечку промежуточных метаболитов.

Организация молекулярной машины — система перемещения ферментов в цикле для точной и оперативной передачи «из рук в руки» — основа жизни клетки. Но она же — и ее слабость. Ибо нарушения в системе перемещения неизбежно будут нарушать слаженность цикла и увеличивать, как следствие такого нарушения, утечку метаболитов. Что такое «норма» и что такое «нарушение» для молекулярной машины? Норма — это та реально существующая минимальная утечка метаболитов, которая происходит из активных центров ферментов метаболических цепей при реальной работе без дополнительных помех. Норма — это те самые сотни активных групп на каждую макромолекулу в сутки. Тот уровень, с которым в норме справляется система круговорота (разрушение—воссоздание). Для такой нормы и сами ферменты, и система их перемещения должны обеспечивать максимальную точность процессов. Ферменты — осуществлять присущие им реакции, система перемещения — прецизионно точно в пространстве и строго «по командам» от ферментов во времени обеспечивать «пожатие рук» — соприкосновение активных центров передающего и принимающего промежуточный субстрат цикла, а затем — возврат в исходное положение и т. д.

Какие могут быть нарушения в таком комплексе? Для фермента — это нарушения в активном центре; доменах, обеспечивающих посадку на систему перемещения; доменах, обуславливающих белково-белковое узнавание (соприкосновение активных центров, взаимодействие с регуляторными белками и т. д.). Для белков многие такие нарушения известны и система элиминации нарушений за счет замены самого белка, имеющего нарушения, тоже известна. В системе перемещения нарушениями могут быть нуклеотидные замены, изменяющие пространственную структуру РНК, «несанкционированные» взаимодействия с другими молекулами, изменяющими конформацию, и, наверное,

многое другое. Но самое очевидное — это изменение в составе за счет нуклеотидных замен. При таких нарушениях крупное изменение пространственной структуры РНК или изменение положения на ней фермента цикла, по логике процесса, должно сразу же вызвать полный развал «элементарной системы» и деградацию РНК (сразу или не очень). А до такой деградации РНК будет уже нефункциональной и потому неопасной для клетки. К иным результатам приведут нарушения, не очень сильно (или очень слабо) влияющие на пространственную структуру РНК и перемещения ферментов цикла. Незначительная неточность пространственного соприкосновения, вызывающая некоторую задержку белково-белкового связывания (активных центров), изменение времени перемещения в пространстве домена РНК с ферментом цикла и т. д. будут приводить к увеличению процента утечки промежуточных метаболитов и усилению повреждаемости макромолекул. Такие же последствия будут вызывать и небольшие изменения (за счет мутаций) в молекулах ферментов, организующих последовательные процессы за счет передачи из «рук в руки» на основе чисто (и только) белково-белковых взаимодействий. И если такие нарушения будут нарастать (почему — рассмотрим несколько ниже, при анализе последнего звена цепи), то через какое-то время они превысят компенсаторные механизмы самообновления. Начнет увеличиваться разрыв между повреждением макромолекул и их надмолекулярных комплексов, с одной стороны, и ресинтезом, — с другой. Если такой разрыв будет увеличиваться, то количество поврежденных макромолекул и их комплексов будет накапливаться, т. е. начнется путь к одряхлению.

Так нарастанием уровня нарушений в системе перемещения молекулярной машины можно объяснить одряхление. Остается последнее звено — чем объяснить возрастание таких нарушений в системе перемещения? Таким звеном является геном, но теперь уже в несколько ином, чем принято, контексте. Мутации «вездесущи». Они идут везде, по всему геному. Но практически всегда их определяют только в кодирующих регуляторных последовательностях генов и отвечающих за сплайсинг участках интронов. Нетранслируемые протяженные последовательности (интроны и 3'-участки) с позиций содержания, накопления и темпов мутаций не исследуют. Это все, по современным представлениям, — «незначимые последовательности». Так за-

чем на них тратить время и средства? Но именно они (не все, конечно) определяют нарушения в системе перемещения ферментов циклов (а, возможно, не только их). И отношение их к накоплению мутаций, скорее всего, тоже не такое, как у последовательностей «значимых».

Здесь следует обратить внимание на вопрос, который, будучи уже экспериментально показан, категорически не обсуждается и не воспринимается, так как такое «не может быть потому, что не может быть никогда». Это — динамическое состояние мутаций. Не феномутационное состояние (т. е. динамика повреждений—репарации ДНК), а динамическое состояние собственно мутаций, т. е. неправильно зарепарированных повреждений, реализованных в мутации. Почти всегда определяют частоту мутаций: их количество, приходящееся на какое-то число клеток. Такие данные отражают то, что имеется на момент наблюдения. И если сравнивают частоту мутаций у людей (или лабораторных животных) разного возраста, то разницу объясняют накоплением мутаций. А как иначе может быть? Оказывается, может. Можно еще оценить темпы мутирования. Сделать это корректно, методически, очень сложно. Поэтому таких работ мало. А таких, в которых одновременно на одном и том же объекте определяли бы и частоту мутаций, и темпы мутирования — совсем мало. Но там, где определяют, — результаты получают такие, что их предпочитают не интерпретировать (автор не может себе представить, что исследователи, которые провели настолько сложные и корректно безупречные работы «не заметили» самого интересного). Вот один из таких примеров. Исследовали эмбриональные фибробласты мыши, которые до того были какое-то количество раз пассированы, а еще раньше находились там, откуда их ввели в культуру, т. е. в мышце. Такая их история свидетельствует о том, что на момент исследования прошло уже достаточное число клеточных удвоений и накопилось какое-то количество мутаций. В этой культуре определили частоту встречаемости мутаций по двум генам — *Hprt* (гипоксантинфосфорибозилтрансферазе) и *Apri* (аденинфосфорибозилтрансферазе). Они составили величины соответственно $\approx 10^{-5}$ и $\approx 10^{-4}$. Затем из этой же популяции фибробластов элиминировали мутантные клетки при помощи соответствующих реагентов (не клонированием!) и в такой одномоментно очищенной популяции определили появление вновь образовавшихся

