

УДК 577.24

## РЕДУСОМНАЯ ГИПОТЕЗА СТАРЕНИЯ И КОНТРОЛЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ВРЕМЕНИ В ИНДИВИДУАЛЬНОМ РАЗВИТИИ

© 2003 г. А.М. Оловников

*Институт биохимической физики РАН, 125319 Москва,  
ул. Черняховского, 5-94; электронная почта: olovnikov@dol.ru*

Поступила в редакцию 01.09.02

Предложена редусомная гипотеза старения и контроля за ходом биологического времени в индивидуальном развитии. Редусомы – это гипотетические перихромосомные частицы, возникающие при дифференцировках в ходе морфогенетического развития организма. Покрытая белками линейная молекула ДНК редусомы – это копия сегмента хромосомной ДНК. Редусомы расположены преимущественно в субтеломерных регионах хромосом. Редусома не покидает тело своей хромосомы даже при клеточных делениях, удерживаясь в своем хромосомном гнезде. Подобно теломерной ДНК линейная ДНК редусомы с течением времени укорачивается. Поэтому крошечные редусомы прогрессирующе уменьшаются в размерах; отсюда и их название. Вместе с убылью ДНК в редусоме уменьшается и количество содержащихся в ней разных генов. Укорочение молекул редусомной ДНК (и вызванное этим изменение набора генов в редусомах) меняет с возрастом уровень экспрессии различных хромосомных генов и благодаря этому служит ключевым средством измерения биологического времени в индивидуальном развитии. Основная часть ДНК большинства редусом представлена некодирующими генами, с которых транскрибируются постулируемые микроРНК и фонтанные РНК(фРНК), вовлеченные в регуляцию различных переупаковок хроматина, специфичных для определенных дифференцировок, и в модуляцию уровней экспрессии хромосомных генов. Фонтанные РНК способны количественно менять уровень экспрессии генов в хромосомах; эти фРНК образуют специфические комплексы с фионами. Фионы – это сайты хромосомной ДНК, комплементарные разным фРНК. Предполагают, что фионы находятся в окрестностях обычных хромосомных генов. Комплекс фРНК – фион при его специфическом взаимодействии с закрытыми воротами соответствующего ионного канала внутренней ядерной мембраны инициирует на очень короткий срок перевод канала в открытое состояние. Этим организуется работа ионного фонтана, который оказывается автоматически нацеленным на ближайший к данному фиону хромосомный ген. В зависимости от специфичности вовлеченных в процесс фРНК, фионов и ионных каналов фонтаны своими ионами создают неидентичное ионное окружение вблизи разных структурных генов. Топографически специфичное воздействие ионных фонтанов влияет на конфигурацию соответствующих сегментов хроматина и на транскрипционную продуктивность хромосомных генов. Поэтому фонтанная система ядра способна управлять количественными признаками клеток и организма; она может контролировать доминантность аллелей и играть роль в индивидуальном развитии. Прогрессирующее укорочение ДНК редусом приводит к клеточному старению из-за постоянно возрастающей нехватки молекул низкомолекулярных РНК, транскрибируемых с редусомных генов. Предполагается, что редусомы подразделяются на два типа: хроносомы и принтосомы. Линейные молекулы ДНК в двух типах редусом именуется соответственно хрономеры и принтомеры. Хроносомы отвечают за измерение биологического времени в неделящихся клетках центральной нервной системы. Принтосомы запоминают позиции клеток при интерпретации позиционной информации в морфогенезе и в соответствии с позицией клетки в морфогенетическом поле изменяют ее свойства и запоминают сделанное изменение (это принтомерный механизм интерпретации позиционной информации). Кроме того, принтомеры участвуют в поддержании состояния клеточной дифференцировки. Постулируется, что хрономера укорачивается в норме только на пике инфрадианного гормонального ритма (Т-ритма), который инициирует акт ее сверхскоростной транскрипции, завершающийся усечением конца хрономеры (предсказываемый эффект назван скраптингом). Принтомера может укорачиваться за счет эффекта концевой недорепликации ДНК и из-за скраптинга. Эффект концевой недорепликации ДНК в удваивающихся клетках проявляется одновременно в укорочении как принтомер, так и теломер. Утверждается, что укорочение теломер – лишь свидетель процесса старения клеток, тогда как истинной причиной биологического старения является только укорочение ДНК редусом. Процессинг определенных редусом в терминально дифференцирующихся клетках есть причина прекращения их делений. Сцепление генов в эукариотической хромосоме детерминировано дистанциями между генами и редусомами.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** теломера, транскрипция, старение, биологическое время, ионы, биологические ритмы, дифференцировка, сцепление генов.

Контроль за течением биологического времени в многоклеточном организме – одна из важнейших физиологических функций организма,

сопряженная к тому же с процессом его старения. Эта область, несмотря на длительные теоретические и экспериментальные усилия, во

многим остается терра инкогнита и предлагаемая гипотеза является попыткой продвинуться в этом направлении.

Предполагается, что, как и в случае любой другой функции, для функции контроля за ходом биологического времени в организме должна иметься некая вполне определенная структура. Ведь нет функций вне структур, как не бывает содержания вне формы. Прежде чем приступить к изложению гипотезы и рассмотрению предлагаемых процессов, целесообразно дать по необходимости довольно длинный список вовлеченных в них гипотетических фигурантов с их краткими характеристиками.

Редусома — крошечная ядерная частица, постоянно расположенная на теле хромосомы и уменьшающаяся в длину с течением времени в связи с укорочением ее покрытой белками линейной молекулы ДНК.

Редусомная ДНК (она может именоваться также редумерой) возникает как латеральный амплификат сегмента хромосомной ДНК, соответственно, этот сегмент есть проторедумера. Редумера располагается, таким образом, вне хромосомной ДНК, но физически рядом с ней, удерживаясь в хромосомном гнезде, возле своего хромосомного оригинала — проторедумеры — бок о бок с ней; удержание осуществляется как за счет белковых мостиков, так и с участием межгуаниновых связей между ее ДНК и ДНК хромосомы.

Принтосома — вид редусомы, она присутствует во многих делящихся (например, в фибробластах) и неделящихся клетках, не занятых контролем за временем (например, в кардиоцитах). Принтосома отсутствует в стволовых клетках.

Принтомера — линейная молекула ДНК принтосомы. Возникает как латерально лежащая вне хромосомной ДНК (но рядом с ней) перихромосомная копия хромосомного оригинала — протопринтомеры. Являясь перихромосомным амплификатом, принтомера, в отличие от своего оригинала, имеет свободные концы ДНК. Принтомера укорачивается в основном за счет эффекта концевой недорепликации ДНК, т.е. подобно теломерной ДНК. Содержит различные гены фонтанных РНК (фРНК) и микроРНК, уменьшение числа которых в принтомере из-за ее укорочения ведет к изменению в клетках уровня экспрессии хромосомных генов.

Протопринтомера — генетически наследуемый хромосомный оригинал, по которому изготавливается его перихромосомная копия — принтомера.

Хроносомма — вид редусомы, она вовлечена в контроль за биологическим временем и функционирует только в неделящихся нейроэндокринных клетках головного мозга.

Хрономера — линейная ДНК хроносомы. Подобно принтомере хрономера имеет свободные концы, являясь латерально расположенной на теле хромосомы копией сегмента хромосомной ДНК. Хрономера тоже содержит различные гены фРНК и микроРНК. Она укорачивается в течение жизни организма при участии Т-ритмов и скраптинга, но не за счет процесса концевой недорепликации, невозможного в неделящихся нейронах.

Протохрономера — генетически наследуемый хромосомный оригинал, по которому изготавливается его соматическая копия — хрономера.

Акромера — это представленная G-богатыми повторами последовательность концевых сегментов линейной редусомной молекулы ДНК. Представлена на концах всех редумер, т.е. на концах принтомер и хрономер. Акромера, как и теломера, защищена на своем абсолютном конце от нуклеаз. Акромеры разных принтомер и хрономер обычно значительно меньше теломер по длине. Акромеры, по крайней мере у некоторых видов млекопитающих, отличаются от теломерных повторов по последовательностям своих G-богатых повторов и потому не распознаются теломеразой.

Акросома — комплекс белков на торце двойной спирали акромерной ДНК, т.е. он находится на концах всех редусом. Акросома участвует в процессинге и иммобилизации конца акромерной ДНК на теле хромосомы, т.е. в соответствующем компартменте хромосомного гнезда.

Т-Ритм — гормональный биологический ритм с относительно длинным периодом, у человека — это один из инфраничных ритмов. На каждом пике Т-ритма осуществляется однократный акт укорочения хрономера за счет процесса скраптинга.

Скраптинг — укорочение транскрибируемой в особо высоком темпе линейной молекулы ДНК. Укорочение сопряжено с возникновением концевой нерепарируемой брешки. Брешь возникает в условиях механического напряжения, создающегося в сверхскрученной молекуле ДНК при максимально высоком темпе движения транскрипционной машины при ее приближении почти вплотную к физически иммобилизованному на теле хромосомы концу редусомной ДНК.

Фонтанная система ядра — система ионных каналов, кратковременно открываемых во внутренней мембране перинуклеарной цистерны и создающих ионные фонтаны вблизи структурных генов. Ворота ионного канала открываются при контакте с комплексом фион — фРНК. Фонтаны влияют на продуктивность генов, модулируя их локальное ионное окружение.

Фионы — сайты хромосомной ДНК в окрестностях структурных генов, неслучайная локализация фионов в геноме обеспечивает топографически специфичное воздействие ионных фонтанов на конфигурацию соответствующих сегментов хроматина и продуктивность структурных генов.

фРНК — низкомолекулярные ядерные РНК, транскрибируемые с фРНК-генов в редусомах и направляющие работу ионных фонтанов в ядре, они кодируются разнообразными фРНК-генами как принтомер, так и хрономер.

микроРНК — низкомолекулярные РНК, транскрибируемые с генов микроРНК в редусомах; они вовлечены в создание конфигураций хроматина, специфичных для определенных цитодифференцировок, и в регуляцию метаболизма РНК.

Хромосомное гнездо — это полость в хромосоме, созданная трехмерной укладкой ее хроматина и служащая ложем для редусомы. Каждое гнездо всегда специфично только для строго определенной редусомы.

Биологическое время — это длительность последовательно сменяющихся событий индивидуального развития, измеряемая и контролируемая у высших животных самим организмом на основе изменения генетического состава укорачивающихся хрономер. Биологическое время течет ступенчато, а не плавно. Оно идет независимо от астрономического времени.

Представив этот перечень действующих лиц, перейдем к более детальному рассмотрению их свойств и активности.

### РЕДУСОМА — НОВАЯ ПЕРИХРОСОМНАЯ ОРГАНЕЛЛА КЛЕТКИ

На роль основной рассматриваемой структуры предлагается так называемая «редусома» (redusome, термин образован от латинского *reducere* — уменьшать и греческого *some* — тело). Размеры этой структуры уменьшаются с течением времени из-за укорочения ее линейной ДНК, или редумеры; отсюда и название новой ядерной частицы. В одной клетке может быть одна или серия разных редусом. Каждая редусома удерживается даже в митозах на теле той хромосомы, на которой она была создана в ходе дифференцировки, хотя не все без исключения клеточные дифференцировки обязаны сопровождаться созданием новых редусом. Редусомы еще не найдены не только из-за отсутствия нацеленного поиска и крошечных размеров (длина их молекул ДНК, вероятно, в среднем составляет

~10 тыс. пар нуклеотидов (т.п.н.)). Главное — это полное сходство ее последовательности с хромосомным оригиналом, т.е. с проторедумерой. Латерально, бок о бок, расположенный вне нити хромосомной ДНК и потому имеющий свои собственные свободные концы ДНК локальный амплификат — это и есть ДНК редусомы. Именно потому, что подобные внехромосомные, точнее перихромосомные, амплификаты являются точной копией соответствующих хромосомных сегментов, эта фракция ДНК до сих пор ускользает от внимания даже при обычном секвенировании. Поскольку эта ДНК не покидает тело хромосомы, ее следует считать перихромосомной, в отличие от экстрахромосомной ДНК. Транскрипты редусомных фРНК-генов и генов микроРНК процессируются и используются в ионной регуляции эукариотического генома, в регуляции конфигурации хроматина и метаболизма РНК.

ДНК редусомы имеет собственный *ori* и промоторы транскрипции. В ней есть и аналоги теломера (во избежание путаницы с теломерами концевые структуры редусомной ДНК названы акромерами). Важно подчеркнуть, что редусома не имеет центромеры и потому ее судьба в делящихся клетках целиком связана с судьбой хромосомы, в тело которой редусома вмонтирована. Редусома не покидает тело хромосомы даже при репликации ДНК, удерживаясь в своем хромосомном гнезде, т.е. возле хромосомного оригинала, за счет белковых мостиков, а также посредством G—G-связей между некоторыми гуанин-богатыми сайтами ее ДНК и ДНК хромосомы. При репликации редусома удерживается в гнезде поочередно одним из двух своих плечей; плечо соответствует дистанции между центрально расположенным *ori* и концом акромеры.

Подобно теломерам линейные молекулы редусомной ДНК с течением времени понемногу укорачиваются. Но есть и отличия. Вследствие концевой недорепликации укорочение ДНК редусом идет только в делящихся клетках. В постмитотических клетках ДНК теломер вообще может не укорачиваться, а ДНК редусом в них при определенных условиях укорачивается только вследствие скраптинга (его суть рассматривается в других разделах). Поэтому крошечные редусомы постепенно убывают в размерах, за что и получили свое название. В ходе укорочения ДНК в редусомах уменьшается количество содержащихся в них генов. Хромосомные оригиналы, с которых была копирована редусомная ДНК соматических клеток, сами в норме не транскрибируются (хотя их транскрипция возможна при канцерогенезе) и немедленно после создания редусомы вновь компактизируются.

Основная часть ДНК редусом различной специфичности представлена разными комбинациями некодирующих генов. Соответственно большинство транскрибируемых с разных редусом молекул РНК, т.е. маркирующие хроматин РНК, фонтанные РНК и прочие, не связаны с кодированием, что упрощает выполнение их миссий. Присутствие в некоторых редусомах копий белок-кодирующих генов, даже если они молчат в самой хромосомной ДНК, никак, впрочем, не меняло бы способностей редусом. Способность некоторых низкомолекулярных РНК ядра осуществлять эпигенетическое маркирование хроматина и регулирование метаболизма РНК, как известно, уже экспериментально установлена. Соответствующие низкомолекулярные РНК выявлены у разных эукариот — от червя до человека. Быстро накапливаются данные о разных микроРНК, транскрибируемых с хромосомных генов и вовлеченных у различных объектов в разнообразные проявления так называемой РНК-интерференции, в реорганизацию хроматина, в том числе в эпигенетическое маркирование хроматина у инфузорий, в компенсацию дозы гена у многоклеточных, редактирование нуклеиновых кислот и т.п. [1–7]. Транскрибируемые с редусом микроРНК составляют, вероятно, лишь малую часть прочих небольших молекул ядерной РНК. От таких же по размеру остальных РНК редусомные микроРНК отличаются тем, что именно они стоят во главе тех регуляторных каскадов в морфогенетических цитодифференцировках и детерминациях, которые обеспечивают возникновение и поддержание специфических паттернов конфигурации хроматина и переключений генетической активности.

В целом в ДНК редусом разной специфичности могли бы быть представлены в разных комбинациях две группы некодирующих генов, с которых транскрибируются низкомолекулярные РНК, соответственно отвечающие за конфигурацию хроматина и за модулирование количественных признаков клеток. К транскрибируемым в редусомах РНК, способным количественно менять уровень экспрессии генов в хромосомах, следует отнести также постулируемые так называемые «фонтанные» РНК, которые, как предполагается, способны влиять на ионное окружение структурного хромосомного гена, меняя его продуктивность. Ввиду того, что фонтанные РНК еще не обнаружены, целесообразно остановиться на их постулируемых свойствах подробнее. Низкомолекулярные фРНК разной специфичности образуют специфические комплексы с комплементарными им сайтами хромосомной ДНК (фионами), локализованными в

окрестностях различных белок-кодирующих генов. Каждый комплекс фРНК — фион при взаимодействии с еще закрытыми воротами определенного ионного канала внутренней мембраны перинуклеарной цистерны обеспечивает их открывание на то очень короткое время, пока в белково-нуклеиновом комплексе (это так называемая фонтаносома) происходит конформационная перестройка, позволяющая проскочить внутрь ядра определенной дозе ионов.

Природа поступающих ионов определяется структурой фонтаносомы, т.е. она зависит от специфичности фРНК, фиона и того ионного канала, который они открывают. Вбрасываемая в ядро порция ионов именуется ионным фонтаном. Основная функция перинуклеарной цистерны состоит в депонировании ионов, поступающих коротким залпом в направлении структурного гена, приблизившегося к внутриядерной мембране со свитой своих фионов. Из одной и той же цистерны внутрь ядра к разным хромосомным генам поступают разные ионы. Это достигается только благодаря специфичности фРНК-зависимых ионных каналов, а сам кратковременно действующий ионный фонтан образуется только в случае пространственного сближения специфичной фРНК, фиона и ворот ионного канала внутренней ядерной мембраны. Поскольку акт локальной инъекции ионов в кариоплазму из их депо, т.е. из полости перинуклеарной цистерны, охватывающей кариоплазму с ее хромосомами своей двойной оболочкой, происходит только в момент конформационной перестройки фонтаносомы, время, на которое открыт ионный канал, очень мало и строго лимитировано. Вслед за этим ионный канал вновь закрывается и фонтаносома демонтируется, а ее фРНК инактивируется. Последнее осуществляется, возможно, за счет эндонуклеолиза в пределах фонтаносомы. Повторный цикл, т.е. новый акт работы ионного фонтана, возможен только с использованием новой молекулы фРНК, повторно соединяющейся с тем же фионом. Данные о влиянии на процессинг мРНК и уровень экспрессии генов разных дву- и моновалентных ионов, которые могли бы поступать в виде ионных фонтанов в ядро, приведены в работе [8].

Согласно фонтанной модели регуляции эукариотического генома, смысл существования ядра у эукариотических организмов заключается именно в обеспечении работы ионной фонтанной системы, которой лишены прокариоты и благодаря которой эукариоты способны модулировать количественные признаки клеток и организма в целом. Перемещение фионов по геному, а также изменение генного состава хрономер и принтомер в ходе эволюции являются од-

ним из ключевых моментов создания огромного биологического разнообразия эукариотических организмов нашей планеты. Каждый фонтан представляет только один свой ион (например,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  или  $\text{Cl}^-$ ), но неодинаковые комбинации фионов в окрестностях генов-мишеней могут обеспечить этим мишеням индивидуальное, сильно отличающееся от соседей, ионное окружение. Это в свою очередь влияет на локально осуществляющиеся в ядре процессы транскрипции, метилирования ДНК, фосфорилирования и ацетилирования ядерных белков, процессирования транскриптов и т.д. В частности, изменение локального уровня ионов цинка может влиять на активность белков, имеющих цинковые пальцы, т.е. на множество транскрипционных факторов, и тем самым модулировать процесс транскрипции. Изменение содержания ионов кальция могло бы, в частности, влиять на срок существования формирующихся комплексов мРНК с белками, т.е. мРНКП, меняя продуктивность гена, и т.п. Помимо влияния на количественные признаки ионы могли бы отчасти влиять и на качественные, в особенности при воздействии на альтернативный сплайсинг, картина которого, кстати, может несколько меняться при старении. Фионы, отделенные от своего гена спейсерами, могут регуляторно подтягиваться к гену или отдаляться от него из-за складывания либо распаковки спейсеров, причем в разных их комбинациях. Благодаря этому достигается огромный полиморфизм в продуктивности клеток, что резко расширяет известные до сих пор возможности эукариотического генома. Можно утверждать даже, что вообще основной смысл эукариотизма состоит именно в обладании ионной фонтанной системой, создающей огромные дополнительные возможности в достижении разнообразия и адаптаций как в животном, так и в растительном мире. От работы фонтанной системы может зависеть доминантность или рецессивность многих аллелей и ряд эпигенетических эффектов в развитии [8, 9]. Для различных событий индивидуального развития выгодно заставить один и тот же структурный ген давать разные уровни продукции в разное время. Это может обеспечить фонтанная система, ведомая в разных клетках разными наборами редусом.

Две разновидности редусом — принтосомы и хроносомы — вовлечены в процессы, связанные с контролем биологического времени и старения, но участвуют в них совершенно по-разному. Объединяет эти структуры в основном то, что их ДНК (соответственно принтомерная и хрономерная ДНК) укорачиваются с течением времени, хотя даже укорочение осуществляется у них не совсем одинаково.

