

MOLECULAR MECHANISMS OF APOPTOTIC PROCESS

S. V. Ryzjov, V.V. Novikov

Nizhnii Novgorod State University named by N. I. Lobachevskii

Nizhnii Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology named by I.N. Blokhina

ABSTRACT

Our work is devoted to the study of molecular mechanisms of programmed cell death. The relevance of the problem is observed due correlations between disorder in the regulation of apoptotic processes and the most diseases, including tumors. We have considered the main pathways of apoptosis known nowadays: mitochondrial or bcl-2-dependant pathway, lipid pathway and death-receptors or Fas-relevant pathway. Different variants of transformation of program of apoptotic pathways had been shown. Analysis of many sources of Russian and foreign literature gives the detail modern approach to the stages of development of apoptosis and evaluation of some protein structures role taking part in the process of initiation and transduction of pro-apoptotic signal. The review is illustrated with informative pictures.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

С. В. Рыжов, В. В. Новиков

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. И.Н. Блохиной

Резюме

Данная работа посвящена вопросу исследования молекулярных механизмов программированной гибели клеток. Актуальность проблемы определяется связью между нарушениями в регуляции апоптотических процессов с развитием многих заболеваний, в том числе онкологических. Мы рассмотрели основные (описанные в настоящее время) пути апоптоза: митохондриальный или bcl-2-зависимый, липидный и путь, опосредованный через «рецепторы смерти» или Fas-зависимый. Показаны различные варианты трансформации путей развития программы апоптоза. На основании анализа большого числа отечественной и зарубежной литературы детально представлен современный взгляд на этапы развития апоптоза, а также дана оценка роли отдельных белковых структур, участвующих в процессе инициации и трансдукции проапоптотического сигнала. Статья содержит информативные иллюстрации.

Введение

Исследование молекулярных механизмов запрограммированной гибели клеток стало в последние годы одной из самых трудных и актуальных проблем медицины-биологических наук. Трудность этой проблемы очевидна - несмотря на большое количество экспериментальных данных, до сих пор не исследованы многие

механизмы, не до конца выяснены пути регуляции апоптоза отдельных клеток в целостном многоклеточном организме. Актуальность проблемы определяется связью между нарушениями в регуляции апоптотических процессов с большинством заболеваний, в том числе и онкологических.

Апоптоз играет жизненно важную роль в процессе эмбрионального и онтогенетического развития. Во взрослом организме апоптоз наблюдается в различных типах тканей, где выполняет функцию гомеостатической регуляции. Реализация запрограммированной гибели клеток происходит при различных патологических состояниях. При апоптозе происходит удаление клеток, выживание которых нежелательно для организма, например, злокачественно трансформированных, мутантных клеток или клеток, зараженных вирусом.

Апоптоз - многофазный процесс. На первом этапе (инициаторная фаза) происходит инициация и трансдукция проапоптотического сигнала. В качестве индукторов запрограммированной гибели могут выступать самые различные факторы, например, белковые продукты протоонкогенов, молекулы-лиганды мембранных рецепторов смерти, цитотоксические лекарственные препараты, радиация, вирусы и др. Существует большое количество белков, участвующих в апоптозе. Все их можно разделить на две функциональные группы: бел-

ки-триггеры и белки-модуляторы. Триггеры участвуют в индукции проапоптического сигнала (например, белки из семейства фактора некроза опухолей, T- и B-клеточные рецепторы, рецепторы гормонов). Модуляторы участвуют в трансдукции «сигнала смерти». За инициацией следует эффекторная фаза, в ходе которой происходит активация каспазной системы клетки. Вслед за эффекторной наступает фаза деградации клетки, характеризующаяся деструкцией клеточного материала. На этом этапе наблюдаются нуклеазная, протеазная и липазная гиперактивности, что неизбежно ведет к дезинтеграции клеточных подсистем. Разрушение плазмалеммы может привести к утечке агрессивной внутриклеточной среды в межклеточное пространство, однако, это проблема устраняется в финальной фазе апоптоза - в фазе «очистки», когда умирающая клетка поглощается макрофагами. Кроме того, известен еще один важный механизм защиты: тканевая трансглутаминаза свободно проходит внутрь апоптирующей клетки, где катализирует формирование перекрестных ϵ (ϵ -глутамил) лизиновых сшивок между субстратными белками с образованием протеиновой сети.

Существует несколько путей развития эффекторной фазы апоптоза, принципиальное отличие которых заключается в механизме инициации и трансдукции проапоптического сигнала. В настоящее время у млекопитающих описано три генеральных пути апоптоза: митохондриальный (Bcl-2-зависимый) путь, липидный путь и путь, опосредованный через «рецепторы смерти».

