

Роль протеолитических ферментов в контроле различных стадий апоптоза

Яровая Г.А., Нешкова Е.А., Мартынова Е.А., Блохина Т.Б.

РМАПО кафедра биохимии, г. Москва

Обзор продолжает серию публикаций рубрики «Протеолиз и протеолитические системы» (Биорегулирующие функции и патогенетическая роль протеолиза) и посвящен участию протеиназ в одной из наиболее жизненно важных, активно разрабатываемых и сложных функций организма – апоптозе.

Роль протеолитических процессов в контроле иницирования терминальных и других стадий апоптоза в настоящее время доказана. Для понимания сигнальных и деструктурирующих функций протеиназ в апоптозе авторы посчитали целесообразным предварить обзор кратким изложением современных представлений о функциях и механизмах действия апоптоза в норме и при патологии.

Апоптоз (или программированная гибель клеток) представляет собой генно-зависимый процесс, требующий затрат энергии, носящий системный характер, планируемый и контролируемый в соответствии с общим планом развития организма. Апоптоз является интегральным компонентом поддержания гомеостаза в течение всей жизни, включая органогенез в эмбриональном периоде, ремоделирование тканей, контроль тканевого гомеостаза, функционирование иммунной системы.

Так как апоптоз всегда требует затраты энергии, это принципиально отличает его от некроза, который чаще всего является результатом резкой потери внутриклеточной энергии при блокировании митохондриального дыхания и/или гликолитического образования АТФ. Это обуславливает невозможность осуществления энергозависимого апоптоза и является одним из механизмов инициации некроза.

Апоптоз является эволюционно-консервативным процессом, происходящим, вероятно, из противовирусной защиты простейших эукариот. Несмотря на различную кинетику развития программы гибели, сходные морфологические процессы наблюдаются в клетках различного происхождения и основаны на ингибировании синтеза белка на уровне инициации трансляции, протеолизе, дегградации ДНК и полинуклеотидов.

Все сигналы апоптоза реализуются в виде хорошо организованных сигнальных путей, действующих по единому принципу и включающих в себя каскады протеаз, которые определяют основные морфологические признаки

апоптоза. К ним относятся: конденсация хроматина, фрагментация ДНК, конденсация и вакуолизация цитоплазмы, реорганизация цитоскелета, потеря контакта с экстраклеточным матриксом, фрагментация цитоплазмы и образование апоптозных телец – изолированных фрагментов клетки, которые распознаются и фагоцитируются мононуклеарными фагоцитами без контакта их содержимого с внешней средой.

Апоптоз и связанные с ним заболевания

Слово «апоптоз» в переводе с латыни означает листопад, или опадание. Развитие и поддержание жизни обусловлено постоянной заменой клеток, 99% клеток организма человека живут не дольше 2-х лет. Реальная жизнь – это сбалансированная пропорция развивающихся и гибнущих клеток, причем их элиминация необходима для поддержания роста и возобновления, как единичных клеток, так и целого организма.

В 1972 году Kerr, Wyllie, и Currie опубликовали работу, в которой дали определение апоптозу и указали на его место и роль в развитии тканей и органов, а также провели основные различия между двумя основными типами гибели клеток, апоптозом и некрозом.

Апоптоз – системный процесс, регулируемый генами, планируемый и контролируемый в соответствии с общим планом развития организма, требующий затрат энергии и синтеза белка, сопровождаемый активацией гидролаз и эндонуклеаз, завершаемый формированием апоптозных телец.

Апоптоз является интегральным компонентом поддержания гомеостаза, необходимым в течение всех периодов жизни: для органогенеза в эмбриональном периоде, ремоделирования тканей, контроля тканевого гомеостаза, функционирования иммунной системы. Нарушения в реализации программы гибели клеток приводят к развитию ряда заболеваний.

Таблица 1.

Связь апоптоза и заболеваний разного типа

| Заболевания, связанные с ингибированием апоптоза | Заболевания, связанные с индукцией апоптоза | Заболевания с одновременным проявлением апоптоза и некроза |
|--|---|---|
| <p>онкологические: рак, саркомы, карциномы, лимфомы, лейкозы;</p> <p>аутоиммунные: системная красная волчанка, аутоиммунный гломерулонефрит, ревматоидный артрит, миастения гравис;</p> <p>воспалительные: бронхиальная астма, воспаление легких, анаплазмоз гранулоцитов</p> <p>вирусные инфекции: герпетическая инфекция, аденовирусная инфекция, акулловирусная инфекция;</p> | <p>нейродегенеративные: болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, эпилепсия, пигментные ретинопатии;</p> <p>гематологические: апластическая анемия, лимфоцитопения;</p> | <p>инфаркт миокарда, тромбоз глубоких вен, послеоперационные некрозы тканей, инсульты, острая почечная недостаточность, поликистоз почек.</p> |

Онкологические заболевания всегда сопровождаются теми или иными нарушениями апоптоза. При хроническом лимфолейкозе резко снижается процент апоптоза лимфоцитов периферической крови. В клинической практике широко используют понятие Апоптозного индекса (AI), который определяется по соотношению клеток в апоптозе к общему числу клеток данной популяции. AI измеряют до и после проведенной химиотерапии, апоптоз определяют по экспрессии аннексина-V. AI < 4,5% часто регистрируется у больных хроническими лейкозами с плохим прогнозом. Химиотерапия онкологических заболеваний часто приводит к индукции апоптоза клеток крови, в том числе, гранулоцитопении. Выборочное снижение нейтрофилов после использования специфических моноклональных антител для лечения онкологических больных часто обусловлено различной экспрессией рецепторов на плазматической мембране лимфоцитов и нейтрофилов. Например, препарат алемтузумаб, который представляет собой антитела к рецептору CD52, снижает только число гранулоцитов в связи с различной экспрессией CD52 на нейтрофилах, лимфоцитах и эозинофилах.

Некоторые лекарственные препараты, применяемые для лечения хронических воспалительных заболеваний, например, сульфосалазин при ревматоидном артрите, снижают воспалительную реакцию в тканях за счет индукции апоптоза нейтрофилов, клиренс которых из очага воспаления обуславливает снижение активности протеолитических ферментов в тканях и ослабление болевого синдрома.