В термине «хрономера» (от греч. «хронос») отражена роль этой структуры в измерении времени, а в термине «принтомера» — в его корне «принт» (отпечаток) отражена идея получения клетками отпечатка той позиционной информации, которую они интерпретируют в морфогенезах посредством принтомер (см. об этом подробнее в следующем разделе). Основная биологическая функция хрономерной ДНК, или кратко — хрономер, состоит именно в контроле за биологическим временем развития, а также (после достижения состояния зрелости) за длительностью последующего процесса старения, выражающегося в возрастзависимом ослаблении функционирования различных систем организма. Важно сразу подчеркнуть, что хрономеры не навязывают процесс старения, а, убывая по длине сами (причина убывания рассматривается в другом разделе), вынужденно ослабляют ионное обеспечение клеток и тем самым оказываются контролерами длительности старения, т.е. физически убывающим компонентом программы поддержания жизнеспособности стареющего организма. Если обозначить длину хрономера как  $L$ , а темп их исчерпания как  $V$ , то самой программой продолжительности жизни следует считать именно отношение  $L/V$ , а вовсе не величины  $L$  или  $V$  по отдельности. Соответственно программой продолжительности старения является ни что иное как отношение  $L_a/V$ , где  $L_a$  — это длина хрономера, оставшаяся в центральной нервной системе (ЦНС) к началу процесса старения соответствующих систем организма, контролируемых этими хрономерами, а  $V$  — скорость их укорочения, которая, кстати, в позднем возрасте может, вероятно, даже несколько замедляться. Для того чтобы выполнять свою миссию, хрономеры должны находиться в таких типах клеток, от координирующей активности которых зависит весь организм, но которые при этом не делятся, чтобы не вносить случайных ограничений и изменений в длину хрономерной ДНК. На роль таких клеток особенно подходят, конечно, нейроэндокринные и нейротрофические клетки ЦНС.

Другой вариант редусом — принтосомы с их принтомерной ДНК, или кратко принтомерой, — находится во многих делящихся клетках. Принтосомы с их принтомерами не имеют прямого отношения к измерению биологического времени в организме, но проявляют *in vitro* способность инициировать старение клеток. Именно из-за укорочения своих принтомер делящиеся клетки, например фибробласты, стареют при чрезмерной убыли принтомерных генов в принтомерах, что, как и в случае с хрономерами, ведет к ослаблению клеточной продуктивности и

постепенно — к старению. Многие типы делящихся *in vivo* клеток даже за всю жизнь организма, возможно, не успевают израсходовать свои принтомеры настолько, чтобы внести весомый вклад в старение всего организма, которое направляется преимущественно центрально, т.е. через хрономеры ЦНС. Но зачем же тогда вообще присутствуют в клетках принтомеры? Ответу на этот вопрос посвящен следующий раздел.

**ПРИНТОМЕРЫ ЗАПОМИНАЮТ  
ПОЗИЦИИ КЛЕТОК ПРИ ЧТЕНИИ  
ПОЗИЦИОННОЙ ИНФОРМАЦИИ  
В МОРФОГЕНЕЗЕ И В СООТВЕТСТВИИ  
С ПОЗИЦИЕЙ НАВСЕГДА ИЗМЕНЯЮТ  
СВОЙСТВА КЛЕТОК. УКРОЧЕНИЕ  
ПРИНТОМЕР И СТАРЕНИЕ  
ДЕЛЯЩИХСЯ КЛЕТОК**

Известно, что детерминация целого обычно наступает в эмбриональном развитии раньше, чем детерминация частей. Связанный с этим универсальный феномен эмбриональных регуляций зарегистрирован на эмбрионах самых разных видов и стадий развития. Этот феномен, как известно, состоит в том, что развитие целого зародыша осуществляется даже при нехватке, избытке либо перетасовке клеток, подвергающихся затем воздействию индуктора. Наиболее существенно, что формирование частей эмбриона происходит при этом все равно в геометрически гомологичных положениях, т.е. судьба частей связана инвариантно (через систему индукционных взаимодействий) с координатами этих частей относительно целого (обзор [10]). Здесь предполагается, что такой результат возможен только благодаря тому, что в морфогенетическом поле (т.е. на эмбриональной территории, вдоль которой создается градиент концентраций морфогена) судьба частей определяется на основе позиционной информации, которая интерпретируется клетками, создающими в своем ядре именно те принтомеры, которые соответствуют позиции, занимаемой данной клеткой в морфогенетическом поле. Представление о принтомерах, по-видимому, позволило бы объединить так называемые «геноцентрическое» и «морфоцентрическое» направления в эмбриологии, которые до сих пор сосуществуют несколько изолированно [11, 12].

Конкретный способ чтения позиционной информации — это одна из ключевых, но до сих пор нерешенных проблем биологии развития [13]. Миссия принтомер — это решение проблемы интерпретации и запоминания позиционной информации в ходе морфогенетических

дифференцировок. В морфогенетическом поле клетки-предшественники, как известно, должны неким образом определить свою позицию на оси концентрационного градиента химического индуктора. Клетки определяют, далеко или близко они находятся от источника этого индуктора. Исходно совершенно одинаковые, различающиеся только своей позицией в морфогенетическом поле, клетки запоминают это свое отличие и передают память о нем своим потомкам. На этой способности основано отличие регуляторного морфогенеза (принтомеры должны существовать) от мозаичного, или автономного, морфогенеза, при котором каждая клетка дифференцируется независимо от ее позиции относительно окружающих клеток (принтомеры не требуются). Регуляционный морфогенез характерен для человека, автономный — для червя *Caenorhabditis elegans*, у которого, кстати, нет типичного гетерохроматина, где могли бы быть спрятаны протопринтомеры. В регуляционном морфогенезе клетки, готовые принять решение, применяют бинарную стратегию — выбор из двух возможностей. Так называемые «компетентные» клетки имеют две подготовленные к распаковке протопринтомеры разной специфичности. Первая протопринтомера распаковывается лишь в том случае, если вокруг клетки создавалась высокая концентрация индуктора, что территориально происходит только недалеко от источника этого индуктора. Вторая протопринтомера распаковывается, наоборот, очень легко даже при низкой концентрации индуктора, т.е. при расположении клетки вдали от источника. Поэтому вблизи источника индуктора распаковываются обе возможные протопринтомеры и на них создаются их перихромосомные копии — обе возможные принтомеры. Эти принтомеры затем репликативно наследуются в черед сома- тических клеточных поколений. Вдали от источника, т.е. при низкой концентрации индуктора дифференцировки, в клетке распаковывается только одна, наименее резистентная к распаковывающему агенту протопринтомера. Поэтому клетки, расположенные в морфогенетическом поле вдали от индуктора, получают лишь один вариант принтомеры. Следовательно, клетки, различавшиеся позицией в морфогенетическом поле, приобретают и могут в дальнейшем поддерживать разные специфичности, определяемые набором активных в них принтомер. Это-то и служит основой для создания в морфогенезе гетерогенных структур из исходно одинаковых клеток.

Если гетерохроматин с его протопринтомерами запечатан липидными скрепками, то роль распаковывающего агента могли бы исполнять

свободные радикалы [14], инициирующие их деструкцию. Она возможна, например, при перекисном окислении липидов. К деструкции под действием свободных радикалов ДНК и белки, как известно, относительно более резистентны, чем липиды, поскольку именно в последних возможно развертывание цепных реакций, ведущих к разрушению липидной структуры. Внутрядерная концентрация свободных радикалов, предположительно повышенная в клетках, находящихся вблизи источника морфогена, могла бы играть роль либо ножа, либо сигнала, действующего через кальций и другие вторичные мессенджеры, для вскрытия сосуда с протопринтомерным джином, запаянным в нем липидной печатью. В случае своей сигнальной функции свободные радикалы, как известно, могут взаимодействовать с кальциевой системой клетки, передающей сигнальную информацию далее, пока она не достигнет в данном случае соответствующих протопринтомер, распечатываемых в этом альтернативном варианте уже не самими свободными радикалами, а, допустим, ферментами, активируемыми указанной сигнальной информацией. Изложенное представление о причине существования принтомер — это гипотеза «принтомерной интерпретации позиционной информации». Главное в ней, конечно, именно роль принтомер в интерпретации позиции клеток, а не сама конкретная природа агента, ведущего к распаковке протопринтомер. Следует отметить, что в принципе не всем клеткам даже в регуляционном морфогенезе необходимо знать о своей позиции. Это относится к стволовым клеткам, ко многим клеткам вегетативно размножающихся растений и т.п. Отсутствие принтомер у таких делящихся клеток (но, конечно, при адекватной компенсации теломеразой или транспозонами и т.п. эффекта концевой недорепликации их теломерной ДНК) делает такие клетки потенциально бессмертными.

Итак, и принтомеры, и хрономеры выполняют важные миссии в онтогенезе, хотя и на разных уровнях его регуляции. Хрономеры эволюционно происходят от принтомер не только потому, что функция определения позиции должна была возникнуть раньше функции контроля за временем. Клеткам мозга в морфогенезе, так же как и прочим клеткам, надо интерпретировать свою позиционную информацию. Для выполнения этой важнейшей задачи нейроэндокринным клеткам в принципе также необходимы свои принтомеры. Затем функции принтомер в эволюции усложнились и некоторые из них помимо интерпретации позиционной информации стали специализироваться также на темпоральной функции. Наиболее просто совместить

две названные функции в одной структуре, если сначала будущая хрономера работает как принтомера, а затем (уже в постмитотических нейронах) процессируется до истинной хрономеры, имеющей стандартную для вида длину. После процессинга хрономера приступает к своей основной обязанности — начинает измерять биологическое время.

Число копий принтомер в одной принтосоме может варьировать от одной копии до целой группы принтомер. В отличие от принтомер число хрономер в неделящейся клетке, возможно, не меняется. Важно, впрочем, подчеркнуть, что даже разное число копий хрономер на клетку не должно отражаться на их главной функции, ибо укорочение осуществляется с конца каждой линейной молекулы ДНК, независимо от того, сколько таких молекул лежат в хроносоме рядом, бок о бок. Все принтомеры обязаны иметь собственный *ori*, чтобы реплицироваться вместе с клетками. Кстати, в связи с присутствием в принтомерах *ori* следует заметить, что при дифференцировке терминально дифференцированных клеток в них должна быть отключена активность принтомерного *ori*, чтобы запретить независимую репликацию принтомер. Что касается хрономер, то они также должны иметь собственный *ori*, если в ходе морфогенеза в индивидуальном развитии они сначала выполняют функцию принтомер (т.е. функцию запоминания информации о позиции клетки) и лишь позже процессируются до истинных хрономер. Но даже если хрономера синтезируется впервые в уже постмитотическом нейроне, этот ее синтез обязан происходить за счет локального копирования сегмента хромосомной ДНК — протохрономеры, в которой для указанной цели обязан присутствовать собственный *ori*. И этот *ori* должен быть также повторен в копии протохрономеры, т.е. в новорожденной хрономере.

Строгое соблюдение копияности отнюдь не является чем-то принципиальным для выполнения принтомерами их функций, т.е. для интерпретации позиционной информации и организации специфичных для цитодифференцировок паттернов экспрессии хромосомных генов. Обе их функции осуществляются при участии фРНК, модулирующих работу фонтанной системы ядра, и микроРНК, вовлеченных в ремоделинг хроматина и другие процессы, связанные с регуляцией экспрессии хромосомных генов. Число принтомер в принтосоме у разных клеток может быть не строго одинаковым и, как будет показано в заключительных разделах, это имеет далеко идущие биологические последствия.

Принтомеры в делящихся клетках являются объектом концевой недорепликации ДНК и в

этом отношении процесс их укорочения аналогичен таковому для теломерной ДНК. В целях обеспечения своей репликации каждая прынтомера имеет собственный *ori* в медиальной части, а акромеры соответственно расположены по обеим ее концам. Поэтому акты репликации прынтомеры в ходе каждого клеточного удвоения ведут к последовательной утрате тех ее генов, которые ближе других расположены к акромере на каждом из двух плечей прынтомеры. Вслед за исчерпанием акромеры ближайший субакромерный ген прынтомеры немедленно подвергается нуклеазному разрушению. Вслед за этим ближайший акромероподобный спейсер, получив свободный конец своей ДНК, трансформируется в новую акромеру этой укоротившейся прынтомеры. Некоторые типы прынтомер могут обладать большим числом повторяющихся специфических генов, постепенное уменьшение числа которых не сразу сказывается на изменении состояния клеточной дифференцировки, хотя и ведет к постепенному ослаблению пролиферативной способности клеток по мере клеточных удвоений. Если акромеры очень длинные, то в прынтомере не требуется большой запас генов. Ввиду неизбежности укорочения акромер делящихся клеток те из них, которым предстоит в норме осуществлять большое число делений, должны обладать прынтомерами как раз с относительно длинными акромерами, приносимыми одновременно с теломерами в жертву концевой недорепликации ДНК. Однако в любом варианте убыль прынтомер ведет к постепенному ослаблению клеточных функций за счет изменения соотношения концентраций различных белков в клетках, а затем и к остановке делений, причем именно укорочение длины прынтомер может играть роль того внутреннего митотического счетчика, принципиальное существование которого впервые показано в работах Хейфлика [15–17].

При прочих равных условиях для клетки выгодно иметь на обоих флангах своих прынтомер акромеры неодинаковой исходной длины. В этом случае исчезновение субакромерных генов на обоих плечах (каждое плечо — это дистанция между *ori*, расположенным в центре молекулы ДНК, и абсолютным концом соответствующей акромеры) будет совершаться последовательно — то на одном плече, то на другом. А это выгоднее в отношении экономии материала, чем одновременная утрата генов сразу на обоих флангах. Если в прынтомере имеется, допустим, всего по два гена в каждом плече и они утрачиваются из-за концевой недорепликации в делящейся клетке не одновременно и если до потери каждого из четырех генов клетка может выполнить 10 мито-

зов, то в целом укорачивающаяся прынтомера может поддерживать клетку в течение 40 митозов. После каждой потери одного из таких четырех генов гомеостатические возможности клетки снижаются из-за утраты очередной порции генов, пока, наконец, прогрессирующее клеточное старение не приведет к репликативному аресту, т.е. к прекращению делений. Если бы гены терялись симметрично, то этот результат клон получал бы раньше.

В прынтомере молодой клетки содержится генов больше, чем в старой клетке, в том числе и фРНК-генов, повышающих продуктивность структурных хромосомных генов, необходимую для полноценной работы клетки. Именно этим можно объяснить факты, согласно которым клетки молодого донора мигрируют из эксплантата в более быстром темпе [18], размножаются быстрее [19], а колонии из одной клетки вырастают крупнее [20], чем в случае клеток от старых доноров.

Какой же длины должна быть первоначальная длина прынтомеры, например, у фибробластов человека? Если теломера фибробласта укорачивается на ~100 п.н. за каждое из 50 удвоений, то в течение пролиферативной жизни клона она уменьшается на 4 т.п.н. [21–23]. То же самое может быть отнесено и к прынтомере как линейной молекуле ДНК. Поскольку прынтомера укорачивается из-за концевой недорепликации при удвоении клеток синхронно с теломерами, то известную величину теломерного укорочения можно принять за приблизительный ориентир. Соответственно, 50 удвоенный фибробласт мог бы выполнить, если бы общая длина акромерной ДНК (собственно акромера и все спейсеры, последовательно трансформирующиеся в акромеру) составляла 5 т.п.н. И все это без учета роли второго плеча прынтомеры и длины ее генов. Впрочем, длина каждого гена фРНК и гена микроРНК, вероятно, невелика — меньше 50 п.н., поскольку, например, фРНК должны быть низкомолекулярными для успеха их взаимодействий с феоинами. Число генов в одной прынтомере также может быть небольшим — для многих случаев достаточно, вероятно, пяти-шести генов на одну прынтомеру с длинными акромерами. Если учесть длину обеих плечей, пространство для *ori* и промоторов транскрипции, то общую предполагаемую длину прынтомерной ДНК можно оценить в 12–15 т.п.н. Ранее уже было высказано предположение, что укорочение прынтомер (а не теломер) могло бы быть инициатором процесса старения делящихся клеток [24]. Однако представление о хрономерах (а это главный фигурант общеорганизменного старения) и о скраптинге еще отсут-



ствовало. В следующем разделе обсуждается вопрос о том, как именно работают хрономеры, которые сначала помогают созданию зрелого организма, а потом с той же методичностью влекут его в бездну старения.

### **СВОЙСТВА ХРОНОМЕР. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ВРЕМЯ В ИНДИВИДУАЛЬНОМ РАЗВИТИИ ИЗМЕРЯЕТСЯ ХРОНОМЕРНОЙ ЛИНЕЙКОЙ. ЧТО ТАКОЕ СКРАПТИНГ И ЗАЧЕМ ОН НУЖЕН ХРОНОМЕРЕ?**

В отличие от принтомер функция хрономер — обеспечивать направленный поток биологического времени в ходе вечного повторения индивидуального развития организмов. Основное отличие хрономер от принтомер — отличие не только по функциям, но и по способу укорочения их ДНК. Как может измерять течение биологического времени хрономерная ДНК через ее предполагаемое укорочение, если нейрональные клетки основную часть жизни организма не делятся и, значит, не может иметь место процесс концевой недорепликации линейной ДНК? Прежде чем рассмотреть возможный ответ в некоторых деталях, следует несколько подробнее остановиться на свойствах хрономер.

Хрономера — это линейная молекула ДНК, образующаяся на протохрономере в виде ее латерального амплификата. Хрономеры, как и принтомеры, вместе с покрывающими их белками располагаются в хромосомных гнездах, т.е. в трехмерном уложенном хромосомном хроматине, формирующем подобие ложа для постулируемой органеллы. Хрономеры не составляют единую молекулу с хромосомной ДНК. Как и принтомеры, хрономеры — это, так сказать, перихромосомная ДНК, в отличие от экстрахромосомной ДНК, покидающей хромосомные пределы. Измерение течения биологического времени с помощью хрономер ведется на основе укорочения хрономерной ДНК в ходе особой формы ее транскрипции. Укорочение хрономер обусловлено постулируемым здесь и рассматриваемым ниже процессом так называемого «скраптинга». Он вызывает формирование нерепарируемых концевых брешей в хрономерах, что и приводит к их последовательному, ступенчатому укорочению. Сигналом для нейроэндокринной клетки, в которой находится хрономера, свидетельствующим, что истек очередной промежуток биологического времени, является исчезновение из хрономеры ее очередного гена фРНК либо гена микроРНК (а, возможно, даже и копий некоторых белок-кодирующих генов, если и они вхо-

дят в состав некоторых хрономер). В разных типах нейроэндокринных клеток имеются разные по специфичности хрономеры, а в целом в ЦНС существует целая сеть из разных хрономер, помогающих своим функционированием упорядочивать во времени все процессы индивидуального развития. Не все типы хрономер должны существовать в нейрональных клетках с раннего эмбриогенеза. Вполне возможно, что существует своеобразная эстафета создания и последовательного исчезновения определенных хрономер. Если в разных центрах мозга хрономеры принимают на себя миссию измерения времени не все вместе, а по очереди, т.е. как эстафету, — сначала в одном нейронном ансамбле, затем в другом и т.д., то стартовую длину хрономер можно было бы значительно сократить. Это позволило бы экономить на размере их ДНК, закодированной в геноме. Все, что требуется для этого — это избирательный ответ определенных клеточных ансамблей на сигнал, побуждающий хрономеры к укорочению. Минусом такой тактики является необходимость организации неслучайной очереди из этих клеточных ансамблей. Утрата хрономерного буфера, т.е. акромеры, ведет к немедленной потере незащищенного ею гена вследствие его разрушения нуклеазами. С потерей акромеры на защиту оставшихся генов в хрономере, как и в принтомере, встает очередной акромероподобный межгенный спейсер, процессирующий до новой акромеры. Так что хрономера — это своеобразная динамическая структура. Длина хрономеры коррелирует с числом содержащихся в ней генов. Поскольку общее число оставшихся хрономерных генов ступенчато убывает, это позволяет клеткам, владеющим хрономерами, оценивать величину истекшего биологического времени.

До тех пор, пока даже убывающая в своей длине акромера еще не исчезла, биологическое время сохраняется прежним, оно «заморожено». Поэтому, по крайней мере на уровне индивидуальной нейроэндокринной клетки, биологическое время не течет плавно. Измерение времени в клеточном биохронометре осуществляется рывками, так как хрономерные гены теряются пошагово. Если клетки соответствующих нейронных ансамблей действуют строго синхронно, то и уровни контролируемых ЦНС разных гормонов с течением времени меняются в организме вовсе не плавно, а ступенчато. Если же клетки нейронных ансамблей ведут себя в указанном отношении не слишком строго согласованно, то эти ансамбли выдают (в виде уровней разных гормонов) некое усредненное биологическое время. В этом случае биологическое время на уровне целостного организма течет более плавно.

Стартовая длина акромер, несомненно, является объектом эволюции, точно так же, как и весь генный состав хрономеры. Поэтому, чтобы правильно отправлять свою функцию измерения биологического времени, длина даже не содержащей генов хрономерной акромеры ни в коем случае не должна меняться под действием теломеразы. Следовательно, в нейроэндокринных и нейротрофических клетках ЦНС, где функционируют хрономеры, должно выполняться одно из двух условий: а) последовательность, распознаваемая теломеразой, в акромерах хрономер вообще отсутствует либо б) в этих клетках жестко запрещена сама теломеразная активность. В отличие от человека и мыши в мозгу, например золотистой форели, теломераза не отключена [25]. Поэтому акромерная последовательность в хромерах их взрослого мозга заведомо не должна содержать последовательности  $T_2AG_3$ .