Bcl-2-зависимый путь апоптоза

Во время эффекторной фазы митохондриального пути апоптоза, как правило, происходит увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме [3]. Основными источниками префицита кальциевых ионов в клетке служат межклеточные пространства, матрикс митохондрий и эндоплазматический ретикулум [26]. Увеличение содержания Ca^{2+} в цитозоле ведет к активации эндонуклеаз, тканевой трансглутаминазы и клеточных протеаз, участвующих в деградационной фазе.

Увеличение внутриклеточной концентрации кальция ведет к нарушению проницаемости митохондриальной мембраны, в результате чего происходит свободная миграция различных ионов по обе стороны от нее. Итог - потеря митохондриального трансмембранного потенциала ($\Delta\psi_m$) и расширение пор хондролеммы. Такое состояние мембраны подрывает работу системы сопряжения электронного транспорта и синтеза АТФ, следствием чего является появление супероксид-анионов и свободных радикалов кислорода [4]. Активные и чрезвычайно токсичные формы кислорода способствуют окислению компонентов ДНК и внутренних мембран, ускоряя тем самым гибель клетки [44]. Все эти явления приводят к еще более серьезным повреждениям митохондриальной мембраны, через которую теперь способны проходить крупные белки, в том числе протеиназы и другие гидролитические ферменты.

Митохондриальный путь является Bcl-2-зависимым. Большое количество Bcl-2 постоянно презентировано на внешней митохондриальной мембране. Этот проте-

ин и его гомологи (Bcl-xL, Mcl-1 и др.) выполняют функцию защиты клеток от апоптоза. Механизм протекции установлен. Фактор Bcl-2 поддерживает инактивированное состояние проапоптического белкового комплекса, в состав которого входят прокаспаза-9 (Araf-3), адаптер Araf-1, флавопротеин AIF, цитохром с (Araf-2), фактор Smac и ряд других менее изученных факторов. Среди белков Bcl-2-семейства существует также группа апоптоз-опосредующих факторов (например, Bax, Bad, Bak, Bik, Bid, Bcl-xs и др.). Для переключения клетки в режим апоптоза необходимо связывание Bcl-2, что нейтрализует ингибирующее действие последнего. Такое связывание может осуществляться любым из проапоптических факторов Bcl-2-семейства [36]. При этом компоненты из ранее заблокированного комплекса освобождаются и свободно выходят в цитоплазму через дезорганизованную и достаточно перфорированную мембрану митохондрии. В присутствии АТФ и цитохрома с белок Araf-1 олигомеризуется (часто до октамера) и повторно связывается с прокаспазой-9 по специфическому каспаз-связывающему (CARD) домену [43]. Протеиназа активируется [21]. Каспаза-9, в свою очередь, активирует каспазу-3 [8]. Каспаза-3 является эффекторной цистеиновой протеиназой. Во-первых, она активирует другие эффекторные каспазы (например, каспазу-6 и -7), а во-вторых, вызывает протеолиз различных субстратов. Цистеиновые протеиназы инактивируют белки, защищающие клетку от апоптоза (например, Bcl-2), расщепляют структурные белки (например, актин, ламинин, плектин, виментин и фодрин), нарушают работу киназных, полимеразных и других ферментных систем иницируют фрагментацию ДНК путем активации ДНКаз, уничтожают сигнальные системы клетки [30, 35, 41].

Высвобождение фактора AIF (apoptosis-inducing factor) под действием антагониста Bcl-2 также ведет к стимуляции каскада активации протеаз через каспазу-3 [15]. Кроме того, AIF способен нарушать работу ядерного аппарата, вызывая конденсацию хроматина и фрагментацию ДНК [13]. Фактор Smac инактивирует ингибиторы апоптоза из семейства IAP-белков.

Существует еще несколько механизмов, приводящих к апоптозу через ингибирование Bcl-2. Например, возможна регуляция через онкосупрессор - белок p53, замедляющий в нормальных клетках пролиферативную активность [14]. При повреждении ДНК под действием ионизирующего или ультрафиолетового излучения, ингибиторов топоизомеразы II, а также при некоторых других воздействиях, происходит активация экспрессии гена p53. Белок p53 задерживает клетку в фазе G1/S клеточного цикла (через репрессию генов, регулирующих транскрипцию), чтобы дать время для работы репаративных систем [6]. На уровне транскрипции фактор p53 регулирует экспрессию генов, участвующих в блокаде клеточного цикла - p21 (ингибитор большинства циклин-зависимых киназ), а также взаимодействует либо с комплексами, определяющими синтез и репарацию ДНК, либо с белками, модулирующими апоптоз (например, Bax). Если повреждения ликвидировать не удастся, то p53 запускает апоптоз [24]. Происходит

это через инактивирование Bcl-2 при связывании с белком Вах. Известно, что некоторые стимулы, такие как гипоксия или митогенные онкогены, активируют ген p53, переводя клетку на апоптотический путь.