ся мутантов, т. е. темпы мутирования. Они составили $\approx 10^{-6}$ для *Hprt* и $\approx 10^{-5}$ для *Appt* на клетку за генерацию [50]. По условиям эксперимента, эти гены для клетки были нейтральными (до тех пор, пока не добавляли селективных агентов). Сами же мутации, которые регистрировались, являлись только угнетающими активностью (т. е. не любыми, а строго специфическими, которых всегда меньше, чем нейтральных или слабо меняющих активность). При определяемой частоте мутаций хотя бы в одной из 10 клеток должна произойти мутация, инактивирующая какой-то клеточный ген (и еще несколько «слабых»). При таких темпах мутирования популяция очень скоро стала бы состоять сплошь из мутантных генов. Следовательно, частота мутантов — это некое равновесное состояние между их появлением и элиминацией. Очистка от мутаций в культуре клеток обусловлена эффективностью клонирования (в описываемом эксперименте она была 90 %). В данном случае элиминация должна была равняться ≈ 10 % мутантных генов на одно удвоение популяции. Собственно говоря, такое (возможно, с другими процентами элиминации) присуще всем популяциям — мутации идут по всем генам статистически, но накопления их (за исключением селективных при положительной селекции) не происходит. Но это — в культуре клеток. Тем более интересно увидеть, что происходит *in vivo* непосредственно в организме.

Темпы мутирования *in vivo* (да еще в тканях, а не в крови) определить корректно методически в настоящее время чрезвычайно сложно. Но было проведено несколько исследований по содержанию разных типов мутаций в модельном *lacZ* гене у трансгенных по нему линейных мышей. И оказалось, что два (из пяти определяемых) типа мутаций, которые вполне надежно диагностировались в мозге молодых мышей (3,5 месяца) полностью (т. е. на уровне, ниже чувствительности метода) исчезли у мышей старых (32 месяца). То же самое произошло с одним маркером в селезенке, хотя в других тканях все было «по правилам» (рис. 7). Но мозг у 3,5-месячных мышей уже полностью сформирован. Замена клеток мозга происходит, но крайне слабо. Ген *lacZ* (взят-то он из *E. coli*) для мышей — последовательность незначачая и даже не транскрибируемая. И, тем не менее, часть этой последовательности с возрастом заменилась на полноценную — мутации (уже сформированные!) исчезли, хотя другая мутация в числе своем возрос-

ла, новая появилась, а еще одна несколько поубавилась [38]. Да и общее количество мутаций (в данном гене) по всем тканям (кроме тонкого кишечника) почти не изменилось. Фактически — некое равновесное состояние, но теперь уже непосредственно в живом организме. И по гену категорически не селективному (*lacZ* ген *E. coli* у мышей не работает). Такая же картина имеет место и в случае мутаций в клетках сердца. Между молодыми и дряхлыми мышами разница в определяемом мутационном грузе была всего 2—3-кратная [51]. И это при 10-кратной (!) разнице в возрасте, да еще и на крайних полюсах — совсем юное животное и исчерпавшее свой видовой мышинный срок.

Если мутационное очищение идет за счет клеток, имеющих мутации, то элиминирует весь геном со всеми значащими и незначащими последовательностями. Но если имеет место равновесное состояние мутаций, клетка сохраняется и очищение идет за счет генетического кондиционирования поступающей извне ДНК, то здесь уже возможны варианты. Дефектный ген теоретически может индуцировать некий «сигнал потребности» в его восстановлении. Что это за сигнал и как происходит исправление предстоит еще выяснить (скорее всего, по рекомбинационному типу с поступившей извне «правильной» последовательностью — что-то подобное имеет место при соматической рекомбинации между гомологичными хромосомами). Но в случае активного гена такое можно еще понять. Что же касается участков гена, кодирующих протяженные нетранслированные участки РНК, то непосредственного побудительного механизма обмена их генетическим материалом, поступившим извне, не видно даже теоретически. При замене всего гена (или даже более того — с прилегающими участками) будет заменена и зона нетранскрибирующейся РНК. Но и в этом случае побудительной причиной явится дефектная часть транскрибируемой в РНК зоны. Поэтому можно ожидать, что в участках ДНК, кодирующих протяженные нетранслируемые районы РНК, мутаций будет несколько больше, для них уровень равновесия окажется немного ниже, чем для районов кодирующих. За счет накопления (ухудшения равновесного состояния) мутаций в тех участках ДНК, которые кодируют системы перемещения ферментов циклов метаболизма, будет нарушаться точность и время таких перемещений. Любые подобные изменения повысят утечку реакционноспособных промежуточных ме-