Если какие-то виды, достигнув состояния зрелости, переходят к использованию других хрономер, которые удлинились бы теломеразой (либо вообще отказываются от хрономер на определенном этапе онтогенеза), то такие организмы вообще могли бы не стареть. Обычно считается, что неделяющаяся клетка не может не стареть. Но о чем говорит возможность существования неделящихся нейронов человека десятками лет против всего лишь нескольких месяцев у дрозофилы? Только ли о том, что система репарации у мух слабее? Может быть, истинная причина состоит в другом, а именно в том, что эукариотическая клетка (в том числе и неделящийся нейрон) молода до тех пор, пока имеет достаточный запас генов в своих редусомах. И благодаря этому она могла бы сохранять способность к полноценной репарации случайных повреждений. Впрочем, возможна и альтернатива экспрессии новых хрономер. Суть ее в следующем. Дистальные хрономерные гены защищены акромерами не- $T_2AG_3$ -типа, тогда как локализованные ближе к середине хрономер гены фланкированы спейсерами как раз типа  $T_2AG_3$ . Эти медиальные спейсеры в свой черед (при достижении организмом зрелости) должны стать акромерами. Но как раз эти акромеры, постоянно удлиняемые присутствующей в мозгу теломеразой, могли бы более не укорачиваться, обеспечивая остановку течения биологического времени для своего хозяина.

Организация правильного расписания событий индивидуального развития, которые должны быть точно распределены во времени, а не только в пространстве формирующегося организма, возложена именно на хрономеры. Если в ходе индивидуального развития некоторые ти-

пы хрономер исчерпаются, теряя свои гены, а им на смену формируются новые хрономеры (либо просто продолжают работать исходно более длинные хрономеры других специфичностей), то проблема контроля за биологическим временем становится просто проблемой длины соответствующих хрономер. Исчезновение некоторых генов из хрономер, которые, например, поддерживали синтез белков-ингибиторов каких-то процессов, открывает возможность для начала осуществления таких процессов и т.п. Предполагается, что в целом совокупность хрономер мозга вместе с системой Т-ритмов и всей фонтанной системой ядра является тем механизмом, который работает как таймер развития.

Для обеспечения устойчивого функционирования хрономеры она должна быть защищена от нуклеазных атак и, очевидно, не должна покидать своего хромосомного гнезда. Удержание хрономер, как и принтомер, в их хромосомных гнездах осуществляется за счет междууплексных G—G-взаимодействий и белковых мостиков. Однако в этих взаимодействиях участвует не вся длина редусомной ДНК, а в основном ее G-богатые акромероподобные межгенные спейсеры и сами акромеры. Междууплексные G—G-взаимодействия осуществляются между указанными последовательностями ДНК редусомы и гомологичными последовательностями хромосомного гнезда. И в хроносоме, и в принтосоме концы ДНК должны быть защищены от нуклеаз. Утрата акромеры, т.е. буфера, ведет к немедленной потере незащищенного буфером гена. С утратой всей акромеры, как и в принтомерах, на защиту оставшихся генов встает очередной акромероподобный межгенный спейсер, процессирующийся до полноценной очередной акромеры. Абсолютные концы акромерной ДНК этих органелл закрепляются взаимодействием с ДНК и хроматином хромосомного гнезда, что напоминает взаимодействие абсолютного конца теломерной ДНК, замыкающегося петлей на собственную хромосому. В случае редусом, однако, концы редусомной ДНК замыкаются не на тело редусомы, а на тело хромосомы. Благодаря этому достигаются как минимум две цели. Помимо защиты от экзонуклеаз при этом преследуется вторая, не менее важная именно для хрономер цель — создание предпосылки для последующего проявления возможностей скраптинга: механически индуцируемая деструкция конца ДНК (варианты того, как это происходит, рассматриваются ниже) возможна только в том случае, если конец акромеры был предварительно иммобилизован.

Укорочение хрономерной ДНК осуществляется за счет процесса так называемого «скрап-

тинга». Термин «scrapping» образован устранением лишних букв из выражения «transcription — coupled rupture of terminus». Под скраптингом подразумевается процесс, который осуществляется при специально инициируемом чрезмерно высоком темпе транскрипции редусомной ДНК и который приводит к механическому разрыву связи между концом акромерной ДНК и сайтом ее закрепления в хроматине хромосомного гнезда. Физически причиной события является возникновение критически высокого механического напряжения в ДНК вблизи иммобилизованного конца транскрибируемой акромеры. Акромера транскрибируется вместе с генами, несмотря на то, что она является неинформационной буферной ДНК. Отрыв конца акромерной ДНК от участка ее закрепления на хромосомной ДНК (т.е. разрыв нековалентной связи), как и разрыв ковалентной связи в самой ДНК, возможен только тогда, когда к закрепленному на хромосоме концу акромеры хрономеры или принтомеры на очень большой скорости приближается РНК-полимераза. Акты скраптинга повторяются регулярно, но редко. В норме они рассчитаны только на укорочение хрономер, а не принтомер, хотя принтомеры, особенно *in vitro*, также могут стать объектом скраптинга. Как часто в норме повторяются акты скраптинга и чем регулируются интервалы между ними — эти вопросы рассматриваются далее в разделе о Т-ритме.

В отличие от принтомер хрономеры находятся в неделящихся клетках мозга и потому не могут укорачиваться за счет концевой недорепликации, имеющей место только в реплицирующихся, делящихся клетках [26–28]. Поэтому ради работы предполагаемых хрономер природа должна была изобрести способ, который мог бы работать даже в отсутствие репликации. Для этой цели могла бы подойти транскрипция, если бы РНК-полимераза в определенных условиях помогала укорачивать ДНК на основе обсуждаемого скраптинга. Если это возможно, то природа вряд ли могла пройти мимо. Механизм скраптинга используется для блага организма как в эмбриональном, так и в постнатальном развитии, вплоть до достижения организмом зрелости. В дальнейшем, однако, скраптинг также продолжает функционировать, но это уже ведет к старению из-за утраты хрономерами остающегося «неприкосновенного запаса» их генов. С утратой этих последних резервов активность клетки, как и всего организма, увядает.

В ходе скраптинга на конце акромерной ДНК формируется концевая нерепарируемая брешь, что ведет к укорочению линейной молекулы хрономерной ДНК. Исходно, при создании

хрономеры за счет именно репликации ДНК, ее акромеры, как и теломеры, имеют 3'-концевой оверхенг. Так что исходно акромера еще на старте своего существования уже имеет концевую нерепарируемую брешь и в дальнейшем эта ситуация сохраняется, только сама концевая брешь постепенно смещается к центру укорачивающейся молекулы. Транскрипция акромерной ДНК заканчивается при актах скраптинга вблизи более короткого 5'-конца транскрибируемой цепи хрономеры. Условия репарации на конце линейной ДНК имеют принципиальные особенности, отличающие этот процесс от репарации ДНК в медиальной части линейной молекулы. Если, например, однонитевой разрыв появляется рядом с абсолютным концом ДНК, то это с неизбежностью должно привести к процессу так называемой «концевой недорепарации» ДНК [29, 30]. Процесс концевой недорепарации ДНК внешне весьма напоминает процесс концевой недорепликации ДНК. Однако недорепарация может иметь место даже в неделящихся клетках и именно из-за нее короткие концевые бреши в ДНК принципиально нерепарируемы. Их нерепарируемость обусловлена следующими двумя основными обстоятельствами.

Если в брешу имеет место 5'-оверхенг (выступ 5'-концевой нити), а 3'-конец находится во второй нити на расстоянии одного или нескольких нуклеотидов от более длинного конца, то конец этой второй нити нельзя использовать в качестве праймера. Причина этого — «зависание» репарирующей машины за пределами матрицы, которое, по-видимому, несовместимо с нормальной работой фермента, не способного в этих условиях подвести свой каталитический центр к концевому матричному нуклеотиду(ам), не утратив обычного полного контакта с матрицей. Поэтому репарация короткой концевой бреши, имеющей 5'-оверхенг, оказывается невозможной. Это ведет к укорочению молекулы ДНК при последующем уничтожении 5'-оверхенга. В этом суть первого варианта, но возможен и еще один. Если концевая брешь имеет 3'-оверхенг, то ДНК-полимераза репаративного синтеза не может залечить такую брешь просто ввиду неспособности полимераз наращивать 5'-конец ДНК. В обоих рассмотренных случаях линейная молекула ДНК оказывается укороченной на длину нерепарируемой концевой бреши. В этом суть феномена концевой недорепарации ДНК. Именно из-за него последствия скраптинга в виде появления небольшой концевой бреши оказываются принципиально значимыми для хрономер и их способности измерять биологическое время. Что касается теломеразы, то она могла бы вмешиваться в контроль за длиной

хрономер, но только при одном неперменном условии: если акромерная часть хрономеры, подобно теломере, содержит опознаваемые теломерой повторы  $T_2AG_3$ .

Приняв, что появление концевых брешей действительно могло бы вести к укорочению акромеры, необходимо ответить подробнее на главный вопрос: какова первопричина возникновения таких брешей, т.е. каковы детали процесса самого скраптинга? Акты транскрипции идут весьма часто и если бы каждый из них уносил даже по одному нуклеотиду, то за очень короткий срок любая акромера была бы уничтожена. Поэтому, если предполагаемый механизм скраптинга — укорочение конца матрицы с участием ее транскрипции — действительно лежит в основе измерения биологического времени, то скраптинг должен был бы совершаться только при неких уникальных и редко повторяющихся актах так называемой «суперскоростной» транскрипции. Высокая скорость движения полимерной машины требуется здесь для того, чтобы она могла (за счет критически высокого торзионного напряжения в ДНК) вызвать либо разрыв конца акромеры, либо отрыв абсолютного конца акромерной ДНК от сайта его закоривания. В последнем из этих двух случаев далее мог бы осуществляться ферментативный процессинг акромеры, укорачивающий конец ДНК на небольшое и стандартное количество нуклеотидов перед тем как акромерный конец будет вновь запряган и закорен в хромосомном гнезде.

При движении РНК-полимеразы вдоль неэластичной молекулы ДНК должны мигрировать торсионные пульсационные волны [31]. Однако закрепленность конца акромерной ДНК в хромосомном гнезде ставит непреодолимое препятствие для их дальнейшего распространения, что при очень высокой скорости движения транскрипционного комплекса как раз и создает напряжение, достигающее максимума именно вблизи закрепленного конца акромеры, т.е. там, где топоизомеразы не имеют пространства для маневра, а именно для сбрасывания избыточного напряжения. Относящиеся к скраптингу события связаны с чрезмерно высоким торзионным напряжением, возникающим из-за увеличения сверхскрученности ДНК на коротком отрезке акромеры — между ее концевым сайтом закоривания и стремительно приближающейся к нему транскрипционной машиной. Предполагается, что в этой узкой зоне наивысшего торзионного напряжения топоизомеразы не имеют достаточного свободного пространства, чтобы осуществить доступную им активность — сброс излишнего напряжения. Суперскручивание является свойством любой молекулы ДНК, не

имеющей конца, способного к вращению, а сама акромера закреплена своим концом на теле хромосомы и потому ее вращение исключено.

Только что укороченная хрономера обязательно должна быть защищена от немедленных повторных актов укорочения. Как избежать того, чтобы следующая же молекула РНК-полимеразы не отняла от хрономеры еще столько же нуклеотидов, вызвав очередное укорочение. Если предлагаемый сценарий верен, то должно соблюдаться некое условие, предотвращающее такой поворот событий. Должен существовать механизм, обеспечивающий осуществление всего лишь одного акта скраптинга за один пик особого гормонального биоритма, или Т-ритма (см. о нем в следующем разделе). Максимальная гормональная активность, соответствующая этому пику, по времени длится очень недолго — возможно, всего ~10 мин — и повторяется вновь только через день, через одну-две недели или месяц — у разных видов животных, очевидно, по-разному. Но ведь и 10 мин достаточно, чтобы погубить всю акромеру, если бы акты скраптинга следовали один за другим непрерывно. Необходимая однократность возникновения околоконцевого разрыва связи между акромерой и хроматином хромосомного гнезда в подобных условиях (т.е. в случае суперинтенсивной транскрипции акромеры на фоне пика Т-ритма) возможна и, более того, предельно легко достижима. Дело в том, что однократное отсоединение конца акромеры от сайта его иммобилизации в гнезде немедленно сбрасывает торзионное напряжение, порожденное транскрипционной машиной в условиях, когда топоизомеразы ей не ассистируют. Расставшись с внутригнездовым сайтом закоривания, акромерная ДНК релаксирует. Теперь РНК-полимеразы уже не способны вновь создавать торзионное сверхнапряжение, поскольку высвободившийся из иммобилизирующего плена конец акромерной ДНК обретает способность вращаться. Возможность повторных актов скраптинга тем самым немедленно устраняется. Укороченная акромера должна восстановить защиту своего абсолютного конца, вновь упряган его в хромосомном гнезде с помощью белков и хромосомной ДНК. На полное восстановление трехмерной терминальной конструкции акромеры, позволяющей затем соответствующим ферментам восстановить нормальное состояние суперспирализации ДНК, оптимальное для эффективной транскрипции хрономеры, уходит довольно много времени — вероятно, несколько часов. Основное время уходит на осуществление повторной инсерции акромерного конца в хромосомное гнездо. Сам свободный конец акромеры, видимо, очень быстро закрыва-

ется защитными белками, но это лишь начало долгой процедуры по воссозданию оптимальной трехмерной нуклеопротеидной структуры — акросомы, заново вмонтированной в хромосомное гнездо. Необходимо, чтобы плечо хрономеры вместе с акромерой опять наиболее оптимально расположилось бы в гнезде, размер которого отнюдь не убавился с укорочением акромеры, поскольку гнездо — это трехмерная полость, созданная конфигурацией хроматина хромосомы, а не редусомы. Ложе для редусомы теперь оказывается несколько великоватым. Поэтому для взаимной пространственной подгонки гнезда и редусомы необходимы перемещения не только в пределах плеча редусомы, но и в хроматине самой хромосомы. На все это уходит, возможно, один или даже несколько часов. Только после того, как конец акромеры вновь будет надежно иммобилизован, могла бы в принципе возобновиться сверхскоростная транскрипция хрономеры. Однако для этой транскрипции требуется, как уже сказано, максимум гормональной активности, которая бывает только на пике Т-ритма. Если же Т-ритм отрегулирован в эволюции так, что продолжительность его пика невелика (например, 10 мин), то к моменту завершения репарации акромеры пик Т-ритма уже давно благополучно минует. Поэтому теперь Т-ритм уже не может немедленно побудить хрономеру к новому акту скраптинга, который теперь возможен лишь с приходом очередной максимально высокой волны Т-ритма. Эти гормональные максимумы повторяются, например, только через пару недель или месяц, в зависимости от типа Т-ритма, характерного для данного вида животных.

Важно подчеркнуть, что изложенная суть рассуждений относительно укорочения акромеры при участии скраптинга принципиально не меняется в зависимости от разных вариантов скраптинга. Один из них — это просто механический разрыв акромерной ДНК, не выдерживающей напора транскрипционной машины, побуждаемой к суперскоростному движению вдоль матрицы пиком гормонального Т-ритма. Второй вариант скраптинга мог бы быть реализован несколько иначе. Вблизи конца акромерной ДНК возникает односторонний разрез благодаря эндонуклеазной активности самой транскриптосомы, активирующейся в том исключительном случае, когда транскрипционный комплекс оказывается на критически суперскрученном сегменте ДНК. Этот вариант, однако, опасен тем, что сопряжен с разрывами ДНК, некоторые из которых могли бы возникать и в самой хромосомной ДНК, если бы транскрипционная машина при суперинтенсивной транскрипции действительно могла наносить ник, встретив-

шись с механическим препятствием. Впрочем, как известно, в распоряжении клетки имеется специальный механизм репарации, сопряженной с транскрипцией. Еще один, третий, механоэнзиматический вариант скраптинга мог бы состоять в следующем. В условиях суперскоростной транскрипции транскриптосома, создавая предельно высокое торзионное напряжение в конце акромерной ДНК, буквально с корнем вырывает заякоренный в хромосомном гнезде абсолютный конец акромерной ДНК. Вслед за этим актом немедленно начинается (но длится очень долго — вероятно, нескольких часов) процессинг высвободившегося конца акромеры. Смысл процессинга — подготовить и осуществить повторное заякоривание акромеры, а заодно в ходе этой подготовки укоротить (но в этом, третьем, варианте только чисто энзиматически) акромерную ДНК, причем уменьшить ее на строго стандартную величину. Эта величина могла бы контролироваться акросомой, т.е. белковым комплексом, формирующимся на торце вырванной из хромосомного гнезда двойной спирали акромерной ДНК. Этот третий вариант должен быть аналогичен событиям, протекающим при трансформации акромероподобного спейсера в акромеру, когда указанный исходно межгенный спейсер оказывается на свободном конце уменьшающейся хрономеры. Такое случается в хрономере сразу после утраты ею вместе с акромерой еще и очередного (всякий раз субакромерного) гена. Процессинг завершается инсерцией акросомы в тело хромосомы, за счет которой акромера, наконец, вновь обретает состояние иммобилизованности. Конец акромеры должен быть защищен некоей трехмерной протекторной структурой, наиболее вероятно, родственной тем структурам, которые существуют на абсолютном конце теломеры [23]. Два последних варианта укорочения ДНК имеют перед первым, с его чисто механическим обрывом ДНК, то преимущество, что они увеличивают точность выбора сайта, на величину которого в результате скраптинга будет укорочена длина акромеры. Однако третий (акросомный) вариант является, очевидно, наиболее безопасным для генома, поскольку он не сопряжен с созданием внеплановых повреждений в случайных местах хромосомной ДНК и контролируется белками акросомы, формирующейся только на торце акромеры. Белки акросомы могли бы опознавать именно акромерную последовательность, представленную повторами, наподобие теломеры, но вовсе не обязательно именно теломерными гексануклеотидами. Наличие определенных повторов в акромере облегчало бы ее распознавание при сборке белков на ее конце,

т.е. при сборке акросомы. Кроме того, наличие повторов в акромерной ДНК, вероятно, помогало бы правильной ориентировке белков акросомы и выбору точки энзиматического обрезания акромерной ДНК, вошедшей в состав акросомы, что обеспечивало бы укорочение конца акромеры на строго определенную величину. В случае наиболее вероятного, третьего, варианта скраптинга акромера могла бы расходоваться особенно экономно. При энзиматическом процессинге конца акромеры, высвободившегося из своего иммобилизирующего плена, ферментативный комплекс акросомы, ориентируясь на акромерные повторы (например, гексануклеотиды, по аналогии с теломерой), мог бы удалять только один концевой повтор и на этом завершать укорочение акромеры. Таким образом, за один акт скраптинга в таком случае из цепи удалялось бы 6 нуклеотидов. Последовательность нуклеотидов в акромерном повторе у разных видов организмов, однако, может быть разной.

Гены как в хрономерах, так и принтомерах (в отличие от обычных структурных генов хромосом) не имеют терминирующей последовательности. Поэтому РНК-полимераза, покидая пределы самого крайнего, т.е. субакромерного, гена, продолжает транскрипцию, транскрибируя теперь уже неинформативную акромерную ДНК. В обычном, не сверхскоростном режиме транскрипции РНК-полимераза при возникновении неустраняемой сверхспирализации вблизи конца акромеры просто отсоединяется от своей матрицы, не нанося никакого вреда молекуле ДНК. Поэтому в интервалах между пиками Т-ритма акромерная ДНК даже и вблизи своего закрепленного в гнезде конца сохраняет нативную структуру и не подвергается укорочению. Но как только приходит очередной «девятый вал» Т-ритма, акт скраптинга повторяется в связи с резким ускорением движения РНК-полимераз. Кстати, способность индивидуальных РНК-полимераз бегать по матрице с разными скоростями была продемонстрирована прямыми наблюдениями [32–35].

Следует заметить, что присутствие терминаторов транскрипции в хрономерных генах лишило бы хрономеры возможности вести счет времени. Длинные транскрипты, возникающие при отсутствии терминирующих сайтов в конце редусомных генов, должны процессироваться до низкомолекулярных РНК, приступающих затем к маркированию, переупаковке хроматина и регуляции процессинга хромосомных транскриптов (в случае микроРНК) либо к количественным изменениям уровней экспрессии хромосомных генов (в случае фРНК). Внеплановые акты суперскоростной транскрипции, например при силь-

ных стрессах, могут ускорять наступление старения. С другой стороны, искусственное создание у взрослого организма возможности терминирования транскрипции на границе субакромерного гена было бы по своим последствиям для хрономер равносильно процессу иммортализации, ибо хрономеры при этом перестали бы укорачиваться. Итак, ритмически повторяющиеся акты скраптинга хрономер могли бы использоваться для того, чтобы в ЦНС работал жизненно важный для развития организма биохронометр. Обсудив процесс скраптинга, который инициируется Т-ритмами, теперь следует более подробно рассмотреть вопросы, имеющие отношение к указанным биологическим ритмам.