При лечении аутоиммунных заболеваний измерение уровня апоптоза клеток крови служит, с одной стороны, контролем эффективности проводимой терапии, с другой стороны – прогностическим фактором, указывающим на продолжительность жизни пациента или на переход в более тяжелую стадию заболевания. При ревматоидном артрите обнаружена положительная корреляция между двумя параметрами – уровнем апоптоза и изменением экспрессии специфических гликоконъюгатов на мембране клеток крови, которые определяют лектин-зависимую агрегацию лимфоцитов и полиморфноядерных лейкоцитов.

Системная красная волчанка сопровождается поломками регуляторных механизмов жизнедеятельности клеток на многих уровнях. Повышается фагоцитоз клеток крови за счет их активной опсонизации компонентами комплемента C1q и C3b, появляются аутоантитела, распознающие и связывающие белки гистоны, аннексин-II и другие внутриклеточные структуры, что приводит к ускоренной гибели постмитотические клетки.

Большинство вирусов синтезируют вещества, ингибирующие сигнальные белки апоптоза. Вирусы вакцин также кодируют антигены, блокирующие регуляторные сигналы апоптоза. Инфицирование цитомегаловирусом приводит к изменению жизненного цикла макрофагов и нарушению путей апоптоза.

Заболевания легких сопровождаются изменением апоптоза в клетках эпителия. Кроме того, загрязнители окружающей среды (пестициды, гербициды, асбесты, аллергены,

газообразные отходы химического производства и другие) вызывают окислительный стресс в клетках бронхиального дерева, что приводит к снижению внутриклеточного глутатиона, падению уровня АТФ и повышению концентрации реактивных метаболитов кислорода. Эти метаболические нарушения обуславливают активацию апоптоза и некроза в клетках эпителия.

В основе большинства нейродегенеративных заболеваний лежит окислительный стресс и вызванная им гибель нейронов.

Морфологические и молекулярные изменения при апоптозе

Морфологическая характеристика апоптоза: активация каспаз и эндонуклеаз, расщепление структурных белков цитоплазмы и ядра; конденсация хроматина, олигонуклеосомальная фрагментация ДНК, фрагментация ядра, конденсация и вакуолизация цитоплазмы, реорганизация цитоскелета, потеря контакта с экстраклеточным матриксом, фрагментация цитоплазмы, сморщивание клетки, образование апоптозных телец, фагоцитоз изолированных клеточных частиц без контакта их содержимого с внешней средой. На рис.1. приведены электронно-микроскопические фотографии апоптоза в различных клетках крови.

При апоптозе фосфатидилсерин перемещается с внутреннего бислоя к наружному бислою плазматической мембраны, нарушая асимметрию фосфолипидов, поддерживаемую АТФ-зависимой аминофосфолипид-транслоказой. Изолированные фрагменты клетки (апоптозные тельца) распознаются макрофагами, моноцитами, дендритными клетками и активированными нейтрофилами. Сигналом для фагоцитоза является экспрессия на поверхности апоптозных телец фосфатидилсерина, нуклеотидов, специфических рецепторов. Рецептор P2Y (2) моноцитов и макрофагов распознает экстраклеточные нуклеотиды (АТФ и урицилтрифосфат), появляющиеся на поверхности плазматической мембраны клеток на ранних стадиях развития апоптоза. Фагоцитоз апоптозных телец предотвращает контакт их содержимого с экстраклеточным матриксом.

В отличие от апоптоза, **некроз** является результатом массивной потери АТФ или подавления его синтеза в клетке, характеризуется набуханием митохондрий, распадом плазматической мембраны, выходом содержимого клетки в окружающую среду и развитием воспалительной реакции. Резкая потеря клеткой энергии в результате блокирования митохондриального дыхания и/или гликолитического образования АТФ с последующим снижением пула цитозольного АТФ не дает возможности осуществления энергозависимого апоптоза и является одним из механизмов некроза.



Рисунок 1.

Электронно-микроскопическая картина апоптоза в различных популяциях клеток крови (фотографии сделаны и предоставлены профессором И.А. Морозовым).

Гены – индукторы апоптоза условно можно разделить на несколько групп:

- гены, кодирующие цитолитические гранулированные сериновые протеазы – перфорин, и гранзимы А и В, гранулизин и т.д.,
- проапоптозные гены *bad, bak, bax, bik* (bcl-2 interacting killer), *bag, bcl-X (s), killer/dr5, traf19*,
- Fas-L (CD95L, или APO-1 лиганд),
- гены семейства фактора некроза опухолей (TNF- α , 4-1BBL, или CD127L, CD70, или CD27L, CD154, или CD40L),
- *TRAIL/APO-2L*,
- *Gax*, *homeobox* ген, кодирующий фактор транскрипции, регулирующий p-21-зависимую пролиферацию, негативно регулирующий экспрессию гена *bcl-2* и повышающий экспрессию гена *bax*,
- гены, кодирующие белки SARP1, SARP2, SARP3 (Secreted apoptosis-related proteins),
- гены, кодирующие белки DAP (Death associated proteins), участвующие в Fas-, TNF- α - и IFN- γ – зависимом апоптозе. К ним относятся:
 - 1) DAP-1 – малый пролин-обогащенный цитоплазматический белок,
 - 2) DAP-3 – нуклеотид-связывающий белок,
 - 3) DAP-5 – гомолог фактора ингибирования трансляции eIF4G,
 - 4) катепсин D – лизосомная протеаза,
 - 5) DAP-киназа – Ca²⁺/кальмодулин – регулируемая киназа, несущая так называемый «домен смерти» и определяющая изменения в цитоскелете при апоптозе,

- гены суицида, которые, будучи перенесенными в клетку, стимулируют образование ферментов, конвертирующих нетоксичные вещества в проапоптотические. К ним относятся гены *E.coli*:
- *polβ*, кодирующий ДНК полимеразу β,
 - *fcy1*,
 - *EHV4tk*, кодирующий тимидинкиназу вируса герпеса,
 - *Tdk* и *tmk*, кодирующие тимидинкиназу и тимидилаткиназу,
 - *codA*, кодирующий – цитозиндезаминазу,
 - *urp*, кодирующая урацилфосфорибозилтрансферазу,

Программа гибели клетки может быть запущена отсутствием ростовых факторов, потерей контакта с экстраклеточным матриксом, отравлением токсинами, γ-радиацией, оксидантами, активными формами внеклеточного кислорода, этанолом, допамином, глутаматом, аденовирусами и другими патогенными факторами.