Fas-опосредованный путь апоптоза

Инициаторная фаза апоптоза может осуществляться опосредовано через «рецепторы смерти». Хорошо изучен механизм Fas-опосредованного апоптоза CD95-позитивных клеток. Для его развития необходимо взаимодействие Fas-рецептора, презентированного на мембране Fas-позитивных клеток, и Fas-лиганда [42]. Взаимодействие важно для таких типов физиологической регуляции как уничтожение зрелых Т-клеток на завершающих стадиях иммунного ответа, киллинг опухолевых или инфицированных вирусом клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами и NK-клетками [2]. Принципиальное отличие Fas-опосредуемого пути апоптоза от митохондриального заключается в том, что он обходит регулирование со стороны белков Bcl-2 [29] и является Ca^{2+} -независимым [42].

CD95 экспрессируется на поверхности клеток многих типов: на тимоцитах, лимфобластоидных клеточных линиях, активированных Т- и В-лимфоцитах, а также на фибробластах, гепатоцитах, кератиноцитах, миелоидных клетках и клетках нервной системы (нейронах, астроцитах и олигодендроцитах). Белок CD95 принадлежит к семейству рецепторов фактора некроза опухолей (ФНО) и содержит 3 повтора аминокислотной последовательности, богатых цистеином. Его зрелая мембранная форма - гомотримерный гликопротеин из 320-335 аминокислотных остатков (молекулярная масса 42-52 кДа). Ген Fas у человека (название гена - APT) локализован в длинном плече десятой хромосомы (10q23) и состоит из 9 экзонов [33, 42]. Человеческий Fas относится к мембранным белкам I типа. В его структуре можно выделить следующие регионы: экстрацеллюлярный, состоящий примерно из 160 аминокислотных остатков, закодированных в первых пяти экзонах гена Fas, трансмембранный, закодированный в 6 экзоне, и интрацеллюлярный, соответствующий 7-9 экзонам [33]. Выявлено, что периферические клетки крови и некоторые опухолевые клеточные линии, кроме полноразмерной Fas-мРНК, имеют варианты РНК, полученные в результате альтернативного сплайсинга [32]. Они кодируют растворимый Fas-антиген (sFas). Мономерные формы sFas блокируют центры связывания на Fas-лиганде, делая их недоступными для мембранного CD95 антигена - апоптоз не инициируется. Апоптозу препятствует и формирование мембранных Fas-олигомеров с участием растворимого CD95-мономера [1].

Мутации гена Fas приводят к экспрессии неактивных продуктов. Врожденные или приобретенные дефекты гена Fas ассоциированы с лимфопролиферативными и аутоиммунными заболеваниями. Подобная стратегия защиты от апоптоза реализуется и в опухолевых клетках. Соматические мутации гена, кодирующего CD95, впервые были описаны на примере лимфом. В настоящее время известно, что подобные явления наблюдаются во многих линиях опухолевых клеток как

лимфоидного, так и нелимфоидного ряда, причем частота мутаций гена достигает 4-28% [28]. Все это, несомненно, препятствует апоптозу.

Fas-лиганд (FasL) относится к семейству фактора некроза опухолей и является мембранным белком второго типа [39]. Ген лиганда расположен в первой хромосоме человека. FasL экспрессируется на активированных Т-лимфоцитах и NK-клетках, а также на клетках Сертоли и паренхимных клетках передней камеры глаза, что позволяет этим клеткам убивать любую Fas-экспрессирующую клетку, в том числе и активированный Т-лимфоцит. Белок существует в двух формах: нерастворимой (мембраносвязанной) и растворимой, отщепляемой от клетки с помощью металлопротеиназы [22]. Растворимая форма человеческого FasL сохраняет свою активность [39]. Подобно другим лигандам рецепторов семейства ФНО, FasL - гомотример, причем справедливо это не только для мембранной, но и для растворимой формы [42].

Примерно 70-80 аминокислотных остатков цитоплазматического участка молекулы CD95 образуют домен смерти (DD - death domain). После того, как тример Fas-лиганда взаимодействует с тримером Fas, последний изменяет свою конформацию так, что DD-домен оказывается способным связываться с соответствующим доменом белка-адаптера FADD/Mort-1 [5]. Различные формы белка FADD в своем составе содержат два ключевых домена: эффекторный домен смерти DED на N-конце и, связывающийся с молекулой CD95, DD на C-конце [7]. Адаптер FADD ассоцииата способен взаимодействовать с неактивной прокаспазой-8 (FLICE). Связывание происходит через DED-домены обеих молекул. Комплекс, в состав которого входит CD95, FADD и прокаспаза-8, образуется в течение нескольких секунд и носит название DISC (сигнальный комплекс, индуцирующий смерть). В составе DISC прокаспаза-8 самоактивируется, и в цитоплазму выходят продукты активации - субъединицы p10 и p18-20, которые впоследствии формируют тетрамер [7]. Активные субъединицы каспазы-8 активируют каспазу-3. Наступает эффекторная фаза Fas-опосредуемого апоптоза. В течение ее происходит активация протеолитической системы клетки, которую и формируют цистеиновые протеиназы. Помимо FADD, сродством к DD-домену CD95 обладают и другие цитоплазматические белки. Например, адаптерный фактор Daхх способен связываться с мембранной формой Fas-протеина и инициировать осуществление FADD-независимого SAPK/JNK/p38-пути (системы стресс-активируемых протеинкиназ), в котором активируются факторы транскрипции c-Jun [2]. Белки c-Jun взаимодействуют с энхансерами различных проапоптотических факторов, например, Fas, Fas-лиганда и т.п. К ассоциации с интрацеллюлярным C-фрагментом молекулы CD95 способна тирозиновая фосфатаза FAP-1. FAP-1 отрезает 15 аминокислотных остатков от DD-домена и тем самым исключает возможность формирования DISC. В результате апоптотические процессы не развиваются. Высокие внутриклеточные концентрации этой фосфатазы создаются в CD95-резистентных опухолевых клетках [37].