### **РАЗНОВИДНОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ РИТМОВ – Т-РИТМ И ЕГО РОЛЬ В ИЗМЕРЕНИИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ВРЕМЕНИ**

Время, как известно, — это форма последовательной смены явлений и состояний материи, характеризующая длительность их существования. Биологическое время — это длительность последовательно сменяющихся событий индивидуального развития, измеряемая и контролируемая у высших животных самим организмом на основе изменения генетического состава укорачивающихся хрономер. Совокупность хрономер составляет основу своеобразного биохронометра, локализованного в ЦНС и функционирующего на основе ритмически повторяющихся актов укорочения длины хрономер. Биологическое время течет не плавно, а ступенчато. Ход биологического времени независим от астрономического времени.

Можно ли было бы расплатиться за решение ключевой проблемы контроля над биологическим временем организма некоей разумной нуклеотидной ценой, т.е. не слишком большими потерями длины хрономер? Важно учесть, что цену можно уменьшить, увеличивая интервалы между актами скраптинга, повторяя их с определенной низкой частотой, например, раз в день или один раз во много дней. Для организации требуемых редких актов транскрипции, которая вела бы через скраптинг к укорочению хрономер, как предполагается, могли бы использоваться уже упомянутые Т-ритмы, вовлеченные в регуляцию индивидуального развития и его завершающей фазы — биологического старения. Длинные промежутки между максимумами Т-ритма соответствуют интервалам, когда биологическое время не течет, оно как бы заморожено. В термине «Т-ритм» буква «Т» отражает его участие в темпоральной функции, т.е. в контро-

ле за биологическим временем. Т-Ритмы — это инфрадианные гормональные биоритмы. К сложной системе биологических ритмов, как известно, относятся ультрадианные (период, т.е. расстояние между максимумами, меньше суток), циркадианные, или циркадные (околосуточные), инфрадианные (период в несколько дней или недель), сезонные, цирканнуальные (окологодовые) и другие ритмы. На роль Т-ритмов наиболее подходят именно инфрадианные биоритмы активности нейроэндокринной системы. Т-Ритм может базироваться на одном гормоне, но возможна и комбинация из нескольких гормонов. Инфрадианный Т-ритм оптимален особенно в постнатальный период развития высших животных, тогда как циркадианные Т-ритмы, возможно, более подходят на некоторых этапах эмбрионального развития, когда биологическое время должно течь особенно стремительно, поскольку события индивидуального развития в этот период сильно спрессованы во времени. Для животного, видовой срок жизни которого составляет всего пару месяцев, биологически выгоднее для хрономерной регуляции развития применить циркадианный Т-ритм, тогда как во взрослой жизни долгоживущего слона более выгоден инфрадианный Т-ритм. Так что для каждого вида соответствующие показатели Т-ритма могли бы значительно различаться.

На пике Т-ритма секретируемые гормоны оказывают свое стимулирующее действие на клетки-мишени, несущие хрономеры. Объект действия сигналов Т-ритмов — это мозг. Предполагается, что интенсивная стимуляция транскрипции в клетках-мишенях достигается не только и даже не столько за счет высокой концентрации гормонов, создаваемой в окружении клеток-мишеней, а за счет специфической частоты следующих друг за другом гормональных выбросов, или «бурстов». Максимум гормональной секреции Т-ритма организован так, что серия выбросов нейроэндокринными клетками их специфических факторов осуществляется с совершенно случайными и короткими по времени интервалами между отдельными бурстами. Частота следования этих всплесков несет важную информацию, смысл которой состоит в том, что лишь в ответ на нее нейроэндокринные клетки-мишени запускают суперскоростную транскрипцию своих хрономер и стрелка их биохрометра делает очередной шаг. Ценность такой селективности состоит в том, чтобы предотвратить напрасное укорочение хрономер при любом пике любого стимулирующего транскрипцию фактора. Уровень подобных факторов колеблется в организме, как известно, и с частотой коротких, ультрадианных ритмов, и с частотой сезонных биоритмов и т.п. В ответ на

воздействие специфической частоты Т-ритмических бурстов в клетках-мишенях генерируется также неслучайная частота осцилляций внутриклеточного кальция. В свою очередь эти кальциевые осцилляции относительно избирательно и резко усиливают интенсивность транскрипции некоторых генов в клетках-мишенях, обеспечивая осуществление суперскоростной транскрипции хрономер, необходимой для осуществления скраптинга. В качестве вовлеченных в Т-ритм гормонов особенно подходит гормон роста и/или инсулиноподобный фактор. Далее в этом разделе излагаются факты и соображения, свидетельствующие в пользу такого порядка событий.

Почему в качестве сигнала для клеток-мишеней не может быть использована просто наиболее высокая концентрация выбрасываемых гормонов? Этот путь трудно реализуем потому, что он требует от рецепторов детекции именно супрапороговой концентрации, запускающей гипертранскрипцию. Однако этому противостоит феномен десенситизации — удаление специфических рецепторов с поверхности клетки при избытке лиганда, что делает указанный способ тупиковым. Использование частоты гормональных бурстов лишено этой трудности потому, что очень короткие по продолжительности гормональные импульсы не ведут к дерецепторизации, а их частота может быть трансформирована в осцилляции вторичных мессенджеров клетки, по крайней мере на уровне кальциевых осцилляций.

Какие гормоны должны быть неизменными участниками Т-ритма? Гормон роста (GH) играет одну из ключевых ролей в энергетическом метаболизме, а инсулиноподобный фактор роста (IGF-I) является основным гормоном, вовлеченным в реализацию эффектов как гормона роста, так и белков (GHBP, IGF-BPs), связывающих эти два гормона [36]. На *C.elegans*, например, было показано, что мутации, ослабляющие сигналы системы инсулин/IGF-I, удваивают продолжительность жизни нематоды, причем изменения ее тканей, связанные со старением, оказалось возможным легко наблюдать микроскопией Номарского в прозрачных и неделящихся клетках животного [37]. У мутантов эти изменения развивались в замедленном темпе. Учитывая особую значимость в темпе старения организма именно энергетического обмена, можно полагать, что Т-ритмы, критически важные для выполнения актов скраптинга, непременно должны базироваться на ритмической гормональной активности оси GH/IGF-I. Эта ритмичность должна проявляться, например, у слона как в виде относительно редко повторяющихся (допустим, раз в месяц) пиков инфрадианного Т-ритма, так и в специфическом паттер-

не ритмических гормональных выбросов, быстро следующих друг за другом (допустим, в течение 10 мин) на каждом пике этого Т-ритма. На максимумах Т-ритмов, организуемых именно с участием оси GH/IGF-I и сопряженных с ней систем, как раз, вероятно, и совершаются критические для хрономер акты укорочения из-за скраптинга. В организацию Т-ритмов оси гипоталамус—гипофиз—надпочечники могут быть вовлечены и другие системы. Учитывая, например, важную роль, которую играет эпифиз в контроле биоритмов организма, можно полагать, что производимый им мелатонин также вовлечен в организацию Т-ритмов. Мелатонин синтезируется на основе ритмически осуществляемой транскрипции [38], способен влиять на экспрессию генов, регулирующих высвобождение кальция из клеточных депо [39], и является гормональным ритмоводителем, влияющим на ряд физиологических функций организма [40, 41]. Как упомянуто выше, в качестве сигнала для инициации критически высокого темпа транскрипции, ведущему к укорочению хрономер, целесообразно использовать частоту выбросов определенных гормонов. Это позволяет обойти проблему десенситизации клеток-мишеней. Кроме того, абсолютная концентрация гормона, разная у различных индивидуумов, ключевой роли при этом играть не будет, а от рецепторов не потребуется измерять концентрацию воздействующих лигандов. Как уже сказано, на соответствующую сигнальную частоту гормональных бурстов в клетках-мишенях могла бы, в частности, отзываться, их кальциевая система (и, возможно, другие вторичные мессенджеры). О кальциевой системе известно, что она способна к осцилляторным изменениям концентрации свободных ионов кальция, перераспределяющим их между цитоплазмой и различными кальциевыми депо. Имеются наблюдения, указывающие на то, что внутриклеточные кальциевые осцилляции способны модулировать процесс транскрипции ядерных генов. В норме инозитол-1,4,5-трисфосфат (InsP<sub>3</sub>) высвобождает кальций из внутриклеточных депо и в цитозоле возникают сложные волны и осцилляции свободного кальция. Показано, что индукция в цитоплазме этих осцилляций, вызванная с помощью аналога InsP<sub>3</sub>, способна усиливать специфическую транскрипцию генов в Т-лимфоцитах. Более того, оказалось, что генная экспрессия резко усиливается, если аналог InsP<sub>3</sub> вводили с 1-минутными интервалами, не реже и не чаще. Поддерживаемое плато концентрации InsP<sub>3</sub> также не давало указанного эффекта резкой стимуляции транскрипции [42]. Было обнаружено также, что осцилляции цитозольного кальция

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> позволяют снизить кальциевый порог при активации транскрипционных факторов, а это дает возможность клетке эффективно отвечать даже на низкие уровни стимулирующих агентов [43]. В дополнение к этому выяснилось, что весьма важна не периодичность вообще, а вполне определенная частота осцилляций. Быстрые осцилляции [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> стимулировали все три исследованных транскрипционных фактора: NF-AT, Oct/OAR и NF-κB, а редкие осцилляции — только NF-κB. Биологический смысл такого характера активации мог бы быть связан со способностью клетки откликаться своими кальциевыми осцилляциями именно на периодические выбросы гормонов и в соответствии с гормональными приказами ситуативно менять уровень экспрессии разных генов. Имеются различные примеры того, что осцилляции внутриклеточного кальция вовлечены в передачу сигналов от наружной мембраны клетки, активированной взаимодействием ее рецепторов с различными лигандами (в том числе и гормонами), внутрь клетки [44]. Синтез мРНК одной из субъединиц гонадотропина избирательно стимулировался *in vitro* в клетках гипофиза, когда их подвергали омыванию активатором кальциевых каналов каждые 15 мин, но не один раз в час [45]. Наблюдали, что высвобождение кальция из внутриклеточных депо, сопровождаемое определенными осцилляциями, было сопряжено с действием ядерного кальция на CREB-зависимую транскрипцию в нейронах [46]. На эффективность и специфичность активации генов в Т-лимфоцитах влияла амплитуда, продолжительность и форма кальциевых осцилляций, т.е. их кинетический паттерн [47]. Индукция в эпителиальных клетках низкочастотных осцилляций кальция вызывала активацию транскрипционного фактора NF-κB [48]. Доказано, что именно частота спайков цитозольного кальция (а не их амплитуда) отвечала за специфическое усиление транскрипционной активности фактора NF-κB в ядрах эндотелиальных клеток аорты [49].

Указанные кальциевые осцилляции сами по себе вряд ли способны к специфическому выбору тех генов, которые они стимулируют. Как же в таком случае достигается обнаруженная специфичность стимуляции в отношении определенных генов? Предлагаемое здесь решение этого загадочного вопроса сводится к тому, что кальциевые осцилляции в цитозоле опосредованно, через взаимодействие с перинуклеарными факторами, отражаются либо на концентрации свободного кальция во всей перинуклеарной цистерне, либо на доступности свободного кальция (и, возможно, других ионов, вытесняемых из связанного состояния) именно для самих ионных каналов пе-



ринуклеарной цистерны, откуда ионы топографически специфично поступают к строго определенным генам за счет функционирования ионной фонтанной системы ядра. Предполагается, что осцилляции кальция в перинуклеарной цистерне могли бы действовать одним из двух следующих способов или в комбинации. Во-первых, локальное повышение концентрации интрацистернального  $[Ca^{2+}]_i$  вблизи входа в ионный канал может повысить входящую порцию определенного вида ионов после того, как ворота канала на короткий срок будут фРНК-зависимо открыты со стороны кариоплазмы. Во-вторых, осцилляции интрацистернального кальция, возможно, могли бы влиять на конформационную активность самих белков ионных каналов. Возможно даже, что среди кальциевых ионных каналов внутренней ядерной мембраны имеется специализация на способность «преактивироваться» под воздействием определенных кальциевых осцилляций, происходящих внутри перинуклеарной цистерны. Под этим подразумевается, что во внутриядерной мембране существует серия субсемейств ионных каналов. Эти каналы откликаются, возможно, на двойную стимуляцию: 1) на определенную частоту кальциевой осцилляции с интрацистернальной стороны канала и 2) на одновременную активацию комплексом фион – фРНК, соединившимся с закрытыми воротами канала, расположенными с кариоплазматической стороны внутренней ядерной мембраны. Таким образом, в этом случае постулируется двойная активация ионного канала, открывающегося только при действии сразу двух ключей. Свободный кальций мог бы играть роль регуляторного ключа не только для кальциевых каналов, но и для других ионных каналов, участвуя, например, в качестве фактора, высвобождающего внутри цистерны из связанного состояния ионы другой природы, в частности цинковые ионы. Однако топографическая специфичность в отношении хромосомных генов, проявляющаяся в селективном воздействии разных ионных каналов внутренней ядерной мембраны на вполне определенные хромосомные регионы, во всех случаях достигается только за счет работы фонтанной ионной системы [8, 9].

Итак, предполагается, что определенная частотная характеристика гормональных бурсов, оперирующих в Т-ритмах, действуя через внутриклеточную кальциевую осцилляторную систему, создает предпосылки для организации необходимой суперинтенсивной транскрипции определенных генов в ядре. В контексте редусомного механизма измерения биологического времени интерес представляют те биологические ритмы, которые позволяют запускать акты скраптинга с наиболее оптимальной частотой,

т.е. с соблюдением баланса между экономией хрономерной ДНК и необходимым темпом течения биологического времени. Известно немало примеров инфрадианных биоритмов, продолжительность периода которых подобна той, что была бы оптимальна для соответствующих Т-ритмов. У человека и животных обнаружены разные ритмы с длинным периодом. У недоношенных детей циркасеπτантный (около недельный) и циркасемисептанный (полунедельный) ритмы артериального давления проявляются даже раньше, чем циркадный (околосуточный) ритм. Утверждают, что недельный ритм задается моментом рождения и не является результатом влияния социального недельного цикла [50]. Циркасеπτанный ритм типичен для электрокардиограммы человека [51]. Исследования периодичности роста здоровых детей и грызунов также установили явную инфрадианность соответствующих ритмов. Измерения увеличения длины голени указали на резкие спурты роста каждые 30–55 дней; эти спурты являются следствием наложения более короткопериодичных мини-спуртов, следующих друг за другом с разными более короткими периодами, среди которых преобладают интервалы в 7–9 дней [52]. Аналогичные измерения роста голени у крыс также позволили установить нелинейность приростов ее длины. У грызунов мини-спурты следовали друг за другом с интервалами ~4–5 дней; у самок периоды ритма оказались немного короче, чем у самцов [53]. Ритм изменения темпа роста в длиннорыбных рыбах (кижуча) имеет период ~14–15 дней [54]. У собак породы серая колли обнаружен циклический гематопоез с периодом ~14 дней, устойчиво поддерживаемый, несмотря на такие провоцирующие вмешательства, как кровопускание, гипертрансфузия и гипоксия [55]. Циклический эритропоез с периодичностью в 16–19 дней работает у некоторых линий мышей, он устранялся спленэктомией [56, 57]. Циклические колебания разнородных факторов (осцилляции гематопоеза, изменения концентрации ферритина, температуры тела), повторявшиеся с регулярными интервалами в 7–8 дней, констатированы у одного из пациентов гематологической клиники [58]. У другого больного синхронная циклическая нейтропения и тромбоцитопения повторялась каждые 6 недель [59]. Анализ случаев спонтанного пневмоторакса у мужчин выявил 14-дневный ритм, причем максимальное число случаев группируется около новолуния [60]. Такой же, с периодом в половину лунного месяца, оказалась в чешской популяции периодичность актов агрессивного поведения, с минимумом при полнолунии. Двухнедельной была и периодичность случаев внезапной кардиоваску-

лярной гибели [61]. Максимум острых инфарктов миокарда приходится среди китайских пациентов на первый день лунного месяца, а минимум — спустя 2 недели [62]. Вероятно, некий эндогенный ритм, как и околосуточный ритм, синхронизируется в этих случаях с внешним воздействием, но если циркадный ритм коррелирует с суточной освещенностью, то эндогенный лунный ритм координирует свою частоту, возможно, с гравитационным полем Луны. Ее влияние зафиксировано даже для пчел, масса которых и содержание стероидов колеблется в соответствии с синодическим лунным ритмом (период в 29,5 дня), отмечены также его циркасеπτанные и циркадисеπτанные (двухнедельные) гармоники для уровня некоторых липидов и углеводов в гемолимфе этих животных [63]. У многих обитающих на суше млекопитающих продолжительность их беременности кратна ~30, что близко к длине лунного месяца [64]. Длительность менструального цикла женщины близка к длине лунного месяца и почти треть всех менструаций приходится на новолуние [65]. Для здоровых нормальных людей констатируется существование эндогенного лунного ритма в отношении увеличения количества принимаемой пищи и уменьшения принятия алкоголя (оба пика приходятся на полнолуние) [66].

У взрослого человека Т-ритм, возможно, имеет продолжительность периода примерно в один месяц (лунный ритм) либо около двух недель (циркасемилунарный ритм) и действует, разумеется, у обоих полов. Т-Ритм, подобно другим инфрадианным биоритмам, является, вероятно, результатом интерференции разных жизненно важных для организма гормональных и других биологических ритмов. В эту сложную систему ритмических взаимодействий, вероятно, вовлечены не только обычные циркулирующие в крови гормоны, но и локально действующие в ЦНС нейромедиаторы и нейропептиды. Специфичность и селективность сигналов Т-ритма, вызывающих периодически повторяющуюся сверхскоростную транскрипцию хрономер в нейрональных мишенях, достигаются, по-видимому, при соблюдении двух основных условий. Во-первых, это специфическая частота действия лигандов на клетки-мишени, т.е. на нейроэндокринные и нейротрофические клетки мозга, обладающие хрономерами. Во-вторых, это неслучайность взаиморасположения в ЦНС клеток-мишеней и клеток-генераторов сигналов Т-ритма (Т-сигналов). В сложной системе многодневных взаимодействий, завершающихся коротким эпизодом генерации Т-сигналов, могли бы по очереди и в разных комбинациях участвовать разные центры головного мозга, периферических эндокрин-

ных желез и других систем организма. Более того, даже сами клетки-мишени на определенных этапах инфрадианного ритма, несомненно, тоже участвуют в подготовке того эпизода выброса Т-сигналов на пике Т-ритма, которые будут нацелены в конечном счете на них самих, чтобы запустить в мишенях процесс скраптинга.

Чем длиннее периоды Т-ритма, тем меньше требуемый размер той фракции генома, которая должна быть отведена в хромосомной ДНК на долю протохрономер. Но нельзя ли еще как-то сэкономить в этом отношении, в особенности за счет конструкции самих хрономер? Подобная возможность рассматривается в следующем разделе.

### **МОЖНО ЛИ СЭКОНОМИТЬ ДЛИНУ ДНК, ТРЕБУЮЩУЮСЯ ДЛЯ ХРОНОМЕР, ЗА СЧЕТ ОСОБЕННОСТЕЙ ХРОНОМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ?**

Размер редусомных генов сравнительно невелик, поскольку низкомолекулярная фРНК вряд ли должна быть больше 50 нуклеотидов, а микроРНК, маркирующая геном для его перепакетовки или участвующая в других формах регуляции генетической активности, может быть еще меньше. Без учета вклада генов величина одного плеча хромеры человека могла бы составлять ~7 т.п.н. Эта оценка исходит из следующего. Пусть один акт скраптинга ведет к укорочению акромерной ДНК хромеры на 6 нуклеотидов и пусть скраптинг повторяется у взрослого человека один раз в месяц. За 100 лет, т.е. за срок, примерно соответствующий видовой продолжительности жизни человека, будет израсходовано 7,2 т.п.н. ( $6 \cdot 12 \cdot 100$ ). Если второе плечо хромеры транскрибируется независимо от первого и имеет такую же длину, то общая длина хромеры (без учета ее коротких генов) удваивается. Вклад, например, десятка генов (допустим, по 50 п.н.) лишь немного увеличивает плечо хромеры и общая длина равноплечей хромеры не превысила бы 15 т.п.н. Однако и эту величину есть возможность вдвое уменьшить, сделав хромеру асимметричной. Если промотор транскрипции поставить относительно близко к одной из ее акромер, но ход транскрипции направить только в противоположную сторону, то критически высокое торзионное напряжение можно создавать вблизи 5'-конца единственной транскрибируемой цепи, т.е. так сказать в «5'-акромере». Скраптинг будет идти только в ней. Противоположная, т.е. 3'-концевая акромера, не транскрибируется, а возможное торзионное напряжение в районе промотора, расположен-

ном рядом с ней, может легко устраняться топоизомеразами, на что они неспособны в условиях суперскоростной транскрипции вблизи абсолютного 5'-конца транскрибируемой цепи.

В итоге, асимметричная хрономера должна быть практически одноплечей. Этот наиболее эффективный вариант хрономеры с учетом приведенного выше расклада потребовал бы все тех же 7,2 т.п.н. на всю хрономеру. Длина асимметричной хрономеры, таким образом, оказывается примерно такой же, как и двуплечей принтомеры, которой предположительно располагает человеческий фибробласт и которая у молодых клеток по приведенной выше оценке могла бы иметь ~12–15 т.п.н.