Гены – ингибиторы апоптоза – ряд генов, продукты которых препятствуют реализации программы гибели клетки. К ним относятся:

- *bcl-2*,
- *bcl-X (L)*,
- *BHRF-1*,
- *fap-1*,
- *mcl-1*,
- *FIAM* (Fas Apoptosis Inhibitory Molecule),
- гены опухолевых супрессоров *p53*, *p16*, *p21*, *p27*,
- гены, кодирующие белки семейства IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein family), включающие ингибиторы каспаз 3 и 7, модуляторы ядерных факторов транскрипции NF-κB и p-Rel,
- гены ростовых факторов опухолей.

Ингибиторами апоптоза являются вирусы, опухолевые промоторы, фенобарбитал, кальпаиновые ингибиторы, ингибиторы цистеиновых протеаз, половые гормоны, нейтральные жирные кислоты, фосфолипиды, ДНК-содержащие вирусы и другие факторы.

Механизмы регуляции апоптоза

Апоптоз реализуется в виде хорошо организованных сигнальных путей, действующих по единому принципу и включающих в себя протеазы, которые определяют основные морфологические признаки этого процесса. С точки зрения биохимических процессов в клетке апоптоз условно можно разделить на несколько типов, отличающихся активностью ферментов определенных классов и сигнальными путями рецепторов апоптоза. Некоторые программы гибели клетки реализуются без участия ядра и не требуют активации ядерных факторов транскрипции.

Типы апоптоза – в зависимости от сигнального пути апоптоза и вовлечения вторичных мессенджеров передачи сигналов в настоящее время различают: несколько типов апоптоза:

- обусловленный стрессом,
- инициируемый при повреждении ДНК,
- активационно-индуцированный,
- инициируемый свободными радикалами,
- кислород – зависимый,
- NO-зависимый,
- Fas-индуцированный,
- зависимый от фактора некроза опухолей (TNF-α),
- гамма-интерферон (IFN-γ) зависимый
- глюкокортикоид – индуцированный,
- гранзим В – индуцированный,
- перфорин-зависимый,
- инициируемый проапоптотическими генами семейства *bcl-2*,
- инициируемый секретируемыми проапоптотическими белками,
- инициируемый опухолевыми супрессорами (*p53*, *p16*, *p21*, *p27*),
- инициируемый потерей контакта с внеклеточным матриксом,
- активируемый при повреждении митохондрий,
- активируемый при повреждении мембран лизосом,
- другие типы апоптоза.

Протеазы, участвующие в апоптозе

Протеазы – общепринятое название ферментов пептидаз (гидролазы пептидных связей, КФ 3.4.X.X.). В реализации программы гибели клетки принимают участие протеазы всех известных каталитических типов (табл.2.). Различные протеазы создают собственные сигнальные пути, взаимодействующие друг с другом, в которых они играют роль как вторичных мессенджеров, так и эффекторов апоптоза.

Сериновая протеаза гранзим В (ЕС 3.4.21.79), высвобождаемая цитотоксическими Т лимфоцитами в процессе киллинга клеток, катализирует и активирует каспазы-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10. Гранзим В преимущественно расщепляет последовательность IXXD в карбоксильном конце большой субъединицы. Гранзим В- и перфорин-зависимые типы апоптоза также включают в себя митохондриальные изменения, сопровождаемые высвобождением цитохрома *c* в цитозоль, падением трансмембранного потенциала дельта пси мю и высвобождением реактивных метаболитов кислорода. В качестве дополнительного сигнального пути, независимого от митохондрий, активируется каспаза-3, которая затем активирует каспазу-1.

Таблица 2.

Перечень каталитических типов протеаз, участвующих в апоптозе

| Каталитический тип протеаз | Механизм действия | Примеры |
|----------------------------|--|--------------------------------|
| Сериновые | Ковалентно связывают поляризованные боковые цепи с серином | Гранзимы, эластаза |
| Цистеиновые | Ковалентно связывают поляризованные боковые цепи с цистеином | Катепсин Д, каспазы, кальпаины |
| Треониновые | Ковалентно связывают поляризованные боковые цепи с треонином | Протеасомы |
| Аспартантные | Молекулы воды связывают поляризованные ферментом аспарат-содержащие боковые цепи | Катепсин Д |
| Металлопротеиназы | Молекулы воды связывают поляризованные ферментом молекулы цинка | Матриксные металлопротеиназы |

Лизосомные кислые аспартантные протеазы – катепсины В и D, участвуют в качестве вторичных мессенджеров (или посредников) в Fas-зависимом сигнальном пути апоптоза. Катепсины также передают сигналы апоптоза, сопряженные со сфинголипидом церамидом. Церамид, образующийся в результате распада сфингомиелина при активации кислой сфингомиелиназы при активации Fas-рецептора, специфически связывает прокатепсин D (52 кДа), вызывая его аутокаталитический протеолиз с образованием активного катепсина D (ЕС 3.4.23.5) в виде двух изоформ р48 и р32. В клетках HE-29 опухоли толстой кишки, С2-церамид повышает синтез эндогенного церамида, который ингибирует активацию катепсина D в лизосомах через 2 часа. Накопление церамида в микросомах коррелирует с повышением активности кислой сфингомиелиназы и глюкозил-церамидсинтазы с последующим накоплением ганглиозида GD3, синтезированного из церамида.

Большинство сигнальных путей апоптоза включает в себя каспазы, которые активируются последовательно, создавая протеолитические каскады. Каспазы – внутриклеточные протеазы, обладающие консервативной цистеиновой последовательностью в активном сайте, которая определяет связывание субстрата и его гидролиз после аспартата в аминокислоте в положении P1 (Cysteine ASPartate – specific proteASE – **CASPASE**). Каспазы (КФ 3.4.22.X) имеют активированный цистеин внутри высококонсервативного активного сайта, включающего пентапептид QACRG.