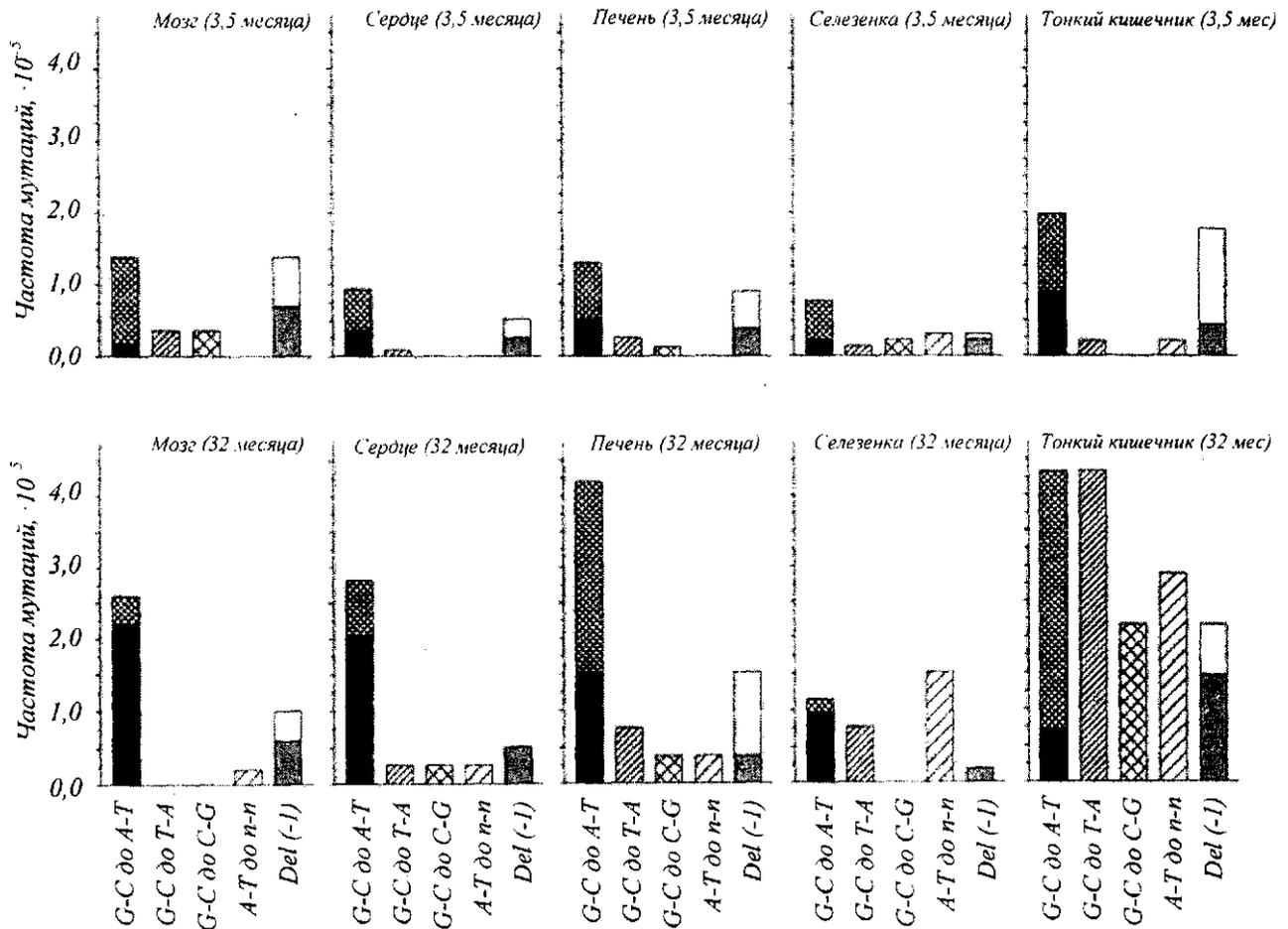


Рис. 7. Изменение спектра и количества мутаций в разных тканях у молодых (фактически «юных») и старых (фактически «дряхлых») мышей — видовой предельный срок жизни мышей 3 года [38]

табололитов из ферментных центров катализа, что приведет к повышению уровня повреждения макромолекул и так далее. И прямой пропорциональности между утечкой и количеством мутаций в таких районах быть не может, так как каждая последующая мутация, влияющая на перемещение, хоть и слабо, но будет влиять на уже имеющиеся до нее нарушения (изменение конформации — явление кооперативное). Сами же ферменты могут быть первично существенно и не затронуты мутациями в ДНК, кодирующей «значащие» области. А вот вторично (от повреждения нарастающим пулом утекающих промежуточных метаболитов) они (ферменты) будут повреждаться и накапливаться во все возрастающем темпе (как и все остальные макромолекулы). Также по возрастающей будет повреждаться и система перемещения — РНК, на которой заякорены ферменты циклов. Это продолжит рост отклонений траекторий перемещения и их времени. Но с позиций влияния изменений

точности передачи за счет повреждений реакционноактивными группами метаболитов и прочих помех на несанкционированный выход из активных центров промежуточных продуктов это количественно все меняет радикально. То же самое будет происходить и со сложными белково-белковыми цепями. Такие достаточно протяженные белково-белковые цепи должны быть пространственно сближены на расстояния с точностью до десятых ангстрема. Для этого они (как и предполагают) должны быть закреплены на каких-то носителях (предположительно, на мембранах). Мембраны в силу своего состава (большое содержание липидов) еще более, чем РНК, подвержены различным естественно протекающим модификациям. Для мембран вообще повреждаемость многокаскадно усилена. Образование мембран и их обновление обусловлены другими белками (синтезирующими липиды). Нарушения в таких белках являются причиной нарушений в ресинтезе мембран. Независимо от этого их по-