### ПОЧЕМУ ИЗМЕРИТЕЛИ ВРЕМЕНИ – ХРОНОМЕРЫ – ДОЛЖНЫ РАСПОЛАГАТЬСЯ В КЛЕТКАХ ЦНС?

Центральная нервная система координирует функционирование всего организма животного. Поэтому контроль за биологическим временем, столь важный для индивидуального развития организма (контроль за продолжительностью последовательных событий развития, включая и контроль за продолжительностью состояния зрелости, за периодом наступления старения и продолжительностью этого процесса как части индивидуального развития), наиболее рационально осуществлять именно с участием клеток этой ключевой командной системы животного организма. Совокупность разных фактов свидетельствует о том, что именно головной мозг есть инициальный субстрат старения, а в клетках мозга этим субстратом является его ДНК. Доказано, что избирательное облучение головного мозга животных вызывает их ускоренное старение в отсутствие радиационной болезни [67–70]. Облучение целых личинок дрозофил укорачивает продолжительность жизни имаго [71]. Особенностью метаморфоза мух является то обстоятельство, что единственными неделяющимися клетками, сохраняющими метку радиосенсibilизатора 5-бром-2'-дезоксисуридина (BrdU) в неизменном виде с личиночной стадии до взрослого состояния, являются у них лишь клетки нервных ганглиев. Введенный на стадии личинки BrdU нарушает фоточувствительность имаго. Учитывая, что BrdU способен при облучении личинок вызвать отсроченное во времени ускоренное радиационное старение взрослого организма, и принимая во внимание, что этот эффект может быть объяснен только сохранением указанной метки в ДНК ЦНС, Акифьев и Потапенко заключили, что инициальным субстратом старения имаго является именно ДНК нервных ганглиев. Они высказали также предполо-

жение, что только какая-то минорная, не кодирующая белки, фракция хромосомной ДНК мозга ответственна за старение [71].

Возрастзависимые изменения в эпифизе, являющемся частью ЦНС, вносят значительный вклад в старение всего организма [72]. На основании эндокринологических исследований и клинических наблюдений Дильман с соавторами давно сделали вывод о том, что головной мозг животных является первичным субстратом старения, и, более того, указали, какой именно его отдел вносит, по их мнению, ключевой вклад в старение, – это гипоталамо-гипофизарный комплекс [73]. Еще существенней, что в этих работах впервые был предложен конкретный физиологический механизм участия гипоталамуса в старении. Дильман предположил, что решающими являются возрастзависимые изменения именно в энергетическом обмене организма. Они вызываются постепенным повышением порога чувствительности гипоталамо-гипофизарного комплекса к обычным тормозящим сигналам, поступающим от периферических эндокринных органов. Это вынуждает комплекс все более напряженно работать и постепенно выводит из строя его гомеостатические системы, инициируя в итоге ряд основных возрастных патологий [73]. Что же касается самой первопричины упомянутого сдвига порога чувствительности гипоталамуса, то тогда она осталась неизвестной. Однако теперь ее можно объяснить укорочением хрономер в клетках ЦНС и, как следствие, изменением хрономерозависимого уровня экспрессии рецепторов и других факторов в нейроэндокринных клетках головного мозга, что и ведет в дальнейшем к формированию соответствующих патологий.

Исследования на разных видах позвоночных и беспозвоночных не только согласно свидетельствуют, что мозг – это ведущий орган в старении организма. Они с разных сторон указывают на особо важную роль в старении именно энергетического метаболизма ЦНС. Мутации карликовых мышей линий Snell и Ames вызывают недоразвитие гипофиза [74], секретирующего, в частности, гормон роста, который сопряжен в своей работе с энергетическим обменом. Как оказалось, мыши с дефицитом гормона роста живут значительно дольше обычных мышей [75]. Исследования мутаций в нервной системе червей также принесли свои плоды. Мутации генов, кодирующих белки в инсулиновом сигнальном пути, который функционирует в нейронах, влияют на продолжительность жизни взрослого животного [76]. Наиболее демонстративными оказались те изменения в работе нейроэндокринной системы нематоды *C.elegans*,

которые вызываются мутациями в генах *daf-2* и *age-1* инсулинового сигнального пути, вовлеченного в регуляцию энергетического обмена [77]. Эти мутации значительно увеличивают продолжительность жизни червей [78, 79]. Особо примечательны в этом контексте выводы Волкова с соавторами [80]. Работая с генами *daf-2* и *age-1*, кодирующими у *C.elegans* соответственно гомологи инсулинового рецептора и фосфатидилинозитол-3-киназы, исследователи использовали промоторы, специфичные для определенных типов клеток. Они заставили экспрессироваться гены *daf-2* или *age-1* дикого типа в червях-мутантах, живущих особенно долго как раз благодаря мутациям по генам *daf-2* и *age-1*. Экспрессия *daf-2* либо *age-1* дикого типа в мышцах или клетках кишечника мутантов никак не меняла срок их жизни. Но вот когда экспрессия тех же генов *daf-2* или *age-1* дикого типа (т.е. нормальных генов) была осуществлена в нейронах, длительность жизни мутантных червей резко сократилась. Эта экспрессия возвращает продолжительность жизни нематод к дикому типу, т.е. сокращает срок их жизни до «дикой» нормы. Эти опыты прямо и однозначно указывают на ключевую роль нервной системы и ее энергетического обмена в продолжительности жизни животных [80]. Наблюдаемый эффект вряд ли можно объяснить неблагоприятным изменением в образовании свободных радикалов, поскольку их продукция в норме у дикого типа должна быть максимально уравновешена действием защитных антиоксидантных систем [76]. Каков конкретный механизм благотворного влияния мутантных нейронов на продолжительность жизни *C.elegans*, т.е. почему изменение их энергетического обмена радикально сказывается на замедлении темпа старения, — этот вопрос все еще остается открытым [76].

В рамках редусомной гипотезы представляется оправданным принять существование зависимости регуляции процесса скраптинга от особенностей регуляции энергетического обмена. Можно допустить, что урежение частоты пиков Т-ритма и/или снижение темпа транскрипции ДНК в редусоме могло бы быть сопряжено либо просто со снижением уровня энергетического обмена, либо с изменением путей его регуляции. Кстати, калорийно ограниченная диета — важнейший из уже известных способов наиболее эффективного увеличения продолжительности жизни грызунов. Показано, что такая диета повышает у грызунов и приматов чувствительность клеток к инсулину и глюкозную толерантность. Это еще раз подчеркивает важность модуляции энергетического обмена как геропротекторного вмешательства [81]. В связи с обсуждаемой ролью нервной

системы и ее энергетического обмена в старении важно отметить, что калорийно ограниченная диета вызывает повышение продукции нейротрофического фактора BDNF, а также фактора роста нервов и других веществ, способных повышать жизнеспособность нейронов [82–84]. Одним из путей координации мозгом энергетического статуса организма и потребностей в пище, а также, по-видимому, и способом координации работы разных биоритмов, включая и Т-ритм, могло бы быть использование циркулирующих факторов, таких как лептин, который, например, вырабатывается на периферии, но вовлечен через систему обратных связей в регуляцию активности нейрональных клеток гипоталамуса [85].

Итак, оценивая значение перечисленных данных с позиций редусомной гипотезы, можно предположить, что при умеренном голодании снижается, в частности, интенсивность транскрипции хрономер и/или частота тактов Т-ритма (и значит, частота актов скраптинга в клетках мозга). Это в свою очередь благоприятствует экономии длины хрономер и тем самым увеличивает продолжительность жизни организма. В этом контексте можно, кстати, пересмотреть роль энергетического обмена в старении следующим образом. При избыточном потреблении калорий именно ускоренное истощение хрономер (из-за форсирования актов скраптинга), а вовсе не усиление выработки активных форм кислорода, или ROS, является иницилирующим фактором старения. Однако в дальнейшем, уже на фоне патологий, возникающих только вследствие чрезмерного укорочения редусомной ДНК, вредоносное действие ROS постепенно начинает сказываться, а затем все больше возрастать, способствуя углублению патологических повреждений тканей и органов.

### **ВОЗМОЖЕН ЛИ СКРАПТИНГ НЕ ТОЛЬКО ДЛЯ ХРОНОМЕР, НО И ДЛЯ ПРИНТОМЕР? ОТ ЧЕГО СТАРЕЮТ *in vitro* НЕДЕЛЯЮЩИЕСЯ КЛЕТКИ?**

Уместен вопрос, не укорачиваются ли принтомеры из-за скраптинга *in vivo* точно так же, как и хрономеры? Ведь все происходит в едином организме, омываемом нейроэндокринной продукцией. В целом на поставленный вопрос более уместен, однако, негативный ответ, и вот почему. Т-Ритм, создаваемый в организме только ради осуществления скраптинга хрономер, — это серия Т-сигналов (периодические сравнительно высокочастотные всплески уровней секретируемых гормонов и/или нейромедиаторов и нейропептидов), рассчитанных на получение сигнала в пределах ЦНС, причем топографически неслучайны-

ми нейроэндокринными клетками-мишенями. К тому времени, как гормональные секреты Т-сигналов разойдутся по телу, острые перепады концентраций секретлируемых факторов сгладятся и вряд ли принудят прынтомеры к дополнительному укорочению. Если сигналы поступают к мишеням в виде короткоживущих химических факторов, то их распространение по организму вообще несущественно. Тем более это исключено, если финальный Т-сигнал инфрадианного Т-ритма, завершающий череду многодневных гормональных событий, вообще является ни чем иным как вспышкой нервных импульсов, строго нацеленных на определенный нейронный ансамбль, несущий соответствующие хрономеры.

Однако из предположения, что скраптинг вряд ли требует *in vivo* существенных жертв со стороны прынтомер, особенно в молодом организме, вовсе не следует, что это же верно и для ситуации *in vitro*. В стрессирующих условиях, каковыми являются условия клеточной культуры [86], клетки могут заставить свои прынтомеры усиленно работать. Испытывая дискомфорт, клетки по системе обратных связей, несомненно, должны посылать запрос на повышение концентрации молекул фРНК, чтобы повысить продуктивность своих структурных генов. Такие запросы могут в конце-концов чрезмерно интенсифицировать транскрипцию прынтомер, что чревато скраптингом. Особенно опасен в этом отношении сильный и длительный стресс, который вне всяких Т-ритмов мог бы принуждать клетки ко все более интенсивной транскрипции некоторых групп их генов. Скраптинг прынтомер в неделящихся клетках, например, в покоящихся *in vitro* старых фибробластах или в кардиоцитах работающего сердца, мог бы, укорачивая их прынтомеры, вести клетки ко все большей потере функциональных возможностей. Вслед за растратой последних оставшихся редусомных генов у клеток остаются два пути — умереть или трансформироваться. Некоторые выбирают последнее.

### **НУКЛЕАЗНОЕ УКРОЧЕНИЕ ДНК В РЕДУСОМАХ КАК ПРИЧИНА ПРОГЕРИЧЕСКОГО СИНДРОМА ВЕРНЕРА**

В связи с проблемами клеточного старения следует упомянуть наиболее подробно исследованный синдром прогерии, или ускоренного старения, — синдром Вернера. При этом страдании, по до сих пор не до конца раскрытой причине, например, исследованные *in vitro* фибробласты ускоренно стареют, выполняя меньше делений *in vitro* до момента исчерпания своего лимита Хейфлика по сравнению с клетками здоро-

вого донора того же возраста. Синдром Вернера — редкая аутосомная рецессивная болезнь. Известно, что за проявление этого синдрома ответственны мутации в единственном гене, кодирующем геликазу/экзонуклеазу (WRN). Было показано, что минимальный экзонуклеазный домен белка WRN обладает двумя видами нуклеазной активности. Это 3'-5'-экзонуклеазная активность, атакующая однонитевую ДНК, и эндонуклеазная активность, действующая на 5'-конец выступающей цепи ДНК на границе однонитевой и двунитевой ДНК, а также в пределах однонитевой ДНК [87]. В применении к прынтомерам эта опасная способность белка WRN означает, что его экзонуклеазная и эндонуклеазная активности могут быть направлены на укорочение концов прынтомерной ДНК, когда они становятся доступными для этого белка. По-видимому, такое случается в моменты репликации акромерных районов прынтомер. В это время акромеры высвобождаются из хромосомного гнезда и оказываются уязвимыми для нуклеазной активности WRN. Поэтому при синдроме Вернера прынтомеры могут укорачиваться как за счет концевой недорепликации ДНК, так и вследствие их внепланового нуклеазного обрезания. Благодаря своей способности ускоренно укорачивать прынтомеры WRN ускоряет также и наступление клеточного старения.

В отношении хрономер белок WRN не менее опасен, но свое вредоносное действие он, возможно, осуществляет преимущественно на том этапе, пока нейрональные клетки еще делятся и реплицируют свою ДНК. В присутствии WRN реплицирующиеся хрономеры должны были бы ускоренно укорачиваться по той же причине, что и прынтомеры. В результате длительность предстоящей жизни хозяина этих хрономер существенно сокращается и признаки старения проявляются аномально рано. В принципе нельзя исключить и еще один вариант. Возможно, что белок WRN может атаковать акромеры хрономер в ходе их процессинга, протекающего непосредственно после каждого акта скраптинга хрономерных акромер. В этом случае редусомы будут ускоренно съезживаться даже в клетках взрослого мозга, давно переставших делиться.

### **АКРОМЕРЫ И ИММОРТАЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК ТЕЛОМЕРАЗЫ. ТЕЛОМЕРЫ — ЛИШЬ СВИДЕТЕЛЬ, А НЕ УЧАСТНИК ИММОРТАЛИЗАЦИИ КЛЕТОК**

В зависимости от последовательности нуклеотидов в акромере теломеразы может либо узанать и удлинить ее и тем самым иммортализо-

вать клетку, либо вовсе не распознать акромеру. Можно предположить, что при иммортализации делящихся человеческих клеток теломеразой [88–90] как раз имело место ни что иное, как удлинение акромер, происходившее одновременно с наращиванием теломер. Вследствие этого принтомерные фРНК-гены и гены микроРНК оказались защищенными от укорочения и утраты. Хотя теломеры также удлинялись, это было удлинение свидетеля иммортализации, а вовсе не активного участника поддержания молодого состояния клеток.

Теломеразой можно было бы защищать также акромеры в хрономерах взрослого организма. В развивающемся организме это привело бы к остановке развития, преждевременно прекратив отсчет биологического времени в ЦНС. Возможно, именно поэтому у ряда видов теломеразная активность в мозгу отсутствует. Например, у мыши и человека. Особенно важно подчеркнуть, что она отсутствует в мозгу даже у трансгенных мышей, полученных с использованием вектора, кодирующего каталитическую субъединицу мышинной теломеразы mTERT под сильным промотором [91]. Причина последнего обстоятельства в настоящее время неизвестна. Возможно, это связано с гибелью тех эмбрионов, в нейронах которых теломераза все-таки удлиняла хрономеры и тем самым искажала темпоральную составляющую развития. В таком случае могли выживать только те трансгенные мыши, в мозгу которых из-за мутации или по иной причине теломеразная активность была надежно устранена. У тех видов животных, которые подобно радужной форели в норме в мозгу имеют теломеразу (но при этом все-таки стареют), хрономеры, по всей видимости, не распознаются и не удлиняются этим ферментом. Кстати, в целях геропротекторной терапии было бы целесообразно использовать соответствующий вектор, который можно активировать только после завершения основных этапов развития, т.е. в уже зрелом мозге. Если же в клетках мозга данного вида животных хрономерные акромеры не распознаются теломеразой, то при теломеразной геротерапии вместо обычной теломеразной РНК следует использовать введение такого вектора, который кодирует акромероспецифичную РНК (для краткости, «акромеразную» РНК). Эта акромеразная РНК могла бы компенсировать неспособность теломеразы млекопитающих распознавать не- $T_2AG_3$ -повторы в соответствующих акромерах. Теломераза будет вынуждена удлинять любые заданные акромеры в присутствии акромеразной РНК, имеющей в своем составе именно ту последовательность, которая позволяет ей комплементарно взаимодействовать

с акромерами в редусомах данного вида животного и которая, кроме того, распознается теломеразой. Благодаря использованию акромеразной РНК в качестве кофактора теломеразы играла бы в этом случае роль своеобразной «акромеразы», наращивающей и защищающей акромеры в любых соответствующих редусомах.

Кстати, еще одним геропротекторным средством могло бы стать применение нейротропных векторов, непосредственно кодирующих нужные фРНК и микроРНК и восполняющих для клеток мозга способность контроля геномом даже при чрезмерно укороченных хрономерах. Еще одна геропротекторная альтернатива — это принудительный ресинтез хрономер в нейроэндокринных клетках зрелого организма.

Делящиеся клетки, например фибробласты человека, иммортализуясь под действием теломеразы, перестают считать митозы вовсе не потому, что сломан теломерный счетчик митозов, а потому, что отключены принтомерные митотические часы. Однако совершенно иначе обстоит дело с мышинными клетками. Чтобы проверить, нельзя ли иммортализовать теломеразой клетки мышей, а заодно и весь их организм, в мышинные ооциты был введен упомянутый выше вектор, кодирующий каталитическую субъединицу мышинной теломеразы mTERT [91]. В мозгу при этом не удалось обнаружить теломеразной активности, так что вторая цель отпала, но трансгенные эмбриональные фибробласты содержали высокую теломеразную активность и их теломеры оказались значительно длиннее нормы. Тем не менее (и это самое интересное!) лимит удвоения этих фибробластов не изменился. Это означает, что субъединица mTERT не способна иммортализовать мышинные эмбриональные фибробласты [91], хотя аналогичная субъединица человеческого происхождения hTERT успешно иммортализуется человеческие клетки [88, 89]. Указанный результат, очевидно, объясняется тем, что теломераза не находит в принтомерных акромерах фибробластов грызуна той последовательности, т.е.  $T_2AG_3$ , с которой теломераза работает в теломерах мыши и человека, а также в принтомерах человеческого фибробласта.

### РОЛЬ ПРИНТОМЕР В ДВУХ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ БАРЬЕРАХ

Известно, что нормальные человеческие соматические клетки в ходе своего старения должны преодолеть два пролиферативных барьера, перейдя которые, они утрачивают нормальность и могут иммортализоваться и малигнизироваться. Первый из этих барьеров обозначают терми-

ном «senescence» (ввиду отсутствия в русском термине для этой разновидности старения можно использовать его кальку — «сенесность»). Сенесность — такая степень одряхления стареющей клетки, которая несовместима с дальнейшими делениями, хотя «сенесная» клетка может долгими месяцами сохранять *in vitro* жизнеспособность [22]. Второй барьер — это так называемый «кризис», или период массовой гибели клеток. Трансформация вирусными онкогенами увеличивает длительность пролиферативной жизни клеток за пределы первого барьера, т.е. позволяет преодолеть репликативный арест, типичную для состояния сенесности остановку пролиферативного роста культуры клеток. Тем не менее, даже трансформированные делящиеся клетки все-таки становятся жертвой кризиса. Однако, как показали Каунтер с соавторами, эктопическая экспрессия каталитической теломеразной субъединицы, своевременно осуществленная (после достижения клетками сенесности, но еще до наступления в них фазы кризиса), позволяет «постсенесным» клеткам, трансформированным к тому же еще вирусными онкогенами, не только дойти до второго барьера, но и преодолеть его, успешно делясь даже тогда, когда в контроле во всю идет массовая клеточная гибель [92]. Предлагаемое здесь объяснение этих во многом еще не полностью интерпретированных в литературе событий состоит в следующем. Для нормального течения клеточного цикла необходимы определенный уровень и нужные соотношения многочисленных факторов клеточного цикла. Уровни экспрессии хромосомных генов, кодирующих эти факторы, находятся под строгим регуляторным контролем со стороны внутриядерных ионных фонтанов, управляемых молекулами фРНК, которые транскрибируются с принтомерных фРНК-генов. Кроме того, экспрессия хромосомных генов зависит и от микроРНК, транскрибируемых с принтомерных генов. Как именно клетка «узнает», что она исчерпала свой лимит удвоений? Ответ на этот вопрос — предмет текущих дебатов в литературе. Может ли ответ заключаться лишь в том, что когда в принтосомах общее количество фРНК-генов падает ниже критического порога, то деления прекращаются просто из-за вызванного этим снижения концентрации необходимых факторов клеточного цикла. Такой ответ, по-видимому, был бы ошибочным, так как он не учитывает роль качественного разнообразия разных принтомерных генов. Здесь уместно предположить, что в некоторых из принтосом клетки (вовсе не обязательно, чтобы во всех типах принтосом) содержатся особые гены, ответственные за нелимитированное продолжение клетками их удвоений. Назовем эти

гипотетические гены «нонстоп»-генами. Универсальной особенностью нонстоп-генов могла быть их способность направлять синтез таких продуктов (нетранслируемых РНК или же белков), которые тормозят синтез белковых ингибиторов клеточного цикла. Пока нонстоп-гены не потеряны редусомами клетки, она может делиться. Как только эти гены утрачены, в клетке начинают накапливаться ингибиторы и она входит в состояние сенесности.