Генетический анализ нематоды *Caenorhabditis elegans* выявил три белка сигнального пути апоптоза, кодируемых генами *ced-3*, *-4*, *-9* (*C. elegans* death gene), мутации которых позволяют клеткам избежать естественной гибели, необходимой в процессе развития организма. Белок Ced-3 оказался гомологом цистеиновой протеазы млекопитающих ICE (interleukin-1β converting enzyme), то есть каспазы-1. С этого момента началось изучение семейства протеаз, названных каспазами.

Все известные каспазы пронумерованы согласно последовательности их открытия. В зависимости от инициирующих каспаз апоптоз можно классифицировать на три основные группы:

- апоптоз, активированный сигналами от рецепторов, при котором инициирующими являются каспаза-8 и каспаза-10,
- митохондриальный тип апоптоза, с участием каспазы-2 и -9,
- апоптоз, обусловленный стрессовыми сигналами из эндоплазматического ретикулума, когда инициирующей является каспаза-12.

Все сигнальные пути в клетке пересекаются, а ведущая роль одного из них определяется интенсивностью первоначального сигнала, инициирующего гибель клетки (рис.2).

Каспазы синтезируются в клетке первоначально в виде неактивного профермента, состоящего из 4-х доменов: аминотерминального домена (так называемого продомена, или N-терминального полипептида); большой субъединицы;

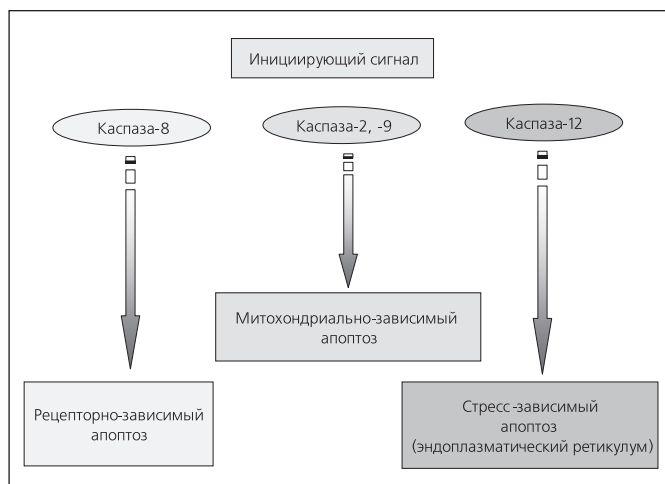


Рисунок 2. Участие каспаз в различных типах апоптоза в клетках.

малой субъединицы и связывающего региона между субъединицами. Активация каспаз инициируется протеолитическим расщеплением во внутреннем сайте между домена, что приводит к высвобождению малой субъединицы по Asp-x, затем связывающего региона и большой субъединицы, и удалению продомена. Большая и малая субъединицы из разных про-каспаз собираются в единый комплекс. Активная форма каспазы – это два гетеродимера, связанных малыми субъединицами, окруженными двумя большими субъединицами. Схема активации каспаз приведена на рис. 3.

Наиболее ярким проявлением активности каспаз является их участие в апоптозе. К морфологическим эффектам каспаз относятся расщепление РАК-2 и гелсолина, что приводит к модификации мембран клетки. Потеря адгезии клетки обусловлена потерей активности фокальных киназ и митоген-активированной киназы MEKK-1. Нарушение репарации ДНК вызывается потерей активности полиАДФ-рибозо-полимеразы и ДНК-протеинкиназы. Фрагментация ДНК осуществляется ДНК-фрагментирующими факторами и активированными каспазо-зависимыми эндонуклеазами. (ICAD-L (-S), DFF45, DFF40). К фрагментации ядра приводит активация ламинов. Фрагментация цитоплазмы происходит в результате потери активности белков цитоскелета, таких как фодрин, актин, и другие. Каспазы ответственны за потерю контроля над клеточным циклом за счет протеолиза белка ретинобластомы, ингибитора p21 и других регуляторных молекул клеточного цикла. Субстратами каспаз, важными для реализации апоптоза, также являются про-IL-1 β , IL-18, РАК-2 – p21-ассоциированная киназа, протеинкиназа С дельта (PKC δ) и другие белки.

Классификация каспаз. В зависимости от гомологичности последовательностей или варибельности региона P₂₋₄ субстрата, каспазы классифицируются на три подсемейства или группы.

Подсемейство ICE каспаз включает в себя пептиды, родственные каспазе-1, а также видоспецифичные изоформы самой каспазы-1, которые максимально соответствуют ей в аминокислотном домене. Каспаза-13 (ERICE – Evolutionary Related IL-1 β Converting Enzyme) входит в подсемейство ICE на основании филогенетического анализа, индуцирует апоптоз в клетках карциномы молочной железы MCF-7, а также в линии 293h клеток эмбриональной почки. Подобно другим членам подсемейства ICE, каспаза-13 принимает участие в рецепторно – зависимом типе апоптоза и активируется каспазой-8 при связывании рецепторов семейства фактора некроза опухолей. Экспрессия каспазы-13 показана на клетках человека и в периферических мононуклеарах быка.

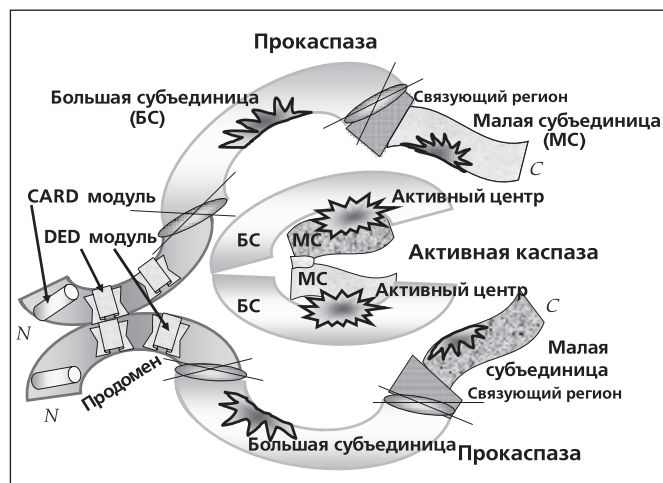


Рисунок 3.