Каспазы

Каспазы получили свое название от словосочетания - Cysteine Aspartate Specific ProteASEs. Каспазы - цистеиновые аспартат-специфичные протеиназы. Цистеин входит в состав активного центра, а аспартат узнается как субстрат. Все представители семейства каспаз (для млекопитающих известно 14 видов) характеризуются сходством в аминокислотных последовательностях, структуре и функциональной значимости [40]. Эти протеиназы представлены в цитозоле в проферментном состоянии [12]. Зимогенные формы включают три домена: терминальный домен, малый субъединица (10-14 кДа) и большой субъединица (17-21 кДа). Активация сопровождается делецией короткого линкера (примерно 10 аминокислотных остатков) между двумя субъединицами, в результате чего на базе последних формируется гетеродимер [7]. Протеазной активностью обладает тетрамер каспазы, построенный из двух гетеродимеров и имеющий два каталитических сайта.

В каскаде реакций активации каспаз выделяют две функциональные группы протеазных молекул: инициаторы и эффекторы. Первым (каспаза-2, -8, -9, -10) принадлежит роль активирования новых видов протеиназ. Эффекторы же (каспаза-3, -6, -7) вызывают деструкцию специфичных субстратов, нарушая интеграцию клеточных подсистем [43]. Обе группы характеризуются существенными различиями в структуре терминального домена. У инициаторов он достаточно длинный (более 100 аминокислотных остатков), у эффекторов - обычно раза в 3-4 короче [7]. Не все эффекторные каспазы инактивируют белки. Так, первая из каспаз, что была идентифицирована (каспаза-1) получила название интерлейкин-1 β -конвертазы за то, что превращает интерлейкин-1 β и интерлейкин-18 в активные цитокины [5]. Под действием каспаз активируются многие сигнальные молекулы (различные киназы, фосфолипазы, нуклеазы и т.п.).

Каспазы постоянно присутствуют в клетке, даже в нейронах, которые не обновляются на протяжении всей жизни. Это позволяет быстро индуцировать апоптоз. Существует три основных пути развития каскада активации каспаз. Один из путей связан с взаимодействием индуктора апоптоза со специфичными рецепторами (например, активация каспазы-8 при взаимодействии Fas-лиганда с Fas-рецептором). Другой путь - активация каспазы-9 в результате образования гетеродимеров из белков семейства Bcl-2. И, наконец, третий путь активации каспаз - при помощи сериновой протеиназы - гранзима В. Этот путь актуален при индукции апоптоза клетки цитотоксическими Т-лимфоцитами и НК-клетками, которые и секретируют эти ферменты. Необходимо также присутствие порообразующих белков перфоринов, продуцируемых цитотоксическими клетками. В качестве мишеней гранзимов В выступают каспазы-3, -7 и -10 [27].

Известны белки, ингибирующие FLICE-протеазу (каспазу-8). Они получили название с-FLIPs (синонимы: FLAME/Casper/CASH/usurpin). Основной их характеристикой является наличие двух N-терминальных DED-доменов и отсутствие DD-домена, что позволяет

белкам FLIP присоединяться к FADD и значительно замедлять активацию каспазы-8 [42]. Более того, в составе DISC с-FLIP вызывает каскад реакций, приводящих к активации митоген-активной протеинкиназы ERK (внеклеточной регулируемой киназы), с одной стороны, и транскрипционного фактора NF- κ B, с другой [20]. Оба пути приводят к дифференциации или усилению пролиферативной активности [5], несмотря на то, что изначально инициировался проапоптотический сигнал (Рис. 1).