Напротив, клетки, трансформированные вирусными онкогенами, имеют в своем распоряжении вирусные онкобелки, компенсирующая активность которых позволяет клеткам производить удвоения даже в присутствии ингибиторов клеточного цикла. Поэтому трансформированные клетки могут продолжать деления от момента возникновения состояния сенесности, в котором останавливаются нетрансформированные контрольные клетки, до наступления состояния кризиса. Однако принтомеры из-за концевой недо-репликации ДНК продолжают укорачиваться даже в трансформированных делящихся клетках на всем пути между сенесностью и кризисом. И вот, когда все принтомерные гены утрачиваются или их остается пренебрежимо мало, вирусные онкобелки уже не могут спасти положение. Осуществляя компенсирующую регуляцию, вирусные белки не могут восполнить в нормальных клетках изменение нормального уровня многих их жизненно важных клеточных белков. Необратимое изменение уровня этих нормальных компонентов вызвано продолжающимся убыванием из принтосом делящихся клеток их разных генов. Именно поэтому даже среди клеток, имеющих вирусные белки, в конце концов все-таки начинается тотальная гибель, т.е. кризис.

Если же сенесные трансформированные клетки снабдить помимо вирусных онкобелков еще и теломеразой, то принтомеры, своевременно защищенные ею, больше уже не будут терять свои гены. Поэтому трансформированные вирусными онкогенами клетки могут беспрепятственно продолжать свои деления, не замечая второго пролиферативного барьера, о который спотыкаются и уходят в небытие их нормальные клеточные собратья.

#### **КАК ИМЕННО ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О РЕДУСОМАХ МОЖЕТ ПОМОЧЬ УСТРАНЕНИЮ ОСНОВНЫХ ТЕКУЩИХ ТРУДНОСТЕЙ БИОЛОГИИ СТАРЕНИЯ?**

В начале этого раздела суммируются основные представления редусомной модели, а затем рассматриваются ее возможности в отношении

некоторых нерешенных проблем биологии старения. Согласно предлагаемому подходу, после достижения организмом физиологической зрелости редусомы продолжают терять свои гены, что и приводит к старению. Потеря генов принтомерами делящихся клеток менее существенна для организма, чем чрезмерное укорочение хрономер головного мозга. Причина состоит в том, что многие делящиеся *in vivo* клетки просто не успевают исчерпать за жизнь организма запас своих редусомных генов. Постепенное старение делящихся *in vitro* клеток, а также остановка их пролиферации после выполнения определенного числа удвоений (лимит Хейфлика для популяций нормальных клеток) вызваны постепенным укорочением их принтомер из-за концевой недорепликации ДНК. Клетки, прекратившие из-за этого свою пролиферативную деятельность, все еще сохраняют небольшой запас принтомерных генов и потому их можно принудить к дополнительной серии удвоений, после которой клетки, наконец, полностью лишаются принтосом и наступает феномен, именуемый в цитогеронтологии кризисом. Как сказано выше, при кризисе клетки, полностью лишившись поддержки со стороны принтомерных генов, гибнут в массовом порядке. Некоторые из них трансформируются, что в отдельных случаях может быть связано как с экспрессией теломеры, так и с ресинтезом принтомер, прежних или новых, а также с аномальным использованием для производства молекул фРНК и микроРНК таких генов, которые принадлежат протопринтомерам (т.е. являются хромосомными матрицами), в норме для такой транскрипции никогда не используемым.

Во всех случаях старение в норме связано с уменьшением дозы генов в редусомах. Концевая недорепликация ДНК происходит синхронно в редусомах и теломерах удваивающихся клеток. Укорочение теломер в делящихся клетках как *in vitro*, так и *in vivo* является не причиной клеточного старения, а свидетелем этого процесса. Редусомы делящихся клеток могут генерировать «сигнал старения». Однако этот сигнал состоит вовсе не в появлении неких белков старения, кодируемых мифическими генами старения. Редусомный сигнал старения — это просто снижение (ниже уровня зрелой нормы) концентрации редусомных РНК, а вслед за ними, в частности, и фРНК-зависимого уровня ионного снабжения хромосомных генов. Вследствие этого продуктивность хромосомных генов искажается по сравнению с состоянием, типичным для молодых клеток, а количественные признаки клеток меняются. Поэтому старение, по сути дела, является ничем иным, как «болезнью количест-

венных признаков» клеток, да и организма в целом.

Однако crucialным для старения организма высшего животного является все-таки укорочение именно хрономер, а не принтомер, длина которых спроектирована в эволюции с некоторым запасом на внеплановые деления, необходимые для регенераций и т.п. Хрономерная ДНК несет в себе ту темпоральную программу развития, которая функционирует за счет исчезновения разных по специфичности генов хроносом. Помимо некодирующих генов в некоторых хрономерах могли бы встречаться, возможно, и копии отдельных молчащих в хромосоме белок-кодирующих генов, участвующих в переключении с одной стадии развития на другую. Кстати, в субтеломерных регионах хромосомной ДНК, где преимущественно могут быть локализованы редусомы, в хромосомах встречаются структурные гены. Утрата хрономерой соответствующего гена (и потеря некоего ингибитора) могла бы служить сигналом, дающим старт следующему шагу в развитии.

Хрономеры расположены в клетках различных центров ЦНС. Поэтому исчезновение очередной партии хрономерных генов в определенном нейронном ансамбле должно вести к соответствующей перемене соотношения активностей хромосомных генов в определенных группах тканей и органов, находящихся под контролем нейроэндокринной и нейротрофической систем организма. Вероятно, именно это во многих случаях служит для систем организма сигналом к выполнению очередного этапа развития — полового созревания и достижения состояния зрелости другими системами организма. Достигнутое состояние зрелости некоторое время поддерживается, а затем из-за продолжающейся утраты редусомных генов постепенно и гетерохронно сменяется старением различных систем организма. Генный состав хрономер и длина их акромерной ДНК на стадии уже достигнутой зрелости — не только программа продолжительности поддержания этого зрелого состояния, но еще и программа старения организма, сформированная в эволюции. Следует заметить, что некоторые биодемографы [93, 94] отрицают саму возможность существования программы старения, не видя способов ее материального воплощения.

Принципиальной особенностью предлагаемой программы старения, работающей на основе взаимодействия Т-ритма и хрономерной ДНК, является то, что сам материальный носитель программы динамически меняется во времени. В предлагаемой программе старения отсутствуют какие-либо специальные гены старения. Действующие в ней гены постоянно использу-



ются для максимально возможной эффективности поддержания жизнеспособности клеток, и фактором старения является просто изменение численности этих генов. Многообразие эффектов, которые хрономеры оказывают на организм, зависит от нескольких факторов. Для хрономер характерна множественность разных по специфичности генов. Разнообразие в воздействии различных хрономер на организм зависит также от того, в какой именно группе нейроэндокринных или нейротрофических клеток локализуется в ЦНС данная хромера. Управляя своими нейрональными клетками, хрономеры с помощью продуктов этих клеток направляют активность подчиненных им периферических клеток тела. Все это вместе взятое объясняет, почему укорочение хрономер в ходе старения могло бы вести к увяданию (пусть и не одновременно) практически всех систем, органов и тканей многоклеточного организма. Поэтому многочисленность признаков, контролируемых хрономерами в ходе развития организма, позже оборачивается многочисленными признаками его старения.

В контексте развиваемых представлений о редусомах уместен вопрос, почему клетки зародышевой линии способны поддерживать себя в бесчисленной череде поколений, если и эти клетки прибегают, например, к услугам фРНК ради модуляции фонтанной системы активности их генов. Ответ на этот вопрос заключается не только и даже не столько в потенциальной возможности теломеразы защищать акромеры в таких клетках, но и в том, что в ходе гаметогенеза в каждом очередном половом поколении необходимые редусомы могут создаваться заново. Поэтому герминативная линия клеток не накапливает старческих повреждений, чего она не могла бы достичь одной лишь внутриорганизменной селекцией наиболее полноценных клеток. Если же герминативным клеткам вообще не надо интерпретировать позиционную информацию, то им не требуются и принтомеры, а следовательно, им не может грозить старение, сопряженное с убылью принтомерных генов.

В литературе накопился ряд проблем, которые трудно объяснить, оставаясь на позициях теломерной модели старения, принесшей определенный прогресс в молекулярную биологию старения, но, по-видимому, уже исчерпавшей свои возможности. Нерешенные вопросы и противоречия биogerонтологии суммированы во многих работах [95–98, 23, 99–101]. Ниже основные из них перечисляются вместе с теми ответами, которые можно дать, исходя из редусомной концепции.

Некоторые из биogerонтологических проблем осложнены (или вообще порождены) тем,

что исследуемые *in vitro* процессы старения клеток несут явные черты стохастичности. Это отражается в особенностях поведения и изменения свойств делящихся клеток, т.е. таких клеток, многие проблемы которых могли бы быть сопряжены с той или иной формой исчезновения их принтосомных генов.

Хотя укорочение принтомер осуществляется в клетке независимо от числа их копий в принтосоме, для клеточной активности безразлично, сколькими копиями принтомер располагает клетка. Ведь, например, количество фРНК-генов, управляющих ионными фонтанами, тем выше, чем выше копияемость принтомер в принтосоме. В определенных пределах, чем выше число этих генов, тем более эффективно функционируют клеточные системы, зависящие от ионных фонтанов ядра. Поэтому на свойства клетки влияют любые факторы, способные изменить копияемость принтомер в принтосоме. К их числу относятся структурные особенности хромосомных гнезд. Каждое гнездо всегда специфично только для определенной принтомерной последовательности. Однако аффинность гнезда в отношении своей принтосомы и физическая вместимость гнезда в отношении числа принтомер в принтосоме могут быть далеко не идентичными у гомологичных гнезд, принадлежащих аутосомам каждого из родителей. При каждом клеточном удвоении процесс репликации принтомер и распределения их по гнездам повторяется. Возникновение при этом различий по числу принтомер в хромосомных гнездах разных клеток, причем даже сестринских клеток, с неизбежностью должно вести к возникновению клеток как с повышенной, так и с пониженной способностью выживания в неблагоприятных условиях культивирования *in vitro*. Случайная потеря принтосомы нормальной клеткой должна вести к немедленной потере ею пролиферативной активности и приобретению признаков фенотипа старения. Важно отметить также, что в норме вовсе не всем типам клеток нужны принтомеры. Например, они не требуются стволовым клеткам, но необходимы их потомкам, определяющим свою позицию в морфогенезе. Принимая все это во внимание, можно по-новому оценить соответствующие белые пятна цитogerонтологии, которые, по-видимому, могут перестать быть таковыми.

Так, например, стволовые клетки практически не проявляют признаков лимита клеточных удвоений, делая в обновляющихся тканях в течение жизни не менее тысячи делений [95], что в литературе иногда рассматривают как вызов идее о существовании клеточного счетчика митозов. Истинная же причина такого поведения

стволовых клеток заключается в том, что лимит клеточных удвоений обусловлен в норме только обладанием принтомерами, а их-то как раз у стволовых клеток и не должно быть, ведь вовсе не сами стволовые клетки, а лишь их дифференцирующиеся потомки должны интерпретировать свою позиционную информацию в морфогенезе. Если в клональной предыстории каких-либо типов стволовых клеток принтомеры действительно необходимы для чтения позиционной информации, то эти принтомеры могут применяться только в строго фиксированном числе удвоений, после чего клон задолго до критического исчерпания принтомер должен возвратиться в «беспринтомерный» режим. Этим предотвращалось бы старение клона и обеспечивалось стволовое бессмертие. Своеобразным примером стволовых клеток является по сути дела и упомянутая выше бессмертная линия зародышевых клеток, передающая наследственность в бесконечном ряду поколений.

Некоторые авторы, отмечая отдельные несоответствия между моделью теломерных митотических часов и картиной старения клеток в культуре, вообще приходят к выводу, можно полагать, совершенно ошибочно, что *in vitro* клетки стареют просто из-за тотального повреждения в некомфортной среде обитания. Шоком для клеток является уже само их пребывание в культуре [86, 95, 97]. Последствия так называемого «культурального шока» [86], вероятно, наиболее опасны именно для редусом. Культуральный шок мог бы инициировать несколько разных неблагоприятных последствий, весьма существенных для принтосом. Во-первых, стресс в культуре мог бы потребовать от принтомер их усиленной транскрипции и, как следствие, индуцировать акты скраптинга принтомер, никак не связанные с обсуждавшимися выше Т-ритмами. Следствием этого стало бы скраптинга-зависимое укорочение принтомер как в делящихся, так и (что важно подчеркнуть) даже в неделящихся клетках. Во-вторых, могла бы происходить просто утрата отдельных принтомер из принтосом. В-третьих, шок (как и стрессы иного происхождения, причем, возможно, даже *in vivo*) мог бы провоцировать выпадение целой принтосомы из ее хромосомного гнезда с последующим ее разрушением. У более старых делящихся клеток, у которых их редусомы уже и без того значительно уменьшены, спонтанные акты выпадения этих перихромосомных органелл из их хромосомных гнезд случаются, вероятно, с большей частотой.

Затруднения в интерпретации в литературе вызывает также следующее обстоятельство. В условиях культивирования по Хейфлику, т.е. при

высокой клеточной плотности, за одно популяционное удвоение в среднем клетка делает одно деление. Однако почему-то уже с самого первого дня культивирования при низкой клеточной плотности темп размножения мышинных эмбриональных фибробластов отчетливо снижается [102]. Предлагаемый ответ состоит в том, что замедление роста при старении клеток в культуре есть результат суммирования двух процессов — укорочения принтомер во всех клетках и потерь принтосом некоторыми из них, что чаще происходит, по-видимому, в неоптимальных для клеток условиях культивирования, в частности при их низкой плотности.

Еще одна вариация на ту же тему — это удивительно широкое распределение пролиферативного потенциала в любой культивируемой популяции нормальных клеток человека и лабораторных животных, причем некоторые клетки стареют уже в ходе первых митозов и частота появления старых клеток увеличивается по мере возрастания числа выполненных ими митозов [95]. Эффект следует объяснить неодинаковой длиной принтомерной ДНК в разных клетках из-за различий их пролиферативной предыстории. Показано, что количество фибробластов и глиальных клеток человека, прекративших деление, увеличивается с линейно возрастающей скоростью с каждым популяционным удвоением с момента эксплантации [103–105]. Указанный феномен объясняется тем, что по мере укорочения принтомерной ДНК в принтосомах делящихся клеток общий размер самих этих редусом убывает по сравнению с размером их хромосомных гнезд. Это в свою очередь уменьшает площадь контакта органеллы с гнездом и, следовательно, прочность ее удержания в гнезде. Процесс идет, по-видимому, как процесс с положительной обратной связью, поскольку чем меньше становятся редусомы, тем легче они выпадают из своих гнезд. В итоге, частота потерь клетками своих редусом растет, а без редусом жизнеспособность клеток резко падает.

В соответствии со сказанным выше гетерогенность аффинностей принтосом по отношению к их гнездам могла бы быть привлечена также для разъяснения феномена гетерогенности старения клеток [96]. Изучение множества индивидуальных клеточных клонов выявило высокую интерклональную гетерогенность в размерах колоний и в продолжительности жизни клонов, в особенности, когда заявляют о себе первые признаки репликативного старения [103, 106]. Причина подмеченной гетерогенности кроется в следующем. Одно из гомологичных хромосомных гнезд может вести себя подобно доминирующему аллелю, связывая принтомеры

более эффективно, чем рецессивное гнездо. Если на обеих аутосомах расположены доминирующие гнезда, то такая клетка имеет шанс стать родоначальницей наиболее долгоживущего клона. Именно в силу полиморфности трехмерной структуры их хромосомных гнезд некоторые из клеточных клонов могли бы иметь особо удачные конфигурации гнезда. Такие гнезда способны особенно надежно и прочно удерживать на себе редусомы, причем даже тогда, когда те уже сильно уменьшились в размерах. Именно такие клоны должны составлять основную часть клеточной популяции при ее приближении к лимиту Хейфлика. Это согласуется с данными о том, что популяционный лимит Хейфлика применим именно к наиболее длительно выживающему клону [107]. Исследованиями Хейфлика и других авторов показано, что индивидуальные клоны клеток стареют в разном темпе. Удваиваясь все медленнее, клоны за половину времени своего существования выполняют в среднем около 8 клеточных удвоений [80, 88]. Самые же долго размножающиеся клоны отвечают за создание финальной популяции с ее максимальным лимитом Хейфлика, например в 50 удвоений [95, 103]. В рамках предлагаемой концепции можно утверждать, что материальная основа лимита Хейфлика, оцениваемого на уровне индивидуальной клетки, — это как раз длина ДНК в ее редусомах. Весьма интересной является возможность асимметричного распределения реплицирующихся принтомер между сестринскими клетками. Как уже сказано, число возникающих при репликации принтомер и особенности ждущих их гнезд могут варьировать. Поэтому даже сестринские клетки, т.е. две дочери одной только что разделившейся клетки, получив и удержав в своих гомологичных (но не идентичных) гнездах неодинаковое число принтомер, могут приобрести неодинаковый цитофизиологический статус и неидентичную способность к дальнейшим удвоениям. Установившаяся структура гнезда, очевидно, поддерживается эпигенетически на протяжении ряда клеточных поколений и потому две клональные популяции, возникшие от двух сестринских клеток, могут обладать неодинаковым репликативным потенциалом. Исходя из этого, можно объяснить бимодальность распределения потенциала удвоений среди индивидуальных клеток [108].

Еще одна текущая неопределенность в литературе — это то, почему длина теломер не коррелирует очень строго с видовой продолжительностью жизни. У диких мышей средняя длина теломер лишь незначительно больше, чем у человека [109]. У лабораторных мышей она еще больше, чем у дикарей, и однако видовой про-

должительность жизни любой мыши в десятки раз меньше средней видовой продолжительности жизни человека. Предлагаемое объяснение основано на предположении, что хрономеры мышей короче, чем у человека, и/или что они стремительнее укорачиваются (например, ввиду более коротких периодов Т-ритма). Что касается принтомер, то у мышей они, безусловно, должны быть короче, чем у человека, если исходить из идеи, что счетчиком клеточных удвоений являются именно принтомерные митотические часы. В рамках редусомной гипотезы только так можно истолковать хорошо известный факт, что лимит Хейфлика для нормальных мышечных фибробластов ниже, чем лимит человеческих фибробластов [91]. Корреляция между видовой продолжительностью жизни организма и лимитом Хейфлика для его клеток *in vitro* действительно нестрогая и имеет значительные отклонения от прямой пропорциональности [110]. Предлагаемое объяснение состоит в том, что, хотя и лимит Хейфлика, и видовой продолжительность жизни закодированы в ДНК редусом, для естественного отбора нет оснований заботиться о синхронности исчерпания резервов хрономер и принтомер. «Горлышком бутылки», лимитирующим величину видовой продолжительности жизни, являются хрономеры, а не принтомеры, длина которых создается с запасом ради обслуживания возможных регенерационных событий. В этом собственно и заключается причина упомянутой нестрогости в корреляции названных показателей.

Длина принтомер в делящихся клетках, таких, например, как фибробласт, зависит не только от числа пройденных удвоений, но и от условий, в которых они выполнялись. Например, к укорочению редусомной ДНК из-за обычной концевой недорепликации ДНК могли бы добавляться другие факторы, в частности, укорочение за счет окислительных повреждений ДНК, подобное обнаруженному для теломерной ДНК [111]. Нельзя исключить и возможность нуклеазного укорочения акромер в случае недостаточно эффективного их кэпирования в хромосомном гнезде. Снижению эффективности работы клеток при старении организма способствует даже само ухудшение омывающей их среды, которая, несомненно, ухудшается по мере того, как все больше укорачиваются хрономеры в ЦНС и соответственно гормональное и нейротрофическое снабжение всех мишеней все дальше отходит от оптимума, достигнутого в молодости. Постепенный отход при старении от достигнутого в молодости физиологического оптимума Дильман называл «законом отклонения гомеостаза» [112]. Отмечаемая в качестве не-

решенной проблема внутритканевой неравномерности старения также могла бы быть истолкована как следствие локального дефицита нейротрофических факторов. Причина — в неравномерном распределении нервных окончаний в ткани-мишени. Это обстоятельство, мало существенное в молодости, становится критически важным на фоне растущей нехватки в стареющем организме нейротрофических факторов. Именно так можно объяснить, например, результаты измерения длительности клеточных циклов в работающем всю жизнь кишечном тракте. Проведенное на мышах исследование вскрыло резкое нарастание *in vivo* гетерогенности в отношении продолжительности индивидуальных клеточных циклов у различных групп клеток по мере старения кишечного тракта [113]. Можно предполагать, что чем короче становятся в ЦНС хрономеры, тем менее эффективным оказывается и зависящее от них нейротрофическое снабжение периферии. Топографически неоптимально сформированная в развитии местная иннервация определенного тканевого сегмента, не слишком существенная для самочувствия в молодости, может стать важным фактором патологии на фоне углубляющегося дефицита хрономерозависимых факторов.