вреждаемость вызывают реакции с теми же промежуточными метаболитами, вытекающими из активных центров ферментов (на тех же мембранах расположенных). Так что в плане механизма одряхления оба пространственно-временных варианта пространственной организации метаболических циклов будут (с достаточно реальным приближением) реагировать адекватно. В силу тех же причин (рост нарушений всех макромолекул на всех уровнях) замедлится и синтез — основа самообновления. Разрыв между уровнем поврежденных макромолекул, их надмолекулярных комплексов и их замещением новыми, полноценными, будет возрастать. Старение перейдет в прогрессирующее одряхление. С позиций особенностей функционирования молекулярной машины становятся объяснимыми многие противоречия «стохастической модели старения».

Одряхление представляет собой динамическое состояние нарушений макромолекул и структур и их восстановление через ресинтез, разрыв между которыми возрастает во времени вследствие нарастания уровня повреждающих агентов — промежуточных метаболитов. Количество последних увеличивается за счет все менее и менее прецизионной работы системы перемещения, обусловленной накоплением мутаций в незначительных последовательностях ДНК, а также за счет возрастания уровня динамического феномутационноподобного состояния. Усиливается повреждение мембран, что приводит к повышению утечки метаболитов в закрепленных на мембранах сплошных белково-белковых ферментных цепях. Сумма и последовательность всех этих событий позволяют выстроить непрерывную, связанную между собой, цепочку событий на всем пути — от генома до феноменологии.

Относительно слабый, реально определяемый рост количества мутаций с возрастом отражает не накопление мутаций «в чистом виде», а сдвиг их равновесия. Поскольку же мутации выявляют почти всегда в последовательностях кодирующих, транслируемых или регуляторных, то их низкая определяемая частота находится в соответствии с сохранением во многих случаях ферментативной активности, обусловленной отсутствием нарушений в первичной аминокислотной последовательности. Для протяженных нетранслируемых районов данных относительно мутаций практически нет. Но ожидаемая их меньшая способность к замещению (и, возможно, более сильные изменения в точности

траекторий перемещения за счет того, что для РНК в участках спаривания синонимические замены невозможны) позволяет предположить более высокий уровень мутаций (хотя тоже равновесный, но более сильного действия). Кроме того, последствия нарушений в механизме перемещения должны (по самой природе такого механизма) носить нелинейный характер. А вся сумма событий — нелинейно взаимоусиливать разрыв между уровнями нарушения — восстановления макромолекул и структур.

Объяснима и разная активность разных ферментов при старении. Отсутствие в них, с одной стороны, сколько-нибудь значительных, обусловленных мутациями нарушений, а с другой, — адаптационные процессы (которых в связи с возрастными изменениями просто не может не быть) в сочетании с нарастанием уровня повреждающих агентов и разным количеством высоковосприимчивых к ним открытых групп в молекулах разных белков неизбежно определяют разную, измененную по сравнению с молодыми клетками, активность разных ферментов. А вот как и каких — это уже требует строго индивидуального анализа и, конечно же, достаточного количества экспериментальных данных по каждому конкретному ферменту (да еще и обязательный материал по популяционному разбросу).

Что касается сохранения с возрастом репарационных способностей, то при отсутствии значительного числа мутаций в участках ДНК, кодирующих транслируемые и регуляторные последовательности, ферменты репарации и будут, в основном, полноценными. Вторым определяющим сохранность репарации фактором является особенность их функционирования. В метаболических циклах критичными для точности передачи «из рук в руки» будут нарушения в РНК-системе перемещения и в сплошных белково-белковых цепях мембран, на которых такие цепи закреплены. А при репарации ферменты располагаются на ДНК как на субстрате. И их перемещение определяется самой ДНК. Повреждения же в ней служат местом приложения ферментов, направлением их перемещения (к месту повреждения) и промежуточным субстратом одновременно. Для нарушения точности репарации и оснований нет. Другое дело повреждаемость этих ферментов реакционноспособными продуктами. Но такое тоже будет иметь ограничения. В ядре нет метаболических циклов, а ферментативные процессы почти исключительно ограниче-

ны обслуживанием ДНК. Подобная организация процессов в клетке уже только за счет структурных ограничений защищает (насколько возможно) ядерной мембраной и саму ДНК, и ферменты, ее обслуживающие.

Наконец, по поводу кратковременного, но совершенно реального фенотипического реверса возрастного состояния, упоминавшегося выше. С позиций существующих сегодня представлений такое невозможно. Уж если изменения возникли и геном (как первооснова всего) такие изменения в себе в виде мутаций содержит, то никакого механизма фенотипического реверса быть не может. Не может, ибо не может существовать фенотип без генотипа, а одряхление не может вернуться в молодое состояние — «омолодиться» в мутационно старом генотипе. А вот с позиций динамического состояния — может.