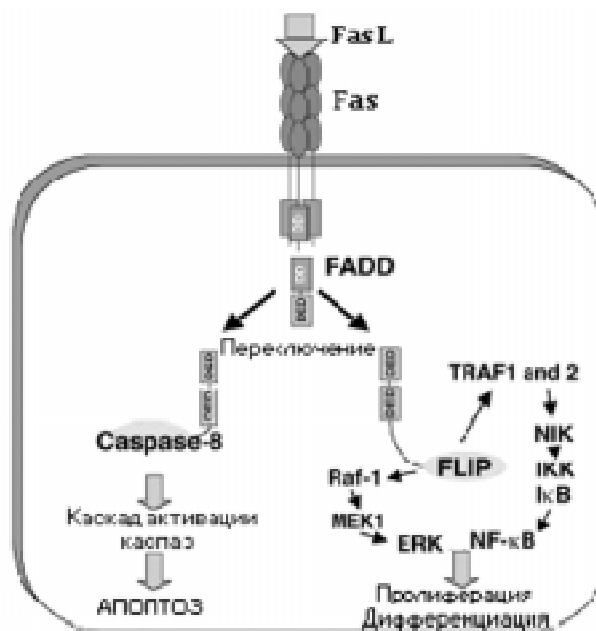


Рис. 1. Схема переключения проапоптотического пути на путь пролиферации (Budd, 2002 с переводом).
Объяснение в тексте

Другая группа специализированных ингибиторов апоптоза относится к семейству белков IAP (апоптоз-ингибирующих белков). Все IAP-протеины на N-конце содержат от 1 до 3 специфических повторов (примерно по 70 аминокислотных остатков в каждом), которые ответственны за ингибирующую функцию [11]. В настоящее время у человека идентифицировано 6 видов белков IAP-семейства: NAIP, cIAP-1, cIAP-2, XIAP, Survivin и BRUCE [18]. Белки XIAP, cIAP-1 и cIAP-2 ингибируют ключевые каспазы-3, -7 и -9 путем связывания тех участков, с которыми взаимодействуют и активаторы фермента [36]. Белок NAIP ингибирует каспазы-1, -3, -6, -7 и -8 [11].

Интеграция митохондриального и Fas-опосредованного путей апоптоза

Выше отмечалось, что Fas/FasL-система обособлена от Bcl-2-системы. Однако, в Fas-позитивных клетках нередко наблюдается интеграция этих двух систем. В этом случае говорят о клетках II типа, характеризующихся тем, что концентрация прокаспазы-8 в цитозоле мала и, в связи с этим, чрезвычайно низка интенсивность активации каспазы-3 [35]. Кроме того, действие этих ферментов лимитируется гиперэкспрессией Bcl-2. В клетках второго типа наиболее выражено действие

каспазы-8 через белок Bid, что ведет к развитию митохондриального пути апоптоза (Рис. 2). Протеиназа отрезает дезактивирующий фрагмент Bid, превращая белок в активный tBid (truncated Bid - усеченный). В свою очередь, tBid связывает Bcl-2, ликвидируя апоптоз-ингибирующее действие последнего [38, 42]. В клетках первого типа индукция апоптоза сопряжена с активацией большого количества молекул каспазы-8 из комплекса DISC. Это означает, что с большой скоростью будет активировано большое количество каспазы-3, - все успеет произойти до падения митохондриального трансмембранного потенциала $\Delta\psi_m$. Таким образом, здесь апоптоз идет без участия митохондриальных субстратов. Стоит отметить, что в клетках обоих типов наблюдается митохондриальная апоптогенная активность, но эта активность блокируется гиперэкспрессией Bcl-2. Лишь в клетках второго типа гиперэкспрессия Bcl-2 компенсируется инактивирующим связыванием с Bid.

Липидный путь апоптоза

Третьим путем апоптоза является липидный путь. Липидные молекулы, главным образом, сфинголипиды и гликофинголипиды, уже достаточно давно были замечены в роли медиаторов при сопутствующих стрессу ответных реакциях [17]. Позднее было показано, что церамид является медиатором апоптоза в различных клетках [31]. Cifone M.G. et al. (1995) установили, что

при взаимодействии кислой сфингомиелиназы ASM (acidic sphingomyelinase) с продуктами Fas-опосредованного апоптоза, происходит активация фермента. Сфингомиелиназы - гетерогенное семейство типа фосфолипаз С. Они гидролизуют сфингомиелин с образованием церамида и фосфорилхолина [25]. Церамид (N-ацил-сфингозин) - медиатор многих известных клеточных процессов, таких как пролиферация, дифференцировка и старение [23, 34]. Церамид активирует многочисленные протеинкиназы, вовлекаемые в пути трансдукции проапоптотического сигнала. Кроме того, N-ацил-сфингозин модифицирует белки ионных каналов, в частности K^+ -каналы, приводя к их инактивации. Механизм инактивации изучен недостаточно. По всей видимости, церамид активирует тирозинкиназы, фосфорилирующие белки ионных каналов [16]. Возникает вопрос: зачем апоптирующей клетке выключать каналы? Дело в том, что нормальный потенциал мембраны или гиперполяризация обеспечивают пролиферативную активность клеток, но никак не реализацию деструктивных событий. Таким образом, деполяризация мембраны путем отключения K^+ -каналов просто необходима для клетки, вовлеченной в апоптоз. Подобные каналы располагаются и на митохондриальной мембране, которая в ходе апоптоза разряжается. Возможно, что церамид-опосредованное отключение K^+ -каналов происходит и в данном случае.