И принтомеры, и теломеры при репликациях вынуждены укорачиваться одновременно и в среднем на одинаковую величину. Имеются данные, категорически не совместимые с теломерным подходом, но получающие свое естественное объяснение на основании идеи принтомерных митотических часов. Принтомерный счетчик более адекватен для объяснения ряда фактов, чем теломерный, именно потому, что принтомеры в отличие от теломер содержат теряемые регуляторные гены. В этом отношении особенно демонстративна работа группы Демпинхо [91], проведенная с мышинными фибробластами. Мышинные эмбриональные фибробласты, содержавшие высокую теломеразную активность в результате трансгенного введения мышинной mTERT, имели теломеры даже более длинные, чем в контроле. Однако лимит удвоенных клеток от этого отнюдь не возрос, т.е. мышинные фибробласты не были immortalizованы мышинной теломеразой. Этот результат, удивительный с позиции теломерной модели старения, объясняется тем, что мышинные принтомеры в отличие от принтомер человеческих фибробластов, очевидно, не имеют распознаваемых теломеразой повторов  $T_2AG_3$ , обладая какими-то другими G-богатыми повторяющимися последовательностями. Причина различной тактики в отношении принтомер у человека и мыши объясняется тем, что в подавляющем большин-

стве клеток у человека теломераза отключена или ее уровень ничтожно низок. Поэтому клетки человека на концах своих принтомер, т.е. в акромерах, могут иметь последовательность  $T_2AG_3$ , весьма эффективную в защите концов ДНК, что доказано ее широчайшим распространением в теломерах высших животных. Напротив, у мышей теломераза активна во многих типах клеток (хотя и не в первичных культурах фибробластов) [114]. В эволюции мышинных акромер, по-видимому, проще было во всех или во многих типах клеток отказаться от услуг  $T_2AG_3$ , ибо присутствие этих распознаваемых теломеразой повторов вело бы в ее присутствии к immortalизации соматических клеток. Мыши, кстати, должны были чем-то расплатиться за отказ от этой весьма эффективной защитной последовательности и за использование для принтомерных акромер какой-то другой, менее эффективной, не- $T_2AG_3$ -последовательности. Можно предположить, что «мышинная плата» за все это заключается в более частой у них потере принтомер из хромосомных гнезд и/или в менее эффективном копировании акромер, чреватом более частым разрушением отдельных принтомер в принтосоме. В целом это снижает гомеостатические возможности мышинных клеток и повышает вероятность возникновения рака. Если некоторые типы клеток человека почему-либо вынуждены не использовать повтор  $T_2AG_3$  в акромерах их принтомер, то таким клеткам также могла бы грозить повышенная вероятность канцерогенеза, ибо чрезмерная утрата редусомных генов должна вносить дисбаланс в работу многих клеточных систем. Ведущее к immortalизации тканей взаимоотношение теломер и теломеразы, не может быть одобрено в эволюции и вот почему. Смена поколений различных видов высших животных в подавляющем большинстве случаев даже в дикой природе обеспечивается старением. Хотя до смерти от старости животные в дикой природе, как известно, обычно не доживают, но возрастное ослабление скорости, силы, слуха, зрения и т.п. оказывается достаточным, чтобы стареющий хищник, как и стареющая жертва хищника или паразита, безнадежно проигрывали бы в борьбе за жизнь. Гибель стареющих организмов автоматически ведет к смене поколений, а смена поколений эволюционно выгодна видам, обеспечивая поддержание статуса quo в их экологических нишах, и в этом смысле ранний Вейсман был несомненно прав, указывая на соответствующую эволюционную роль процесса индивидуального старения.

Еще одна проблема, часто обсуждаемая в связи с теломерами, — это экспоненциальное увеличение частоты рака с возрастом при старе-

нии организма. Довольно распространена точка зрения, что старение является защитой от рака [115]. Известна и противоположная точка зрения, разделяемая рядом авторов [95, 116, 117]. Справедлива, по-видимому, однако вторая из них. Многие случаи рака есть следствие старения – в том смысле, что сопровождающее старение уменьшение редусом ослабляет функциональные способности клеток; само же старение никак от рака не защищает. На фоне растущего дисбаланса уровней внутриклеточных факторов, который инициируется систематическими потерями генетического резерва редусом, должна, по-видимому, снижаться эффективность репаративных и других систем клеток. Это с неизбежностью ведет к хотя и очень медленному, но неуклонному накоплению мутаций в клеточных популяциях. Возрастание нестабильности генома в ходе редусомозависимого клеточного старения, как здесь предполагается, служит ведущей причиной возрастзависимого увеличения частоты злокачественных перерождений. Клеточное старение, как можно здесь предположить, вовсе не является способом защиты организма от рака, а именно защитой через замедление клеточных делений, апоптоз и т.п., как это нередко предполагается в литературе. Наоборот, клеточное старение само является, по всей видимости, основным фактором, провоцирующим (даже в отсутствие приходящих извне канцерогенов) возникновение и развитие опухолей. Эффект экспоненциального увеличения частоты рака с возрастом нередко объясняют накоплением результатов эндогенного процесса – оксидативного повреждения клеток [95]. Основание для такого утверждения иногда видят в том, что и темп старения, и частота возникновения рака снижаются при калорийно ограниченном питании. Представление о редусомах позволяет, однако, расставить акценты иначе. Укорочение прынтомер и случайные утраты принтосом из хромосомных гнезд, учащающиеся, вероятно, при уменьшении размера принтосом в стареющих клетках, снижают шаг за шагом гомеостатические способности делящихся клеток, что в стареющем организме на фоне укорочения хрономер в ЦНС усугубляется ухудшением снабжения тканей гормонами и нейротрофическими факторами. В итоге этих первичных редусомозависимых изменений в делящихся клетках возникают патологические отклонения в метаболизме и регуляциях. Следствием такого дисбаланса может оказаться (причем, уже как нечто вторичное) аномально высокое производство активных форм кислорода, ведущих себя как паразитарный фактор, способствующий вторичным внутриклеточным нарушениям. Если это утверждение справедливо, то

редусомная концепция могла бы бросить вызов свободнорадикальной гипотезе старения, претендующей на объяснение первичного движущего фактора старения. Для патологии, зависящей от вредного действия активных форм кислорода, может быть оставлена теперь лишь вторичная роль в старении, а идея о свободнорадикальном повреждении как инициальном механизме старения может быть отвергнута. Между прочим, уместно заметить, что медицинская статистика уже засвидетельствовала полную неэффективность антиоксидантов в профилактике старения человека, живущего в относительно комфортных условиях современной цивилизации [93, 118]. Чувствительность тканей к оксидативному повреждению ДНК и/или сама оксидативная опасность, действительно, могут стать угрозой для сердца, мозга и скелетных мышц [119] при старении, но первопричину этого надо искать в возрастзависимом изменении уровня нейротрофического и нейроэндокринного снабжения тканей, а также в нарушении экспрессии структурных генов, находящихся под контролем собственных редусом тканей-мишеней. Продукция редусом оптимизирует работу генома и, кроме того, защищает его целостность. Далеко зашедшая потеря редусомных генов ведет не только к невозможности снижению жизнеспособности клеток и возможностей их гомеостаза. Нарастающий при старении дефицит редусомных фРНК и ионного снабжения хромосомных генов провоцирует, кроме того, рост нестабильности хромосом из-за снижения точности в работе ферментативных систем ядра, нуждающихся в строго определенном ионном окружении. В значительной мере следствием именно этого фактора может быть нарастание частоты возникновения раков при старении.

Замедление процессов старения в старших возрастах, отражающееся в снижении темпа смертности, считается одной из наиболее интригующих находок в демографических исследованиях продолжительности жизни [120]. Замедление темпов смертности в старших возрастах отмечено и для насекомых [121]. Причиной этого феномена могло бы оказаться снижение темпа транскрипции хрономер и, следовательно, более экономное расходование их остатков у глубокого старика.

### **РЕДУСОМА КАК ПРИЧИНА СТРОГО ОПРЕДЕЛЕННОЙ СЦЕПЛЕННОСТИ ГЕНОВ В ХРОМОСОМАХ**

Почему гены сцеплены неслучайным образом в каждой индивидуальной хромосоме? Причина явления до сих пор в значительной мере

остается загадочной, хотя давно известно, что затруднение межвидовой гибридизации способствует репродуктивной изоляции видов, которая, впрочем, достижима и иными путями, — особенностями поведения, анатомии и т.п. До сих пор неясно, чем диктуются размер хромосом и их число в кариотипе — только ли случайностью? В связи с обсуждаемой ролью фонтанной системы, контролируемой редусомами, можно, по-видимому, с новых позиций оценить смысл закономерной сцепленности генов. Основная причина сохранения сцепленности генов заключается, вероятно, в необходимости поддержания структурными хромосомными генами и их фионами строго определенных внутривидовых дистанций между ними и редусомами. Редусомы, лежащие в своих хромосомных гнездах, локализуются, по-видимому, преимущественно в субтеломерных регионах хромосом, хотя эволюционно более молодые редусомы могли бы встречаться и в парацентромерных регионах.

Именно субтеломерно расположенные редусомы, как предполагается, обслуживают своими фРНК наибольшую часть длины своей хромосомы. Не все хромосомы обязаны нести на себе редусомы при всякой цитодифференцировке. Однако те хромосомы, что имеют соответствующие редусомы, топографически специфично снабжаются ионами в основном благодаря тем молекулам фРНК, которые транскрибируются с их собственных редусом. Единственно при цитодифференцировке в субтеломерном регионе определенной хромосомы обычно работает, вероятно, только одна редусома, а в следующей дифференцировке уже другая редусома может быть организована на базе смежной последовательности того же субтеломерного региона хромосомы либо вообще в другой хромосоме. Однако всегда важно, чтобы дистанция между редусомой и ее хромосомными мишенями обеспечивала поддержание оптимальной концентрации транскрибируемых с редусомы специфических фРНК вблизи адекватных фионов, поскольку это необходимо для ионного обслуживания хромосомных генов. Для полноценной работы генома весьма важно не только оптимальное расстояние от каждого гена до контролирующей его редусомы, но и поддержание оптимального соотношения всех этих расстояний в каждом плече хромосомы. Хотя определенные фРНК могли бы обслуживать и некоторые гены на прочих хромосомах, однако именно физическая сцепленность редусомы и всех ее мишеней в единой хромосоме создает предпосылки для наиболее оптимального обслуживания фРНК-зависимыми ионными фонтанами каждого из генов определенной хромосомы. Чем дальше ген

расположен от субтеломерного региона с его редусомой, тем ниже концентрация молекул фРНК, достигающих этого гена и его фионов. Поэтому при прочих равных условиях более отдаленный от теломеры структурный ген должен иметь больше фионов, т.е. больше центров связывания молекул фРНК, для того, чтобы оставаться в равных условиях с генами, которые в хромосоме локализованы ближе него к редусоме, лежащей в субтеломерном регионе. Указанное обстоятельство имеет значение как для молекул фРНК, так и микроРНК, имеющих собственные мишени в ядре.

В хромосомах, как известно, хроматин организован в так называемые «хромомеры» и «межхромомерные регионы» [122, 123]. Хромомеры — это сегменты хромосом, способные к локальной и динамичной компактизации, которая характерна, как считается, для каждого этапа онтогенеза [124]. Паттерн хромомеров и межхромомерных районов используется для цитогенетической идентификации хромосом. Смысл существования генов в хромомерах — этих бусинах хромосомного ожерелья — все еще остается не вполне ясным. Только ли дело в том, что в хромомерах гены проще инактивировать путем компактизации? В чем смысл межхромомерных спейсеров? Как впервые заметил цитогенетик Лима-де-Фариа, размеры хромомеров имеют явно выраженную тенденцию к увеличению в направлении центромеры (так называемый «градиент хромомерных размеров»). Кстати, это говорит в пользу преимущественно субтеломерного, а не парацентромерного расположения большинства редусом. Более того, оказалось, что сами гены и их хромомеры сохраняют у родственных биологических видов свое взаиморасположение как относительно друг друга, так и по отношению к теломерам и центромерам. Поразительно, но эта закономерность выполняется, несмотря даже на варибельность длин соответствующих хромосомных плеч [125–129]. В связи с упомянутыми фактами можно предположить, что для эффективной работы клеток важен не только определенный уровень экспрессии различных генов, но и количественное соотношение продуктивности разных генов, регулируемых фРНК-зависимыми ионными фонтанами. В связи с этим у родственных таксонов, очевидно, должны поддерживаться типичные для видов одного рода соотношения хромосомных дистанций между определенными генами хромосомы и соответствующей редусомой, лежащей в субтеломерном регионе той же хромосомы.

Согласно теории хромосомного поля Лима-де-Фариа и фактам, ее подтверждающим, каждый сегмент ДНК имеет наиболее оптимальную

территорию, расположенную между центромерой и теломерой, имея тенденцию занять ту же территорию вслед за любой эволюционной хромосомной реорганизацией [128]. Более половины всех ретровирусных онкогенов расположено вблизи теломер. Все онкогены чуждаются самых коротких и самых длинных плечей в хромосомах [126, 127], по-видимому, избегая этим избытка и недостатка молекул фРНК вблизи своих фионов. Вероятно, все это связано с тем, что указанные ключевые гены клеточного цикла находят в эволюции наиболее оптимальные хромосомные дистанции по отношению к разным редусомам. Итак, хотя редусомы могут посылать сигналы для своей хромосомы из любого ее конца, наблюдения Лима-де-Фариа [125] относительно увеличения размеров хромомеров в направлении к центромере можно интерпретировать так, что субтеломерный регион предоставляет определенные преимущества редусомам, как в регуляторном отношении, так и в эволюционном.

Итак, хромомеры, вероятно, тем крупнее, чем большее число фионов, а также мишеней для микроРНК, они содержат. Чем дальше от редусомы, тем большее число фионов должен иметь в своей свите структурный ген, чтобы его фионы выловили нужные им молекулы редусомной РНК. Поэтому расположенные вдали от редусомы структурные гены должны располагаться в особо крупных хромомерах. Присутствие расположенных на хромосомах в специальных гнездах особых ядерных органелл — редусом — ставит топографию структурных генов, нуждающихся в фРНК-зависимом ионном сервисе, в зависимость от топографического расположения соответствующих редусом. Это как раз и является первопричиной строго определенной сцепленности генов в хромосомах. В этом состоит суть предлагаемого ответа на одну из наиболее старых загадок генетики — мистику неслучайной сцепленности генов.

### **ИМЕЮТСЯ ЛИ КАКИЕ-ЛИБО ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВИДЕТЕЛЬСТВА, КОТОРЫЕ, ПУСТЬ КОСВЕННО, МОГЛИ БЫ УКАЗЫВАТЬ НА ВОЗМОЖНОСТЬ СУЩЕСТВОВАНИЯ РЕДУСОМ?**

Уругвайские цитогенетики при анализе результатов Т-бэндинга на месте удаленной фракции хроматина обнаружили в хромосомах необычные крошечные полости. Внутрихромосомные полости найдены в парацентромерных, т.е. по обеим сторонам центромеры, и в субтеломерных регионах некоторых хромосом [130, 131]. Полости были полностью свободны от хромати-

на и в гомологичных хромосомах располагались в идентичных местах. Не только позиция, но даже их форма строго соблюдалась у гомологичных хромосом. Как ранее было отмечено при обсуждении роли принтомер в дифференцировке, эти неслучайные крошечные полости могли бы соответствовать бывшим хромосомным гнездам, из которых выпали их принтомеры при цитогенетической обработке [24]. В ходе хромосомной эволюции за счет известных процессов слияния концов хромосом и их разрывов вполне могли бы осуществляться перераспределения хромосомных оригиналов, кодирующих редусомы. Именно поэтому редусомы должны тяготеть к субтеломерным и парацентромерным регионам хромосом. Исследования эксцизионной репарации, сопряженной с транскрипцией, свидетельствуют о том, что этот процесс распределен в геноме довольно необычно. В то время как обычные сайты репарации ДНК в норме равномерно рассеяны по геному, кластеры сайтов указанного вида репарации идентифицированы среди рано реплицирующихся богатых генами бэндов и (что наиболее существенно в обсуждаемом контексте) в теломерных регионах ряда хромосом. В качестве преимущественной локализации сайтов эксцизионной репарации, сопряженной с транскрипцией, были отмечены Т-бэнды, причем соответствующие сайты оказались GC-богатыми [132]. Как отмечено выше, G-богатые сайты наиболее подходят для организации межгуаниновых мостиков между редусомами и их хромосомным гнездами, а также для использования в акромерах и межгенных акромероподобных спейсерах. Поэтому свойства G-богатых сайтов в Т-бэндах могут быть адекватны как кандидаты для редусом и их гнезд. Эти сайты репарации, сопряженной с транскрипцией, оказались расположенными там, где должны преимущественно присутствовать редусомы. Возможно, это можно было бы рассматривать как указание на протекание там сверхскоростной транскрипции редусомных генов. Надежность работы редусомных генов будет наивысшей только в том случае, если транскрипция сопряжена именно с защищающей их целостность соответствующей системой репарации ДНК. Вот почему эти примеры можно рассматривать как, по крайней мере, не противоречащие тому, что следует предполагать с позиций редусомной гипотезы.

Итак, что такое биологическое старение? На этот вопрос дают разные ответы [133–135]. «Старение есть болезнь количественных признаков» — такая формулировка предложена в работе [136]. Можно добавить — болезнь универсальная и хроническая. Чрезмерная убыль генов

в редусомах при старении ведет к дисбалансу в уровнях продуктивности различных структурных генов, поскольку в клетках меняется паттерн работы редусомозависимых факторов, в том числе характер работы ионных фонтанов, обслуживающих хромосомные гены. Количественные показатели клеток при этом меняются в неблагоприятную сторону. Качественные изменения на уровне клеток и организма при старении — это также следствие убыли или полной потери регуляторных редусомных генов. Старение можно считать универсальной и, главное, плановой, эволюционно запрограммированной редусомной болезнью. Старение — это одна сторона редусомной медали. Другая ее сторона — это обеспечение индивидуального развития организмов жизненно важным процессом — контролем за ходом биологического времени. В целом учет роли редусом позволяет снять целый ряд текущих противоречий в биологии старения. Среди них — дебаты о том, есть ли вообще программа старения [93]. Программа старения организма, несомненно, не только существует, но является еще и частью более широкой видовой стратегии, нацеленной на охрану видовой генофонда [137]. Один из двух компонентов программы старения — это редусомная ДНК мозга. Поработав в программе формирования организма, редусомная ДНК, продолжая динамически убывать, отмеряет своей длиной величину остающейся части жизни индивидуума. Она это делает совместно со вторым компонентом программы старения. Второй компонент — это Т-ритм, контролирующей темп укорочения хрономера; параметры Т-ритма зависят от эндокринной и других систем всего организма. Учитывая, что время бытия организма в пути, так сказать, между стартом и финишем, в индивидуальном развитии определяется длиной хрономера ( $L$ ) и зависящей от параметров Т-ритма скоростью их укорочения ( $V$ ), можно полагать, что все три программы — программа течения биологического времени, программа продолжитель-

ности жизни животного и программа продолжительности его старения — в принципе описываются выражением  $T = k \cdot L/V$ , в котором представлены соответствующие длины хрономера и темп их исчерпания, определяемый колебаниями Т-ритма. Стрессы и другие факторы, влияющие на ход Т-ритмов и на темп исчерпания хрономера, а тем самым и на величину коэффициента  $k$ , делают продолжительность жизни особой величиной вариабельной, хотя и в не слишком больших пределах.

Итак, старение организма, как и развертывание событий его развития во времени, идет на основе единого универсального механизма — укорочения хрономера. Усечение концов ДНК в редусомах мозга — итог плановых актов молекулярного вандализма со стороны транскрипционной машины и ее сообщника — особой формы биологического ритма — используется для того, чтобы в центральной нервной системе организма тикал биохронометр его жизни. Если определенный вид организмов не использует биохронометр в развитии (как например, вегетативно размножаемый картофель), он не подвержен старению. Все высшие виды животных ведут свое развитие с учетом хода биологического времени и потому не могут не стареть после достижения состояния зрелости, если продолжают измерять время. Инициальным субстратом старения высших животных являются редусомы. Неустранимость наступающего со 100%-ной вероятностью естественного старения обусловлена тем, что лежащее в его основе укорочение редусом является частью механизма развития и самой жизни организма. Только искупительная компенсация редусомных потерь, осуществляемая различными путями после созревания организма, может предложить надежную альтернативу этому сценарию.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 01-04-49168).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mochizuki, K., Fine, N.A., Fujisawa, T., and Gorovsky, M.A. (2002) *Cell*, **110**, 689–699.
2. Dernburg, A.F., and Karpen, G.H. (2002) *Cell*, **111**, 159–162.
3. Zamore, P.D. (2002) *Science*, **296**, 1265–1269.
4. Meyer, E., and Garnier, O. (2002) *Adv. Genet.*, **46**, 305–337.
5. Hall, L.L., Byron, M., Sakai, K., Carrel, L., Willard, H.F., and Lawrence, J.B. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8677–8882.
6. Taverna, S., Coyne, R., and Allis, C. (2002) *Cell*, **110**, 701–711.
7. Аравин А.А., Вагин В.В., Наумова Н.М., Розовский Я.М., Кленов М.С., Гвоздев В.А. (2002) *Онтогенез*, **33**, 349–360.
8. Оловников А.М. (2001) *Мол. биол.*, **35**, 163–176.
9. Olovnikov, A.M. (1997) *Int. J. Dev. Biol.*, **41**, 923–931.
10. Belousov, L.V. (1998) *The Dynamic Architecture of a Developing Organism. An Interdisciplinary Approach to the Development of Organisms*, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht.
11. Goodwin, B. (1994) *How the Leopard Changes its Spots*, Weidenfeld and Nicolson, London.
12. Gilbert, S.F., Opitz, J.M., and Raff, R.A. (1996) *Devel. Biol.*, **173**, 357–372.