Попробуем представить себе, как может. Увеличивающийся разрыв между повреждениями (за счет возрастания количества промежуточных реакционноспособных продуктов, ускользающих из активных центров ферментов метаболических циклов, за счет ... и т. д.) и восстановлением включает все возможные компенсаторные процессы клеток. Замедление общего метаболизма с возрастом (имеются в виду старшие возрастные группы) — один из таких компенсаторных процессов: чем слабее работают циклы, тем меньше повреждающих агентов. Организм борется за свое существование всеми имеющимися у него средствами. Ударное возрастание гормонов, происходящее при перевязке семенных протоков, максимально активизирует все процессы (рис. 8). Резко возрастает уровень метаболизма со своими двумя ипостасями: нарастанием повреждаемости и процессами восстановительными — ресинтезом макромолекул, восстановлением ими макромолекулярных структур и т. д. (синхронно повышается, насколько это возможно, уровень дегградации макромолекул). Но процессы эти не равновелики, не «равнопредельны» и не синхронны во времени. Белки мутационно нарушены мало и их активность может возрасти практически сразу и круто (при активизации, конечно же, всего цикла, начиная с транскрипции). Они способны провести фенотипический реверс одряхления, снизив на время разрыв между нарушением макромолекул и их обновлением. Снижение такого разрыва возможно потому, что повреждаемость аппарата перемещения ферментов циклов взрывным образом не меня-

ется — для этого надо, чтобы в геноме возникли соответствующие мутации. И, кроме того, ресинтез такого аппарата (для сплошных белково-белковых цепей — ресинтез и мембран, и самих белков, на них закрепленных) должен достигнуть предельных возможностей, после чего его разрушение, уже не компенсированное, примет обвальный характер. А обновление макромолекул за счет ресинтеза в пределах максимальной активации генома взрывным может быть. Но резкая активация метаболизма (за счет умножения количества всех индивидуальных циклов, т. е. систем перемещения с заякоренными на них ферментами) приведет к резкому (хотя и не взрывному) нарастанию количества повреждающих макромолекулы метаболитов. И далее, по всей цепочке процессов — к усилению роста числа мутаций и феномутационноподобного состояния. Уровень активизации метаболизма ограничен фундаментально. Все, что можно «выжать» путем активации транскрипции, детерминировано геномом. А вот рост уровня повреждающих агентов при максимизации активности циклов метаболизма, при нарастании нарушений точности и времени передачи «из рук в руки» метаболитов — потенциально безграничен, т. е. ограничением является только полное разрушение в клетке всего, что нарушает и работу циклов. Но это уже стадия неконтролируемого ферментативного произвола, гибель клетки. Фенотипический реверс состоялся. И плата за него тоже.

Вот и получается, что старение заключено в значительной мере не в генах (т. е. не в той их части, которая кодирует экзоны и регуляторные участки), не в «значащих» последовательностях, а в «незначащих». И не только (а, возможно, и не столько) в истинных мутациях, а еще и в феномутационноподобном состоянии. Состоянии, которое пока никак не учитывается и, скорее всего, вообще нигде, кроме старения и болезней, не проявляется. Генетика — это наука о наследственности и наследовании. А феномутационное состояние не наследуется. Оно — удивительная ловушка жизни как явления, существующего вне старения, для своего расходного материала — индивидуумов. Старение не наследуется, жизни такое не подходит. Для жизни в бесконечности и индивидууму с его видовым сроком на том же самом геноме уготовлены не совсем одинаковые последствия. Мутационное противоречие при попытках объяснить старение и одряхление свидетельствует о необходимости фор-