Схематичное изображение строения и активации каспаз.

Каспазы, содержащие последовательности DExD и IVL/ExD, играют важную роль в проведении сигнала от рецепторов апоптоза. При этом гидрофобные аминокислоты не обнаруживаются в P4 регионе тех субстратов, которые расщепляются при апоптозе. Каспазы-1, -4 и -5, обладающих последовательностью WEND, играют роль в активации цитокинов при апоптозе.

Биологическая роль каспаз. Каспазы обнаружены во всех тканях млекопитающих, где специфически экспрессируются в зависимости от типа клеток. Функциональную активность каспаз можно условно разделить на физиологическую и апоптозную. К физиологическим функциям каспаз относится образование активных форм ферментов, процессинг про-воспалительных цитокинов (каспазы-1 и -11). Каспазы принимают участие в дифференцировке и пролиферации гемопоэтических клеток, участие в развитии мозга и сердечной мышцы в эмбриональный период. Это, соответственно, относится к каспазе-3, каспазе-9 и каспазе-8. Каспаза-14 активирует ферменты, необходимые для полноценной дифференцировки кератиноцитов.

В настоящее время определено множество мишеней действия каспаз в клетке, что указывает на их важную биологическую функцию. При изменении физиологического состояния в клетке изменяется класс ферментов, взаимодействующий с субстратом, а также мишени действия каспаз. Примером может служить расщепление и активация каспазами мембранно-связанных факторов транскрипции SREBP-1 и SREBP-2 (sterol-regulatory element binding proteins), которые в живой клетке поддерживают гомеостаз холестерина (cellular cholesterol homeostasis) и активируются иными ферментами, чем при инициации апоптоза.

Каспаза-1 (ЕС 3.4.22.36) человека и других млекопитающих имеют высокую гомологию. Для лошадиной каспазы-1 (405 аминокислот) идентичность составляет 72% с каспазой-1 человека и 63% – с мышшиной, при этом сайты протеолитического расщепления остаются консервативными. Показано, что каспаза-1 человека может расщеплять мышшиные IL-1 β и IL-18. У человека ген, кодирующий каспазу, картирован на плече 11-й хромосомы в сайте, часто вовлекаемом в активацию при опухолевом росте.

Аутопротеолиз каспазы-1 начинается по Asp²⁹⁷-Ser²⁹⁸. Активная каспаза-1 – это тетрамер, состоящий из двух р20 субъединиц, окружающих две р10 субъединицы. Активный сайт формируется из Cys²⁸⁵ и His²³⁷ обеих субъединиц, образующих каталитическую диаду. Активный пентапептид Gln-Ala-Cys-Xaa-Gly локализуется на р20 субъединице. При этом два аргинина (Arg¹⁷⁹ с субъединицы р20 и Arg³⁴¹ с р10) образуют водородные связи с аспаратом в Р₁ сайте субстрата. Мутации в этой последовательности приводят к потере каталитической активности. Боковые цепи последовательностей на субъединице р10, начиная от Val³³⁸ до Pro³⁴³, взаимодействуют с Р₂₋₄ сайтами ингибитора каспазы-1.

Существуют две модели активации про-каспазы-1. Первая подразумевает ассоциацию двух р45 субъединиц и их процессинг. При этом субъединицы р20 и р10 формируют один активный сайт, происходящий из двух разных предшественников после аутопроцессинга промежуточного предшественника. Субъединица р10 высвобождается из р45 предшественника ранее субъединицы р20. Амино-терминальный регион предшественника высвобождается последним, так как выполняет регуляторную роль. Ранее существовала версия о первоначальном процессировании и последующей ассоциации зрелых белков. Подтверждено, что продомен каспазы-1 абсолютно необходим для димеризации и аутоактивации фермента. Альтернативный сплайсинг дает 4 изоформы каспазы-1 с различными эффектами при апоптозе.

Физиологическая роль каспазы-1 заключается, прежде всего, в активации провоспалительных ферментов. Профермент р45 локализуется в цитозоле, откуда в виде активного тетрамера перемещается в плазматическую мембрану, где активирует про-IL-1 β до зрелой формы во время его секреции. Каспаза-1 также активирует IL-18 в макрофагах, который затем стимулирует синтез IFN-g лимфоцитами и экспрессию Fas-L.

Активная каспаза-1 содержит модуль CARD для взаимодействия между белками в сигнальных путях. У человека обнаружен регуляторный белок CARD-8, который экспрессируется в моноцитах, лимфоцитах, клетках плаценты и т.д. и имеет CARD домен в карбоксильно-терминальном

регионе, что позволяет ему физически взаимодействовать с каспазой-1 и регулировать ее активность.

Доминантным регулятором в апоптотном каскаде с участием каспазы-1 является церамид, синтезированный de novo, что показано действием фумонизина В1 – специфического ингибитора церамид-синтазы. Церамид-зависимый апоптоз характерен для механизма действия Shigella при инфицировании макрофагов, когда синтезируемый ею белок IpaB (invasion plasmid antigen) непосредственно активирует каспазу-1, что приводит к активации IL-1 β и быстрой гибели макрофагов путем апоптоза.

У трансгенных мышей перенос человеческого гена каспазы-1 в клетки кожи приводит к образованию язв и стойкому дерматиту. Это обусловлено воспалительными инфильтратами, в которых значительно повышен уровень активности IL-1 β , что приводит к апоптозу кератиноцитов. Напротив, дефицит каспазы-1 оказывает выраженное противовоспалительное действие, так как снижается синтез про-воспалительных цитокинов и не активируются лимфоциты.