13. Wolpert, L. (1996) *Trends Genet.*, **12**, 359–364.
14. Оловников А.М. (1996) *Биохимия*, **61**, 1948–1970.
15. Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961) *Exp. Cell Res.*, **25**, 585–621.
16. Hayflick, L. (1965) *Exp. Cell Res.*, **37**, 614–636.
17. Хейфлик Л. (1997) *Биохимия*, **62**, 1380–1393.
18. Soukupova, M., Holecckova, E., and Hnevkovsky, P. (1970) in *Aging in Cell and Tissue Culture* (Holecckova, E., and Cristofalo, V.J., eds), Plenum Press, N.Y., pp. 41–56.
19. Schneider, E.L., and Mitsui, Y. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3584–3588.
20. Pendergrass, W.R., Li, Y., Jiang, D., Fei, R.G., and Wolf, N.S. (1995) *Exp. Cell Res.*, **217**, 309–316.
21. Harley, C.B. (1991) *Mutat. Res.*, **256**, 271–282.
22. Counter, C.M. (1996) *Mutat. Res.*, **366**, 45–63.
23. Егоров Е.Е. (2001) *Биол. мембраны*, **18**, 249–256.
24. Оловников А.М. (1999) *Биохимия*, **64**, 1689–1698.
25. Klarer, W., Heidorn, K., Kuhne, K., Parwaresch, R., and Krupp, G. (1998) *FEBS Lett.*, **434**, 409–412.
26. Оловников А.М. (1971) *Докл. АН СССР*, **201**, 1496–1499.
27. Оловников А.М. (1972) *Вестн. АМН СССР*, **12**, 85–87.
28. Olovnikov, A.M. (1973) *J. Theor. Biol.*, **41**, 181–190.
29. Оловников А.М. (1992) *Изв. РАН. Сер. биол.*, № 4, 641–643.
30. Оловников А.М. (1995) *Изв. РАН. Сер. биол.*, № 4, 501–503.
31. Kazmierczak, G., and Lipniacki, T. (2002) *J. Math. Biol.*, **44**, 309–329.
32. Davenport, R.J., Wuite, G.J., Landick, R., and Bustamante, C. (2000) *Science*, **287**, 2497–2500.
33. Wang, M.D., Schnitzer, M.J., Yin, H., Landick, R., Gelles, J., and Block, S.M. (1998) *Science*, **282**, 902–907.
34. Yin, H., Wang, M.D., Svoboda, K., Landick, R., Block, S.M., and Gelles, J. (1995) *Science*, **270**, 1653–1657.
35. Yin, H., Landick, R., and Gelles, J. (1994) *Biophys. J.*, **67**, 2468–2478.
36. De Palo, E.F., Gatti, R., Lancerin, F., Cappellin, E., and Spinella, P. (2001) *Clin. Chim. Acta*, **305**, 1–17.
37. Garigan, D., Hsu, A.L., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J., and Kenyon, C. (2002) *Genetics*, **161**, 1101–1112.
38. Foulkes, N.S., Cremakian, N., Whitmore, D., and Sassone-Corsi, P. (2000) *Novartis Found. Symp.*, **227**, 5–14.
39. Анисимов С.В., Богилер К.Р., Анисимов В.Н. (2002) *Докл. РАН*, **383**, 276–281.
40. Pevet, P., Bothorel, B., Slotten, H., and Saboureau, M. (2002) *Cell Tissue Res.*, **309**, 183–191.
41. Vanecek, J. (1998) *Physiol. Rev.*, **78**, 687–721.
42. Li, W., Llopis, J., Whitney, M., Zlokarnik, G., and Tsien, R.Y. (1998) *Nature*, **392**, 936–941.
43. Dolmetsch, R.E., Xu, K., and Lewis, R.S. (1998) *Nature*, **392**, 933–936.
44. Varish, M.E. (1998) *J. Neurobiol.*, **37**, 146–157.
45. Haisenleder, D.J., Workman, L.J., Burger, L.L., Aylor, K.W., Dalkin, A.C., and Marshall, J.C. (2001) *Biol. Reprod.*, **65**, 1789–1793.
46. Hardingham, G.E., Arnold, F.J., and Bading, H. (2001) *Nat. Neurosci.*, **4**, 261–267.
47. Lewis, R.S. (2001) *Annu. Rev. Immunol.*, **19**, 497–521.
48. Aizman, O., Uhlen, P., Lal, M., Brismar, H., and Aperia, A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 13420–13424.
49. Hu, Q., Deshpande, S., Irani, K., and Ziegelstein, R.C. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 33995–33998.
50. Сюткина Е.В., Григорьев А.Э. (2000) В кн. *Хронобиология и хрономедицина* (под ред. Комарова Ф.И., Рапопорта С.И.), Москва, Триада-Х., с. 388–401.
51. Halberg, F., Cornelissen, G., Katinas, G., Watanabe, Y., Otsuka, K., Maggioni, C., Perfetto, F., Tarquini, R., Schwartzkopf, O., and Bakken, E.E. (2000) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **917**, 348–375.
52. Hermanussen, M., and Burmeister, J. (1989) *Monatsschr. Kinderheilkd.*, **137**, 403–410.
53. Rol de Lama, M.A., Perez-Romero, A., Ariznavarreta, M.C., Hermanussen, M., and Tresguerres, J.A. (1998) *Ann. Hum. Biol.*, **25**, 441–451.
54. Farbridge, K.J., and Leatherland, J.F. (1987) *J. Exp. Biol.*, **129**, 165–178.
55. Schmitz, S., Loeffler, M., Jones, J.B., Lange, R.D., and Wichmann, H.E. (1990) *Cell Tissue Kinet.*, **23**, 425–442.
56. Gibson, C.M., Gurney, C.W., Gaston, E.O., and Simmons, E.L. (1984) *Exp. Hematol.*, **12**, 343–348.
57. Gurney, C.W., Simmons, E.L., and Gaston, E.O. (1981) *Exp. Hematol.*, **9**, 118–122.
58. Sawamura, M., Yamaguchi, S., Murakami, H., Kitahara, T., Itoh, K., Maehara, T., Kawada, E., Matsushima, T., Tamura, J., and Naruse, T. (1994) *Br. J. Haematol.*, **88**, 215–218.
59. Tefferi, A., Solberg, L.A., Jr., Pettitt, R.M., and Willis, L.G. (1989) *Am. J. Hematol.*, **30**, 181–185.
60. Sok, M., Mikulecky, M., and Erzen, J. (2001) *Med. Hypotheses*, **57**, 638–641.
61. Sitar, J. (1997) *Cas. Lek. Cesk.*, **136**, 174–180.
62. Sha, L.R., Xu, N.T., Song, X.H., Zhang, L.P., and Zhang, Y. (1989) *Chin. Med. J.*, **102**, 722–725.
63. Mikulecky, M., and Bounias, M. (1997) *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **30**, 275–279.
64. Brown, F.M. (1988) *Chronobiol. Int.*, **5**, 195–210.
65. Law, S.P. (1986) *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, **65**, 45–48.
66. De Castro, J.M., and Pearcey, S.M. (1995) *Physiol. Behav.*, **57**, 439–444.
67. Wheeler, K.T., and Weinstein, R.E. (1979) *Radiat. Res.*, **80**, 343–347.
68. Wheeler, K.T., Weinstein, R.E., Kaufman, K., and Ritter, P. (1981) *Radiat. Res.*, **85**, 465–471.
69. Jaberaboansari, A., Fletcher, C., Wallen, C.A., and Wheeler, K.T. (1989) *Mech. Ageing Dev.*, **50**, 257–276.
70. Обухова Л.К., Жижина Г.П., Соловьева А.С., Блюхтерова Н.В. (1998) *Изв. РАН. Сер. биол.*, № 6, 698–704.
71. Акифьев А.П., Погапенко А.И. (2001) *Генетика*, **37**, 1445–1458.
72. Анисимов В.Н. (1997) *Российск. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **83**, 1–13.
73. Dilman, V.M., Bobrov, J.F., Ostroumova, M.N., Lvovich, E.G., Vishnevsky, A.S., Anisimov, V.N., and Vasiljeva, I.A. (1979) *Exp. Gerontol.*, **14**, 217–224.
74. Bartke, A., Brown-Borg, H.M., Bode, A.M., Carlson, J., Hunter, W.S., and Bronson, R.T. (1998) *Exp. Gerontol.*, **33**, 675–687.
75. Flurkey, K., Papaconstantinou, J., Miller, R.A., and Harrison, D.E. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6736–6741.
76. Mattson, M.P., Duan, W., and Maswood, N. (2002) *Ageing Res. Rev.*, **1**, 155–165.
77. Johnson, T.E., Cypser, J., de Castro, E., de Castro, S., Henderson, S., Murakami, S., Rikke, B., Tedesco, P., and Link, C. (2000) *Exp. Gerontol.*, **35**, 687–694.
78. Clancy, D.J., Gems, D., Harshman, L.G., Oldham, S., Stocker, H., Hafen, E., Leivers, S.J., and Partridge, L. (2001) *Science*, **292**, 104–106.
79. Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M.P., Yin, C.M., and Garofalo, R.S. (2001) *Science*, **292**, 107–110.
80. Wolkow, C.A., Kimura, K.D., Lee, M.S., and Ruvkun, G. (2000) *Science*, **290**, 147–150.
81. Wanagat, J., Allison, D.B., and Weindruch, R. (1999) *Toxicol. Sci.*, **52** (2 Suppl), 35–40.
82. Lee, J., Duan, W., Long, J.M., Ingram, D.K., and Mattson, M.P. (2000) *J. Mol. Neurosci.*, **15**, 99–108.
83. Prolla, T.A., and Mattson, M.P. (2001) *Trends Neurosci.*, **24**, S21–S31.
84. Duan, W., Guo, Z., and Mattson, M.P. (2001) *J. Neurochem.*, **76**, 619–626.

85. Rayner, D.V., and Trayhurn, P. (2001) *J. Mol. Med.*, **79**, 8–20.
86. Sherr, C.J., and DePinho, R.A. (2000) *Cell*, **102**, 407–410.
87. Xue, Y., Ratcliff, G.C., Wang, H., Davis-Searles, P.R., Gray, M.D., Erie, D.A., and Redinbo, M.R. (2002) *Biochemistry*, **41**, 2901–2912.
88. Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., and Wright, W.E. (1998) *Science*, **279**, 349–352.
89. Vaziri, H., and Benchimol, S. (1998) *Curr. Biol.*, **8**, 279–282.
90. Vaziri, H., Squire, J.A., Pandita, T.K., Bradley, G., Kuba, R.M., Zhang, H., Gulyas, S., Hill, R.P., Nolan G.P., and Benchimol, S. (1999) *Mol. Cell Biol.*, **19**, 2373–2379.
91. Artandi, S.E., Alson, S., Tietze, M.K., Sharpless, N.E., Ye, S., Greenberg, R.A., Castrillon, D.H., Horner, J.W., Weiler, S.R., Carrasco, R.D., and DePinho, R.A. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8191–8196.
92. Counter, C.M., Hahn, W.C., Wei, W., Caddle, S.D., Beijersbergen, R.L., Lansdorp, P.M., Sedivy, J.M., and Weinberg, R.A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14723–14728.
93. Olshansky, S.J., and Carnes, B.A. (2002) *The Quest for Immortality: Science at the Frontiers of Aging*. W.W. Norton and Co., N.Y.
94. Gavrilov, L.A., and Gavrilova, N.S. (2001) *J. Theor. Biol.*, **213**, 527–545.
95. Rubin, H. (2002) *Nature Biotechnol.*, **20**, 675–681.
96. Rubin, H. (1997) *Mech. Ageing Dev.*, **98**, 1–35.
97. Wright, W.E., and Shay, J.W. (2002) *Nat. Biotechnol.*, **20**, 682–688.
98. Stewart, S.A., and Weinberg, R.A. (2002) *Oncogene*, **21**, 627–630.
99. Kitano, H., and Imai, S.-I. (1998) *Exp. Gerontol.*, **33**, 393–419.
100. Blackburn, E. (2000) *Nature*, **408**, 53–56.
101. Holliday, R. (1996) *BioEssays*, **18**, 3–5.
102. Todaro, G.J., and Green, H. (1963) *J. Cell Biol.*, **17**, 299–313.
103. Smith, J.R., and Hayflick, L. (1974) *J. Cell Biol.*, **62**, 48–53.
104. Rabinovich, P.S. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2951–2955.
105. Ponten, J., Stein, W., and Shall, S. (1983) *J. Cell. Physiol.*, **117**, 342–352.
106. Merz, G.S., Jr. and Ross, J.D. (1973) *J. Cell Physiol.*, **82**, 75–80.
107. McCarron, M., Osborne, Y., Story, C.J., Dempsey, J.L., Turner, D.R., and Morley, A.A. (1987) *Mech. Ageing Dev.*, **41**, 211–218.
108. Smith, J.R., and Whitney, J.R. (1980) *Science*, **207**, 82–84.
109. Hemann, M.T., and Greider, C.W. (2000) *Nucl. Acids Res.*, **28**, 4474–4478.
110. Stanley, J.F., Pye, D., and MacGregor, A. (1975) *Nature*, **255**, 155–159.
111. Von Zglinicki, T. (2002) *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 339–344.
112. Дильман В.М. (1987) *Четыре модели медицины*, Медицина, Ленинград.
113. Fry, R.J.M., Tyler, S.A., and Leshner, S. (1966) in *Radiation and Ageing* (Lindop, P.J., and Sacher, G.A., eds), Taylor & Francis, Semmering, Austria, pp. 43–55.
114. Prowse, K.R., and Greider, C.W. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4818–4822.
115. Campisi, J. (2001) *Trends Cell Biol.*, **11**, S27–S31.
116. Dilman, V.M. (1994) *Development, Aging, and Disease. A New Rationale for and Intervention Strategy*, Chur: Harwood Acad Publ., Switzerland.
117. Анисимов В.Н. (2002) *Успехи геронтол.*, **10**, 99–125.
118. Anisimov, V.N. (2001) *Exp. Gerontol.*, **36**, 1101–1236.
119. Hamilton, M.L., van Remmen, H., Drake, J.A., Yang, H., Guo, Z.M., Kewitt, K., Walter, C.A., and Richardson, A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10469–10474.
120. Ukraintseva, S.V., and Yashin, A.I. (2001) *Mech. Ageing Dev.*, **122**, 1447–1460.
121. Carey, J.R., Liedo, P., and Vaupel, J.W. (1995) *Exp Gerontol.*, **30**, 605–629.
122. Жимулёв И.Ф. (1994) *Хромомерная организация политемных хромосом*, Наука, Новосибирск.
123. Прокофьева-Бельговская А.А. (1986) *Гетерохроматические районы хромосом*, Наука, Москва.
124. Жимулев И.Ф. (2002) *Общая и молекулярная генетика*. Изд-во Новосиб. ун-та и Сиб. унив. изд-во, Новосибирск.
125. Lima-de-Faria, A. (1999) *Riv. Biol.*, **92**, 513–515.
126. Lima-de-Faria, A., Mitelman, F., and Blomberg, J., and Pfeifer-Ohlsson, S. (1991) *Hereditas*, **114**, 207–211.
127. Lima-de-Faria, A., and Mitelman, F. (1986) *Biosci. Rep.*, **6**, 349–354.
128. Lima-de-Faria, A., Arnason, U., Widegren, B., Isaksson, M., Essen-Moller, J., and Jaworska, H. (1986) *Biosystems*, **19**, 185–212.
129. Lima-de-Faria, A. (1980) *Hereditas*, **93**, 1–46.
130. Drets, M.E., Folle, G.A., Mendizabal, M., Boccardo, E.M., and Bonomi, R. (1995) *Biol. Zentralblatt*, **114**, 329–338.
131. Drets, M.E., and Mendizabal, M. (1998) *Mutat. Res.*, **404**, 13–16.
132. Surralles, J., Ramirez, M.J., Marcos, R., Natarajan, A.T., and Mullenders, L.H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 10571–10574.
133. Fossel, M. (2002) *Cells, Aging, and Human Disease*, Oxford University Press, Oxford.
134. Kirkwood, T. (2001) *The End of Age: Why Everything about Ageing is Changing*, Profile Books, London.
135. Hayflick, L. (2000) *Nature*, **408**, 267–269.
136. Оловников А.М. (1999) *Успехи геронтол.*, **3**, 54–64.
137. Skulachev, V.P. (2001) *Exp. Gerontol.*, **36**, 995–1024.

## REDUSOME HYPOTHESIS OF AGING AND THE CONTROL OF BIOLOGICAL TIME DURING INDIVIDUAL DEVELOPMENT

A. M. Olovnikov

*Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Chernyakhovskogo, 5 – 94, Moscow 125319, Russia;  
E-mail: olovnikov@dol.ru*

Received September 1, 2002

The redusome hypothesis of aging and the control of biological time in individual development is proposed. Redusomes are hypothetical perichromosomal particles arising in differentiation events during morphogenesis of an organism. The linear molecule of DNA covered with proteins in redusome is assumed to be the copy of a segment of the chromosomal DNA. Redusomes are located mainly in subtelomeric regions of chromosomes. The redusome does not leave a body of chromosome even in the course of cellular divisions, being kept in its chromosomal nest. Like telomeric DNA, a redusome linear DNA is shortened step by step. Thus, tiny redusomes progressively decrease in sizes; it is from here their name originates. Together with loss of the length of DNA in a redusome, the number of different genes contained in it also decreases. Shortening of the redusomal DNA molecules (and, coupled to it, changes of the sets of genes in redusomes) is responsible for age-dependent shifts in the level of expression of different chromosomal genes. Owing to this, redusome DNA shortening serves as a key means of measuring biological time in individual development. The main part of DNA of most redusomes is postulated to be occupied by non-coding genes. Low-molecular weight RNAs (micro RNAs and fountain RNAs, or fRNAs) are transcribed from them. These RNAs are involved in regulation of various chromatin packings that are specific to certain differentiations, while others modulate the levels of expression of chromosomal genes. Hypothetical «fountain» RNAs can quantitatively regulate the expression levels of chromosomal genes, forming specific complexes with fions. Fions are suggested to be specific sites of a chromosomal DNA which are complementary to different fRNAs. Fions reside in the vicinity of usual chromosomal genes. A complex of the fRNA-fion, specifically interacting with a closed gate of the corresponding ionic channel of the internal nuclear membrane, initiates the opening of the gate for a very short term, thus organizing activity of an ion fountain which appears to be automatically aimed at the chromosomal gene nearest to the fion involved. The ion fountain creates, depending on specificity of matching fRNA, fion and ionic channel, distinctive ionic environment near the certain structural genes. Ionic fountains exert their action on the configuration of corresponding segments of chromatin and on the transcriptional efficiency of chromosomal genes in a topographically specific manner. Hence, the fountain system of nucleus is able to regulate the quantitative traits both of cells and organism; it can control dominance of alleles and plays a role in individual development. Significant and escalating truncation of the redusome DNA causes cell aging due to an arising and increasing deficit of fRNAs and, for this reason, the lack of required ions near certain structural genes. Progressive shortening of DNA of redusomes is proposed to result in cellular aging because of a constantly growing shortage of low-molecular weight RNAs transcribed from redusomal genes. Two types of redusomes are postulated: chronosomes and printosomes. Linear molecules of DNA in these two types of redusomes are called chronomeres and printomeres, respectively. Chronosomes are responsible for measurement of biological time in non-dividing cells of the CNS. Printosomes remember positions of cells in the course of interpretation of the positional information in morphogenesis. In accordance with the position of a cell in morphogenetic field, printomeres do change cellular properties and remember the change made (this is a so-called printomere mechanism of interpretation of the positional information). Besides, printomeres participate in maintaining the achieved state of cellular differentiation. Normally chronomere is shortened only on the maximum of infradian hormonal rhythm (T-rhythm) which initiates the act of a superhigh velocity of its transcription that is finished with truncation of the end of a chronomere (effect called scruping). The printomere can be shortened due to the effect of DNA end underreplication and owing to scruping. The effect of the end underreplication of DNA in doubling cells occurs simultaneously both in printomeres and telomeres. Shortening of telomeres is just a bystander process of aging of cells, whereas a true cause of biological aging is only the shortening of a redusome DNA. Processing of certain redusomes in terminally differentiating cells is a cause of a proliferation arrest. Linkage of genes in a eukaryotic chromosome is determined by the distances between genes and redusomes.

*Key words:* telomere, transcription, aging, biological time, ions, biological rhythms, differentiation, linkage of genes