Церамид может образовываться не только в ходе

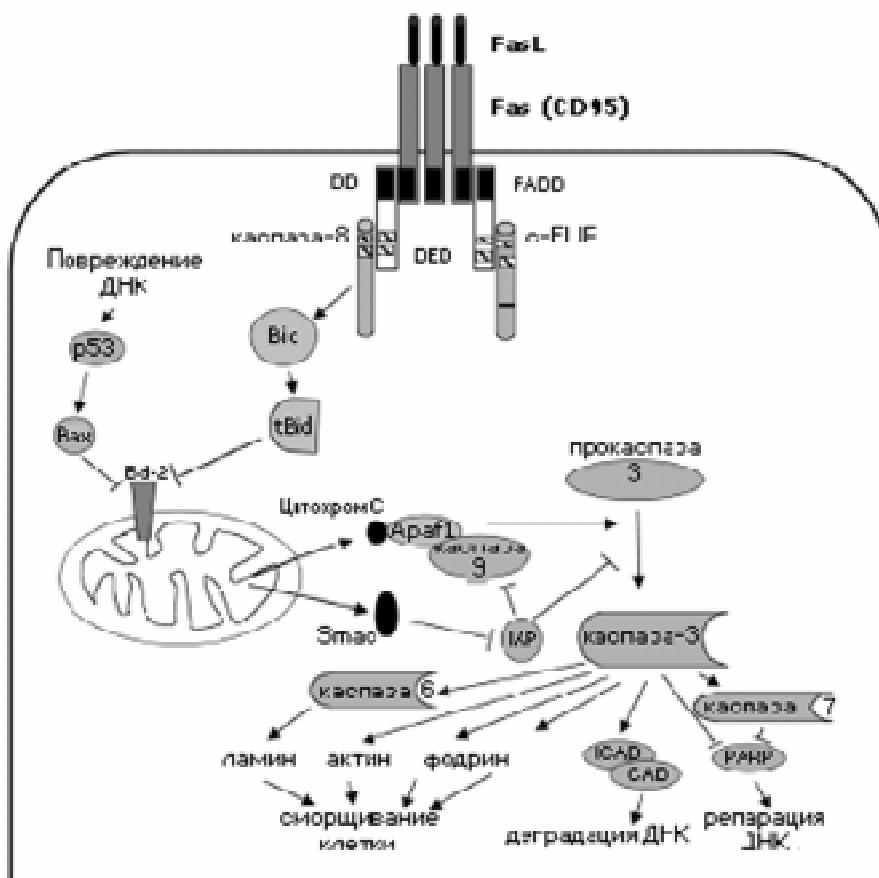


Рис. 2. Механизм апоптоза, реализуемый в CD95-позитивных клетках II типа (Budd, 2002 с переводом).
Объяснение в тексте.

Fas-опосредуемого пути апоптоза, но и независимо от него. Например, показано, что воздействие определенных доз радиации, ультрафиолета и химических препаратов в течение нескольких минут приводит к гидролизу сфингомиелина. Механизм дальнейших реакций до конца не изучен. Известно лишь то, что вторичный мессенджер - керамид - запускает SAPKs/JNK-путь [19]. Кроме того, N-ацил-сфингозин активирует серин-треониновую фосфатазу (SAPP), которая дефосфорилирует и, тем самым, инактивирует Bcl-2 [16].

R. De Maria et al. (1997) обнаружили, что после взаимодействия CD95 с лигандом и следующей за ним активации кислых сфингомиелиназ, сфингомиелин гидролизуется до церамида, а керамид, в свою очередь, превращается в ганглиозид GD3, что приводит к смещению внутриклеточных реакций в сторону апоптоза. Ганглиозиды - класс глико-сфинголипидов, характеризующихся наличием одного и более остатков сиаловой кислоты. Показано, что GD3 - потенциальный медиатор апоптоза, индуцирующий митохондриальные повреждения, в частности, потерю трансмембранного потенциала и фрагментацию ДНК [10]. Ни один из этих эффектов не может быть достигнут без участия ряда других ганглиозидов (GD1a и GM1). Все эти формы образуются в клетке при развитии липидного пути апоптоза.

На рисунке 3 схематично показаны основные пути возможного развития апоптоза в CD95-позитивных клетках. Как указано выше, Fas-опосредованный путь в определенных условиях может трансформироваться в митохондриальный и, кроме того, может быть сопряжен с липидным путем запрограммированной гибели клеток.