Каспазы-4 и -5 относятся к подсемейству ICE и имеют 52% гомологии с каспазой-1 человека, а каспаза-4 также имеет 30% гомологии с каспазой-2. Цитоплазматические проферменты большой молекулярной массы процессируются с образованием активных тетрамеров р20/р10. Каспаза-4 широко представлена в тканях человека, причем ее распределение отличается от локализации каспазы-1. Каспаза-4 способна к аутокатализу и может активировать каспазу-1. Гомологом каспазы-4 человека является мышшиная каспаза-11.

Каспаза-3 обладает максимальным подобием белку Ced-3 и возглавляет соответствующее подсемейство каспаз. Это основная эффекторная каспаза апоптоза, которая экспрессируется практически во всех тканях. Процессинг про-каспазы-3 (32 кДа) начинается по Asp²⁸↓Ser²⁹, а затем по Asp¹⁷⁵↓Ser¹⁷⁶ между большой и малой субъединицами. Отщепление продомена идет по Asp⁹.

Хотя каспаза-3 похожа на каспазу-1 по структуре, ее S4 субсайт весьма отличается по размеру и имеет внутренний карман, тесно примыкающий к Asp P4 боковой цепи. Субстратная специфичность определяется последовательностью Asp-Glu-Val-Asp (DEVD). Это позволяет каспазе-3 расщеплять ключевые клеточные белки, например поли(АДФ-рибозо)-полимеразу, что, для некоторых типов апоптоза, определяет формирование олигонуклеосомальных фрагментов ДНК. Образование фрагментов ДНК также связано с другим субстратом каспазы-3 – комплексом DFF45/ICAD (DNA Fragmenting Factor/Inhibitor of Caspase Activated DNase), протеолиз которого приводит к образованию эндонуклеазы DFF40/CAD. Одним из субстратов

каспазы-3 является фактор eIF4G, инициирующий трансляцию связыванием мРНК с рибосомой, расщепление которого объясняет ингибирование трансляции при рецептор-зависимом апоптозе.

Каспаза-3 регулирует проведение сигнала в клетке через G4-Gd1 белок семейства Rho GTPases, который при Fas-зависимом апоптозе быстро укорачивается до фрагмента 23кДа. Каспаза-3 расщепляет полномерную РКС-дельта по сайту DMQD³³⁰↓N, что прерывает сигнальные пути ростовых факторов, а повышение экспрессии каталитического киназного фрагмента РКС-дельта обуславливает фенотипические изменения, связанные с апоптозом. Каспаза-3 также катализирует расщепление РКС-тета по DEV³⁵⁴↓K сайту, что блокируется в клетках, гиперэкспрессирующих BCL-x_L или белок p35 бакуловируса. Повышение экспрессии активного фрагмента РКС-тета приводит к фрагментации ДНК и фрагментации ядра.

Активация каспазы-3 сопровождается повышением активности всех протеасомных белков, а также белков – ингибиторов клеточного цикла p21^{Waf1}, p27^{Kip1}, что сопровождается остановкой в G1 фазе клеточного цикла. В свою очередь, процессы фосфорилирования/дефосфорилирования RB протеина (белка гена ретинобластомы – регулятора клеточного цикла) могут регулировать активность каспаз. Дефосфорилирование RB протеина идет параллельно с накоплением церамида и активацией каспазы-3.

Особую роль играет каспаза-3 в апоптозе опухолевых клеток. Этот процесс носит комплексный характер и регулируется многочисленными сигнальными путями. Опухолевые клетки могут избегать апоптоза путем делеции гена каспазы-3 или снижением его трансляции. Опухолевый супрессор p53 активирует каспазу-3, которая, в свою очередь, расщепляет регуляторный белок p53, MDM2, по Asp³⁶¹ с образованием фрагмента 60кДа. Комплекс p53/p60 найден во многих опухолевых клетках, что позволяет им избежать апоптоза. Субстратом каспазы-3 является протеинкиназа В/АКТ. В опухолевых клетках, дефицитных по p53, активация АКТ осуществляется интегрином α₆β₄.

Последовательность, распознаваемая интегринными при связывании лигандов при адгезии и миграции клеток, Arg-Gly-Asp (RGD), может распознаваться и связываться последовательностью Asp-Asp-Met (DDM) на регуляторных белках апоптоза. Такая последовательность имеется у каспазы-3 непосредственно около сайта расщепления большой и малой субъединиц. В физиологических условиях свободные RGD пептиды, образуемые, в частности, при ремоделировании экстраклеточного матрикса и свободно проникающие в клетку, вызывают конформационные изменения каспазы-3 и аутоактивацию. Последовательность DDM также есть у фактора Araf-1 (D²⁵⁰DV) в сайте, необходимом

для олигомеризации и активации. Все указанные факты позволяют сделать вывод о наличии уникальной сигнальной системы апоптоза, обусловленной интегринными, в которой каспазе-3 отводится инициирующая роль.

Физиологическая роль каспазы-3 состоит в регуляции развития тканей головного мозга млекопитающих в эмбриональном периоде, регуляции активности ферментов, принимающих участие в негативной селекции лимфоцитов в тимусе на стадии двойных позитивных тимоцитов, а также участие в противовирусной защите путем активации IL-16. Каспаза-3 процессирует актин в миоцитах, а также фокальные киназы клеток.

Каспаза-6 относится к подсемейству CED-3 и является основной эффекторной каспазой апоптоза наряду с каспазой-3. Ген каспазы-6 человека обладает высокой гомологией с генами каспаз-3, -2, -1 и гена Ced-3 нематоды. Альтернативный сплайсинг дает два транскрипта – альфа и бета. Альфа кодирует полномерный белок, обладающий проапоптозной активностью, бета – укороченную изоформу.

Прокаспазы-6 это цитоплазматический белок 33кДа, который активируется каспазой-3 расщеплением по Asp²³, Asp¹⁷⁹, Asp¹⁹³ с образованием активного тетрамера p18/p11. В протеолитическом каскаде каспаза-6 расщепляет PARP, а также может протеолитически активировать каспазу-3 по сайту I¹⁷²ETD↓S¹⁷⁶ между большой и малой субъединицами. Протеолиз не происходит в том случае, если Asp¹⁷⁵ заменить на Ala. Учитывая, что каспаза-6 сама является физиологическим субстратом каспазы-3, их взаимная активация создает цикл амплификации апоптозного протеолитического сигнала, что, как будет показано далее, является характерной чертой для сигнального пути апоптоза.