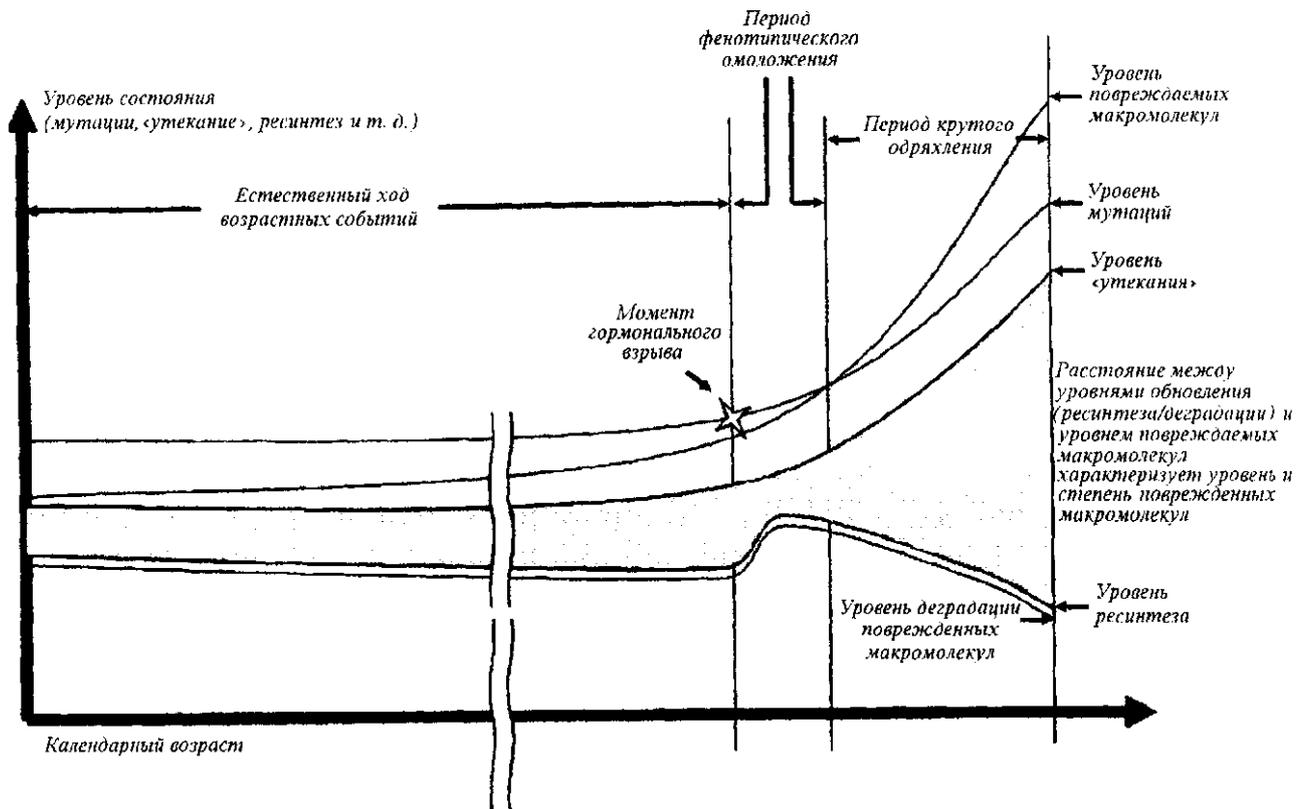


Рис. 8. Схематическое (без соблюдения масштабов) объяснение старения, короткого фенотипического омоложения и последующего катастрофического одряхления. Неизбежное в закрытой информационной системе накопление мутаций обуславливает рост уровня мутационного груза и, как следствие, увеличение разрыва между уровнями «факторов повреждения и обновления», что приводит к возрастанию (и разнообразию) поврежденных макромолекул. При резком (и непрерывно действующем) «эндодопинге» (возникающем вследствие перевязки семенных каналов) круто стимулируется система восстановления. Но работает она уже на далеко не идеальной системе перемещения, способствующей повышенному утеканию «факторов повреждения». Особенности формирования уровня «факторов повреждения» (который в силу самих механизмов перемещения хотя уже и вызывает далекое от возможного минимума утекания при его оптимальной работе, но не изменяется «взрывным» путем) и уровня ресинтеза (который допингово увеличен до полного максимума возможностей) приводит к сокращению разрыва. Но такое достигается не за счет снижения уровня факторов повреждения. Наоборот, этот уровень тоже возрастает, но вначале (только вначале!) менее круто, чем доведенный до предела ресинтез. Количество поврежденных макромолекул, которые могут быть замещены вследствие ресинтеза, уменьшается. Общая скорость их повреждения растет с ускорением, но удельная (за счет реализации полного предела активации ресинтеза) временно снижается. Временно, потому что круто начинает расти повреждаемость генома (особенно механизма перемещения) и быстро нарастает как непосредственно мутационный груз, так и в еще большей мере уровень фенотипического состояния. Начинает быстро увеличиваться степень поврежденности ресинтезируемого (за счет всех типов мутаций в геноме) механизма перемещения. Это приводит к стремительному нарастанию утекания промежуточных метаболитов. Система метаболических циклов, активированная до максимума, в силу непрерывного неустраняемого аутодопинга, неспособна снизить свою интенсивность (производство утекающих продуктов продолжает круто возрастать и не может быть замедлено адаптационным механизмом старения — снижением общего метаболизма). Катастрофически увеличивается лавина повреждающих агентов и массивированная (теперь уже некомпенсируемая ресинтезом) повреждаемость макромолекул — наступает обвальное одряхление. При естественном «оптимальном» старении компенсаторные механизмы снижают общий уровень метаболизма и замедляют скорость роста повреждающих агентов (который идет все равно, но при замедленном метаболизме менее интенсивно). Менее интенсивно осуществляется и ресинтез. Но скорость увеличения разрыва между ним и утеканием метаболитов уменьшена и все растягивается на «видовой срок». Если повезет, конечно

мирования дополнительных представлений о влиянии генотипа на фенотип. И фенотипа на генотип тоже за счет ускорения мутационного процесса под влиянием фенотипа, сдвига мутационного равновесия и феномутационного состояния. И стратегию работ следует строить с учетом этого (используя, конечно же, все интереснейшие, важнейшие и т. д. наработки «всех времен и народов»). И интегральный, самый общий, универсальный (как бы труден он ни был) путь к реверсу — это фенотипический реверс на основе восстановленного после мутаций генома. Или полной замены генома, а заодно и всего другого новой клеткой. При всей кажущейся нереалистичности такого пути он не то что концептуально возможен, работы в этом направлении уже ведутся (пока, правда, без всякой рекламы, так как рекламируются только пути безнадежные) и круто возрастают во времени. Но об этом — в последней части «шагреновой кожи».

V. A. Kordium

Our shagreen leather is our problem. And we have to solve it.

6. Paying back

Summary

The problem of spatial and temporal organization of metabolic cycles in a cell is being analyzed. The unsolved questions are emphasized and the variants for their solution are suggested. The total amount of intermediate products as well as their removal from the active centers of metabolic cycle enzymes are being evaluated in view of the ideas under consideration. The removal of metabolites is believed to be a result of the macromolecular damage. The age-related changes are explained taking into account this suggestion along with peculiarities of the mutative process.