Перечисленные способы развития проапоптотической программы не исчерпывают все возможные варианты. В последнее время обнаруживаются отторжения от клас-

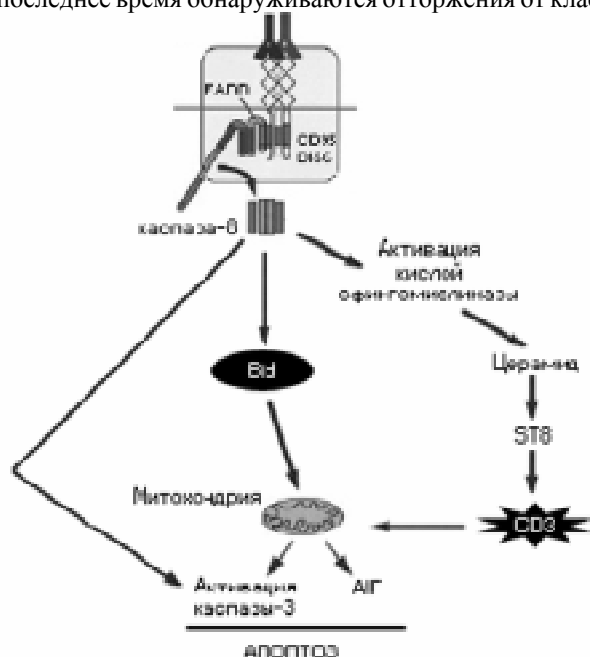


Рис. 3. Интеграция различных путей апоптоза в CD95-позитивных клетках. Объяснения в тексте. ST8 – промежуточный продукт превращения церамида в ганглиозид GD3.

сических путей, выявляются принципиально новые виды проапоптотических и апоптоз-ингибирующих каскадных реакций.

Апоптоз является общебиологическим механизмом, ответственным за поддержание постоянства численности клеточных популяций, а также формообразование и выбраковку дефектных клеток. Нарушение регуляции апоптоза приводит к возникновению различных заболеваний, связанных с усилением или, наоборот, ингибированием апоптоза.

Многообещающими являются подходы, связанные с регуляцией апоптоз-специфических генов и реализующиеся, в частности, в генной терапии - одной из самых перспективных областей современной медицины - при лечении заболеваний, вызванных нарушением функционирования отдельных генов. Идентификация новых маркеров апоптоза должна привести к более глубокому пониманию механизмов патогенеза заболеваний, совершенствованию дифференциальной диагностики и созданию принципиально новых направлений терапии.

Список литературы

1. Новиков В.В. Растворимые дифференцировочные антигены // Материалы Европейской школы онкологов. - М., 1999. - С. 10-14.
2. Ashkenazi A., Dixit V.M. Death receptors: signaling and modulation // Science - 1998.- V. 281.- P. 1305-1308.
3. Bellomo G., Perotti M., Taddei F. et al. Tumor necrosis factor alpha induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cells by an increase in intranuclear free Ca²⁺ concentration and DNA fragmentation // Cancer Res.- 1992.- V. 52.- P. 1342-1346.
4. Bernardi P., Brockemeier K.M., Pfeiffer D.R. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore: a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane // J. Bioenerg. Biomembr.- 1994.- V. 26.- P. 509-517.
5. Budd R.C. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis // J. Clin. Invest.- 2002.- V. 109, № 4.- P. 437-442.
6. Carson D.A. Cancer progression and p53 // Lancet - 1995.- V. 346.- P. 1009-1011.
7. Chang H.Y., Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases // Microbiol. and Mol. Biol. Rev.- 2000.- V. 64, № 4.- P. 821-846.
8. Chinnaiyan A.M. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine // Neoplasia - 1999.- V. 1.- P. 5-15.
9. Cifone M.G., Roncaioli P., De Maria R. et al. Multiple signaling originate at the Fas/Apo-1 (CD95) receptor: sequential involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acidic sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal // EMBO J.- 1995.- V. 14.- P. 5859-5868.
10. De Maria R., Lenti L., Malisan F. et al. Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-