С активностью каспазы-6 связаны основные морфологические изменения в ядре клетки. На внутренней поверхности ядерного конверта расположены белки ламин-В, а также LAP2, LBR и другие, тесно связанные с хроматином. Каспаза-6 расщепляет ламин-В по сайту VEID↓N, также ламин-А и С и белок ядерного митотического аппарата NuMA. Каспаза-3 синергично расщепляет LAP2 и нуклеопорин Nup153. Эти действия приводят к дезорганизации хроматина и образованию кластеров из комплексов ядерных пор на мембране, что, собственно, и определяет такие морфологические изменения, как сморщивание ядра и его фрагментацию.

Каспаза-6 расщепляет ядерный белок p84N5, который, благодаря наличию в нем DD домена, способен инициировать уникальный апоптозный сигнальный путь в ядре, а также активировать каспазу-6 и амплифицировать апоптозный сигнал. Ген N5 первоначально был открыт благодаря способности p84N5 связывать аминокислотный терминальный регион RB протеина и останавливать клеточный цикл

в G2/M фазе. Повышение экспрессии p84N5 вызывает активацию фактора транскрипции NF- κ B и повышение синтеза белков Bak, Bcl-x_s, которые вызывают конформационные изменения в мембране митохондрий и выход в цитозоль цитохрома c. Далее образуется комплекс цитохром c/Araf-1, что приводит к активации каспазы-9 и запуску протеолитического каскада. Кроме того, Bak нарушает ассоциацию Araf-1 и анти-апоптозного белка семейства Bcl-2. Одной из физиологических функций каспазы-6 является ее участие в амилогенезе и ремоделировании нервной ткани у человека.

Каспаза-7 относится к эффекторным каспазам и активируется в результате действия протеолитического каскада каспаз-8, -6, -3, -9, инициированного связыванием DISC комплекса а также гранзимом В. Изоформы каспазы-7 с укороченным продоменом или его отсутствием способны сами индуцировать апоптоз в опухолевых клетках. Прокаспаза-7 представляет собой цитоплазматический белок p34, широко экспрессированный в клетках, активация которого дает активный тетрамер p20/p11.

Субстратами каспазы-7 являются многие клеточные белки, в том числе кинектин – рецептор молекулярного мотора кинезина, который вовлечен в везикулярный транспорт по микротрубочкам и в мембранное движение. Каспаза-7 также расщепляет эндотелиальный пептид, активирующий моноциты (EMAP II – endothelial monocyte activating peptide), который является провоспалительным цитокином и хемоаттрактантом для лейкоцитов, что делает каспазу-7 своеобразным мостом между воспалением и апоптозом.

Каспаза-8 относится к группе III по субстратной специфичности и существенно отличается от каспазы-1 и каспазы-3 в субстрат-связывающем регионе. Каталитическая триада каспазы-8 представляет собой Cys³⁶⁰, His³¹⁷, Arg²⁵⁸.

Прокаспаза-8 имеет большой продомен, включающий два DED домена, образующих тандем. Карбоксильно-терминальный DED потенцирует связывание молекул при споптозе. Амино-терминальный DED обладает доминантно-негативным действием на апоптоз в том случае, если связывается с другим DED доменом на каспазе-8. То есть обе DEDs работают как регуляторные последовательности при распознавании и передаче сигнала при апоптозе. С помощью DED доменов каспаза-8 связывается с белком FADD, входит в сигнальный комплекс DISC, олигомеризуется с образованием активной каспазы-8, p18/p10, инициирующей протеолитический каскад. Каспаза-8 является классической инициирующей каспазой при передаче сигналов от рецепторов Fas, TNF-R1, DR1, DR2, DR3, DR4 и DR5.

Каспаза-8 имеет множество изоформ. Экспрессия изоформы с большим продоменом важна для инициации апоптоза, тогда как изоформы с укороченными продоменами, наоборот,

обладают выраженным анти-апоптозным эффектом. Это указывает на регуляторную роль каспазы-8 в рецептор-зависимой передаче апоптозных сигналов, осуществляемую на уровне трансляции генов. Потеря экспрессии каспазы-8 при злокачественных опухолях приводит к полной резистентности к TRAIL-зависимому апоптозу. TRAIL – зависимая активация каспазы-8 показана в клетках множественной лимфомы человека, в которых каспаза-10 не экспрессируется.

Каспаза-8 может активировать фактор транскрипции NF- κ B и непосредственно взаимодействовать с серин/треониновыми киназами RIP, IKK1, IKK2 в NF- κ B – зависимом сигнальном пути.

Каспаза-10 максимально подобна каспазе-8, экспрессируется в большинстве тканей, при этом каспаза-8 и -10 имеют разные субстраты и выполняют различные роли в рецептор-зависимом апоптозе и других процессах в клетке.

Каспаза-10 состоит из 479 АК, содержит такой же активный пептапептид, как и каспаза-8, а также два домена DED в аминоконцевом регионе, активируется расщеплением по Asp³⁷² между большой и малой субъединицами.

Домены DED обеих каспаз-8 и -10 взаимодействуют с FADD, но каждая каспаза при этом формирует свой собственный сигнальный путь. FADD + cas-8 > DISC (death inducing signaling complex) > Cas-10 processing FADD/Mort1 + cas-10 > DISC

Прокаспаза-8 и прокаспаза-10 формируют фиброзные структуры в перинуклеарном регионе, локализуясь вместе с белком FADD. Для этого требуется наличие полноценного DD домена. Мутанты, у которых потеряны 20 аминокислот в продомене, теряют способность формировать эти фиброзные структуры, а также не способны связываться с DISC комплексом. Однако накопление большого числа прокаспаз-8 и -10 действует как доминантно-негативный фактор в регуляции апоптоза.

Несмотря на довольно слабую экспрессию каспазы-10 на клетках нервной ткани в нормальном состоянии, показана повышенная активность каспазы-10 при ишемии клеток гиппокампа. При этом каспаза-10 локализуется вместе с белком FADD и каспазой-3.