Key words: water in cell, metabolic cycles, channelling, mutational process, unimportant sequences.

V. A. Кордюм

Наша «шагренова шкіра» — це наша проблема. Нам її і вирішувати. 6. Повернення боргу

Резюме

Аналізується проблема просторово-часової організації метаболічних циклів у клітині. У цьому зв'язку висвітлено питання, що не мають відповіді, і пропонуються варіанти їхнього вирішення. В контексті обговорюваних уявлень зроблено оцінку загальної кількості проміжних продуктів та їхнього витікання із активних центрів ферментів метаболічних циклів. Витікання метаболітів зв'язують з пошкодженням макромолекул, чим і пояснюються (з урахуванням особливостей мутативного процесу) вікові зміни.

Ключові слова: вода в клітині, метаболічні цикли, каналювання, мутаційний процес, незначущі послідовності.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кордюм В. А. Наша «шагреновая кожа» — это наша проб-

- лема. Нам ее и решать // Биополимеры и клетина.—2003.—19, № 2.—С. 113—132.
2. Кордюм В. А. Наша «шагреновая кожа» — это наша проблема. Нам ее и решать. 2. Единое совмещенное пространство организма // Биополимеры и клетина.—2003.—19, № 4.—С. 328—349.
3. Кордюм В. А. Наша «шагреновая кожа» — это наша проблема. Нам ее и решать. 3. Недостающее звено // Биополимеры и клетина.—2003.—19, № 6.—С. 473—491.
4. Кордюм В. А. Наша «шагреновая кожа» — это наша проблема. Нам ее и решать. 4. Шагреневость, которая делает нашу кожу шагреновой // Биополимеры и клетина.—2004.—20, № 4.—С. 267—289.
5. Кордюм В. А. Наша «шагреновая кожа» — это наша проблема. Нам ее и решать. 5. Предтеча // Биополимеры и клетина.—2005.—20, № 3.—С. 473—491.
6. Metzler D. E. Biochemistry.—New York: Elsevier, 2001.—Vol. 1.—937 p.
7. Wiggins P. M. Role of water in some biological processes // Microbiol. Rev.—1990.—54.—P. 432—449.
8. Aliev M. K., Dos Santos P., Noerter J. A., Sobol S., Tikhonov A. N., Saks V. A. Water content and its intracellular distribution in intact and saline perfused rat hearts revisited // Cardiovasc. Res.—2002.—53.—P. 48—58.
9. Евдокимов Ю., Лорткипанидзе Г., Голо В., Салаянов В., Кац Е. «Фантовая» структура растворителя и упаковка двухцепочечных молекул нуклеиновых кислот в частицах жидкокристаллических дисперсий // Биофизика.—2000.—45, № 6.—С. 1029—1038.
10. Suzardo M. C., Amalita F., Nunez A. M., Diaz B., Delopez B., Disalevo E. A. Effect of trehalose and sucrose on the hydration and divole potential of lipid bilayers // Biophys. J.—2000.—78.—P. 2452—2458.
11. Rupley J. A., Careri G. Protein hydration and function // Adv. Protein Chem.—1991.—1.—P. 37—172.
12. Хурин Ю. И., Шерман Ф. Б., Тусупкалиев У. Изотермы гидратации глобулярных белков в динамическом режиме // Биохимия.—1972.—42, № 3.—С. 490—497.
13. Гуриков Ю. В. Современное состояние проблемы структуры воды // Состояние и роль воды в биологических объектах.—М.: Наука, 1967.—С. 5—15.
14. Yamada T. ¹H-NMR studies of the intracellular water of skeletal muscle fibers under various physiological conditions // Cell. Mol. Biol.—2001.—47.—P. 925—933.
15. Clegg J. S. Interrelationships between water and cellular metabolism in *Artemia cysta*. VI. RNA and protein synthesis // J. Cell. Physiol.—1977.—91.—P. 143—154.
16. von Zgliniki T. Reliability of intracellular water and ion distributions as measured by X-ray microanalysis — a review // Scanning Microsc.—1991.—5, Suppl.—P. 85—92.
17. Кордюм В. А. И тогда я сел писать эту книгу (Не совсем обычные представления о генетике человека).—Киев, 1993.—148 с.
18. Metzler D. E. Biochemistry.—New York: Elsevier, 2003.—Vol. 2.—1973 p.
19. Ovadi J., Valdur S. On the origin of intracellular compartmentation and organized metabolic systems. Molecular and cellular // Biochemistry.—2004.—256/257.—P. 5—12.
20. Негруцький Б. С. Організація білкового синтезу у вищих еукаріотів.—Київ: Обереги, 2001.—165 с.
21. Huang X., Holden H. M., Raushel F. M. Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions // Annu. Rev. Biochem.—2001.—70.—P. 149—180.
22. Perham R. N. Swinging arms and swinging domains in multi-