- induced apoptosis // *Science* - 1997.- V. 277.- P. 1652-1655.
11. Deveraux Q.L., Reed J.C. IAP family proteins-suppressors of apoptosis // *Genes and Development* - 1999.- V. 13.- P. 239-252.
12. Earnshaw W.C., Martins L.M., Kaufmann S.H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis // *Annu. Rev. Biochem.*- 1999.- V. 68.- P. 383-424.
13. Ferri K.F., Kroemer G. Control of apoptotic DNA degradation // *Nat. Cell Biol.*- 2000.- V. 2.- P. 63-64.
14. Ginsberg D., Michael-Michalovitz D., Ginsberg D. et al. Induction of growth arrest by a temperature-sensitive p53 mutant is correlated with increased nuclear localization and decreased stability of the protein // *Mol. Cell Biol.*- 1991.- V. 11.- P. 582-585.
15. Green D.R., Reed J.C. Mitochondria and apoptosis // *Science* - 1998.- V. 281.- P. 1309-1312.
16. Gulbins E., Jekle A., Ferlinz K. et al. Physiology of apoptosis // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*- 2000.- V. 279.- P. 605-615.
17. Hannun Y.A., Luberto C. Ceramide in the eukaryotic stress response // *Trends Cell Biol.*- 2000.- V. 10.- P. 73-80.
18. Hauser H.P., Bardroff M., Pyrowolakis G. et al. A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors // *J. Cell Biol.*- 1998.- V. 141.- P. 1415-1422.
19. Herr I., Wilhelm D., Bohler T. et al. Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis // *EMBO J.*- 1997.- V. 16.- P. 6200-6208.
20. Hu W.H., Johnson H., Shu H.B. Activation of NF-kappaB by FADD, Casper, and caspase-8 // *J. Biol. Chem.*- 2000.- V. 275.- P. 10838-10844.
21. Hu Y., Benedict M.A., Ding L. et al. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis // *EMBO J.*- 1999.- V. 18.- P. 3586-3595.
22. Kayagaki N., Kawasaki A., Ebata T., et al. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand // *J. Exp. Med.*- 1995.- V. 182.- P. 1777-1783.
23. Kolesnick R., Kronke M. Regulation of ceramide production and apoptosis // *Annu. Rev. Physiol.*- 1998.- V. 60.- P. 643-665.
24. Lane D.P. P53, guardian of the genome // *Nature* - 1992.- V. 358.- P. 15-16.
25. Levade T., Jaffrezou J.P. Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? // *Biochim. Biophys. Acta* - 1999.- V. 1438.- P. 1-17.
26. McConkey D.J., Hartzell P., Nicotera P. et al. Calcium activated DNA fragmentation kills immature thymocytes // *FASEB J.*- 1989.- V. 3.- P. 1843-1849.
27. Medema J.P., Toes R.E., Scaffidi C. et al. Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis // *Eur. J. Immunol.*- 1997.- V. 27.- P. 3492-3498.
28. Muschen M., Warskulat U., Beckmann M.W. Defining CD95 as a tumor suppressor gene // *J. Mol. Med.*- 2000.- V. 78.- P. 312-325.
29. Nagata S. Apoptosis by death factor // *Cell* - 1997.- V. 88.- P. 355-365.
30. Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation // *Exp. Cell Res.*- 2000.- V. 256.- P. 12-18.
31. Obeid L.M., Linardic C.M., Karolak L.A. Programmed cell death induced by ceramide // *Science* - 1993.- V. 259.- P. 1769-1771.
32. Papoff G., Cascino I., Eramo A. et al. An N-terminal domain shared by Fas/Apo-1 (CD95) soluble variants prevents cell death in vitro // *J. Immunol.*- 1996.- V. 156, № 12.- P. 4622-4630.
33. Papoff G., Hausler P., Eramo A. et al. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor // *J. Biol. Chem.*- 1999.- V. 274, № 53.- P. 38241-38250.
34. Perry D., Hannun Y. The role of ceramide in cell signaling // *Biochim. Biophys. Acta* - 1998.- V. 1436.- P. 233-243.
35. Pinkoski M.J., Brunner T., Green D.R. et al. Fas and Fas ligand in gut and liver // *Am. J. Physiol. Gastrointest.*- 2000.- V. 278.- P. 354-366.
36. Rathmell J.C., Thompson C.B. The central effectors of cell death in the immune system // *Annu. Rev. Immunol.*- 1999.- V. 17.- P. 781-828.
37. Sato T., Irie S., Kitada S. et al. FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associate with Fas // *Science* - 1995.- V. 268.- P. 411-415.
38. Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A. et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways // *EMBO J.*- 1998.- V. 17, № 6.- P. 1675-1687.
39. Schneider P., Bodmer J.-L., Holler N. et al. Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas ligand interaction // *J. Biol. Chem.*- 1997.- V. 272, № 30.- P. 18827-18833.
40. Stennicke H.R., Salvesen G.S. Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation // *Biochim. Biophys. Acta* - 2000.- V. 1477.- P. 299-306.
41. Thornberry N.A., Lazebnik Y. Caspases: enemies within // *Science* - 1998.- V. 281.- P. 1312-1316.
42. Walczak H., Krammer P.H. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) Apoptosis Systems // *Exp. Cell Res.*- 2000.- V. 256.- P. 58-66.
43. Wolf B.B., Green D.R. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases // *J. Biol. Chem.*- 1999.- V. 274, № 29.- P. 20049-20052.
44. Zamzani N., Marchetti P., Castedo M. et al. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death // *J. Exp. Med.*- 1995.- V. 182.- P. 367-377.