- functional enzymes: catalytic machines for multistep reactions // *Annu. Rev. Biochem.*—2000.—69.—P. 961—1004.
23. Tsuji S. Y., Wu N., Khosla C. Intermodular communication in polyketide synthesis: comparing the role of protein-protein interactions to phase in other multidomain proteins // *Biochemistry.*—2001.—40.—P. 2317—2325.
 24. Martin J. F., Barreiro C., Gonzalez-Lavado E., Barriuso M. Ribosomal RNA and ribosomal proteins in corynebacteria // *J. Biotechnol.*—2003.—104.—P. 41—53.
 25. Schluenzen F., Tocifj A., Zarivach R., Harms J., Gluehmann M., Janell L., Bashan A., Bartels H., Agmon I., Franceschi F., Yorath A. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution // *Cell.*—2000.—102.—P. 615—623.
 26. Muller W. E. G., Bohm M., Grebeniuk V. A. Conservation of the positions of metazoan introns from sponges to humans // *Gene.*—2002.—295.—P. 299—309.
 27. Pesole G., Linki S., Grillo G., Liccinli F., Mignone F., Gissi C., Saccone C. VTR db and UTR sine: specialized databases of sequences and functional elements of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNA's. Update 2002 // *Nucl. Acids Res.*—2002.—30.—P. 335—340.
 28. Yusupov M. M., Yusupova G. Zh., Baucom A., Lieberman K., Earnest T. N., Cate H. D., Noller H. F. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution // *Science.*—2001.—292.—P. 883—896.
 29. Valentine-Hansen P., Eriksen M., Udesen C. The bacterial sm-like protein Hfq: A key player in RNA transactions // *Mol. Microbiol.*—2004.—51.—P. 1525—1533.
 30. Le Shu-Yun Z. K., Maizel J. V. RNA molecules with structure dependent functions are uniquely folded // *Nucl. Acids Res.*—2002.—30.—P. 3574—3582.
 31. Black D. L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing // *Annu. Rev. Biochem.*—2003.—72.—P. 291—336.
 32. Scoocca J. R., Charron M., Shaper N. L., Shaper J. H. Determination of the half-life of the murine β -4-galactosyltransferase-1 mRNA in somatic cells using the tetracycline-controlled transcriptional regulation system // *Biochimie.*—2003.—85.—P. 403—407.
 33. Erdmann V. A., Szymanski M., Hochberg A., de Groot N., Barciszewski J. Non-coding, mRNA-line RNAs database Y2K // *Nucl. Acids Res.*—2000.—28.—P. 197—200.
 34. Griffiths-Jones S., Bateman A., Marshall M., Khanna A., Eddy S. R. Rfam: an RNA family database // *Nucl. Acids Res.*—2003.—31.—P. 439—441.
 35. Ванюшин Б. Ф., Бердышев Г. Д. Молекулярно-генетические механизмы старения.—М.: Медицина, 1977.—296 с.
 36. Rudolph K. L., Chang S., Lee H.-W., Blasco M., Gottlieb G. J., Greider C., DePinho R. A. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice // *Cell.*—1999.—96.—P. 701—712.
 37. Wang J., Hannon G. J., Beach D. H. Risky immortalization buy telomerase // *Nature.*—2000.—405.—P. 755—756.
 38. Dolle M. E. T., Snyder W. K., Dunson D. V., Vijg J. Mutational fingerprints of aging // *Nucl. Acids Res.*—2002.—30.—P. 545—549.
 39. Hahn 1964, 1965 (цит. по Ванюшин, Бердышев) Ванюшин Б. Ф., Бердышев Г. Д. Молекулярно-генетические механизмы старения.—М.: Медицина, 296 с.
 40. Christiansen M., Stevnsner T., Bohr V. A., Clark B. F. C., Rattan S. I. S. Gene-specific DNA repair of pyrimidine dimers does not decline during cellular aging *in vitro* // *Exp. Cell Res.*—2000.—256.—P. 308—314.
 41. Крашенников В. Е. Биологические основы.—Москва, 1924.—83 с.
 42. Виленчик М. М. Биологические основы старения и долголетия.—М.: Знание, 1987.—176 с.
 43. Jendrycško A., Drozd M. Podstawowy poziom uszkodzen DNA komorek ludzkich // *Prz. lek.*—1989.—46.—P. 470—473.
 44. Roguev A., Russev G. Two-wavelength fluorescence assay for DNA repair // *Anal. Biochem.*—2000.—287.—P. 313—318.
 45. Brachman E. E., Kmiec E. B. DNA replication and transcription direct a DNA strand bias in the process of targeted gene repair in mammalian cells // *J. Cell. Sci.*—2004.—117.—P. 3867—3874.
 46. Ryo V., Naoyki A., Emi M., Michihiko F., Dai A. Proteasome inhibitors induce changes in chromatin structure characteristic of senescent human fibroblasts // *Biosci., Biotechnol. and Biochem.*—2004.—68.—P. 2395—2397.
 47. Брода Э. Эволюция биоэнергетических процессов.—М.: Мир, 1978.—304 с.
 48. Chondrogianni N., Stratford F. L. L., Trangakos I. P., Friguet B., Rivett A. I., Gonos E. S. Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts // *J. Biol. Chem.*—2003.—278.—P. 28026—28037.
 49. Рязанов А. Г. Рибосома и секрет долголетия // Молекуляр. биология.—2001.—35, № 4.—С. 727—730.
 50. Cervantes R. B., Stringer J. R., Shao C., Tischfild J. A., Stombrock P. S. Embryonic stem cells and somatic cells differ in mutation frequency and type // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2002.—99.—P. 3586—3590.
 51. Dolle M. E. T., Snuder W. K., Gossen J. A., Schman H. M., Vijg J. Distinct spectra of somatic mutations accumulated with age in mouse heart and small intestine // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2000.—97.—P. 8403—8408.

УДК 577.214.625
Надійшла до редакції 20.06.05