Важная роль каспазы показана при развитии аутопролиферативного синдрома и анемии при миеломе. Повышенная экспрессия каспазы-10 характерна для клеток иммунной системы, в частности, при активационно-индуцированном апоптозе лимфоцитов.

Альтернативный сплайсинг гена каспазы-10 дает, как минимум, 4 изоформы – *a*, *b*, *c*, *d*, все они участвуют в апоптозе. Изоформа *c* – это укороченный изомер, но способный формировать перинуклеарные фиброзные структуры, играет специфическую роль в TNF- зависимом апоптозе. Изоформа *d* представляет собой гибрид, у которого малая субъединица от

изоформы **a**, а остальная часть – от **b**, и, соответственно, несколько снижена активность в апоптозе. Все эти изоформы регулируют процессы эмбрионального развития.

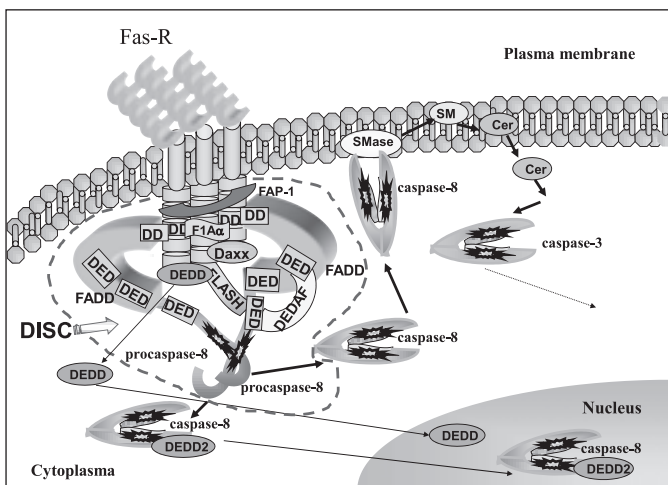


Рисунок 4.
Схема передачи сигнала от рецептора Fas/CD95 семейства TNF. В так называемый DISC комплекс входят белки, фосфорилирование которых позволяет передавать сигнал апоптоза от рецептора на белки цитозоля и далее на факторы транскрипции и в ядро клетки.

Участие каспаз в рецептор-зависимых сигнальных путях апоптоза.

Передача сигналов апоптоза от рецепторов на плазматической мембране представляет собой комплекс событий, в которых можно выделить общие ключевые моменты для всех рецепторов. Апоптоз инициируется при распознавании рецепторов семейства фактора некроза опухолей (Tumor Necrosis Factor – TNF), трансформирующего ростового фактора (TGF-b), так называемых рецепторов смерти (Death receptors) DR1, DR2, DR3, DR4, DR5, а также TRAIL-R2 и другие. Для рецепторов DR5 (?) показана p53-зависимая индукция при выходе клетки в апоптоз (рис 5, 6, 7).

К рецепторам семейства TNF относятся: четыре рецептора TNF-α, рецепторы TNF-β, CD40, CD30, CD27, CD95/Fas/APO-1, рецептор R75^{low} фактора роста нервов и другие. Все эти гликопротеины имеют высокую гомологию в экстраклеточных лиганд-связывающих доменах, а также в цитоплазматических участках (так называемые «домены смерти»).

В рецептор-зависимых типах апоптоза можно выделить несколько общих сигнальных последовательностей, таких как «death domain» DD, «death effector domain» DED, and «caspase associated recruitment domain» CARD.

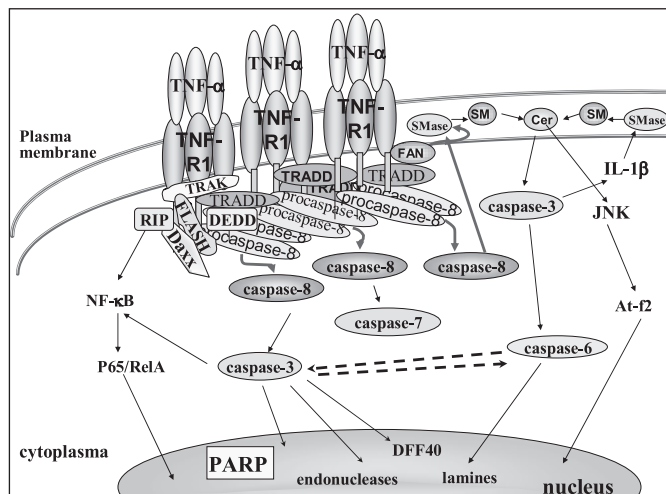


Рисунок 5.
Схема передачи сигнала апоптоза от рецептора TNF.

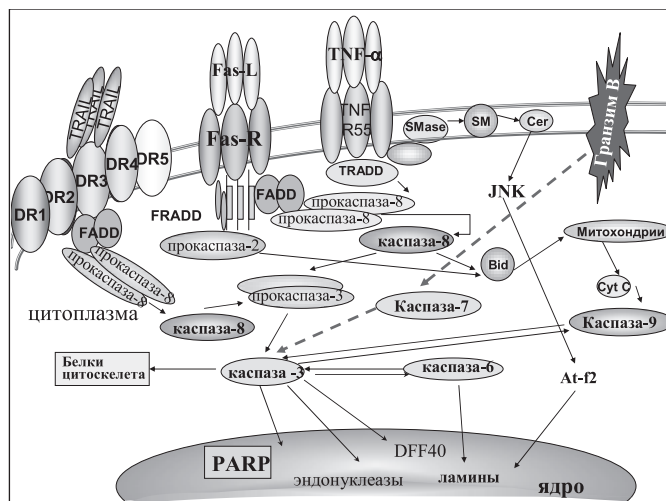


Рисунок 6.
Схема активации каспаз при связывании рецепторов апоптоза.

Сигнал к апоптозу проводится через протеины TRADD, FADD/MORT-1, RIP, содержащие «домены смерти», а также адаптерные белки TRAF, DAXX и ядерный фактор транскрипции NF-kB. Мембранно-проксимальная часть цитоплазматического домена R1 рецептора TNF связана с p52 киназой TRAK, которая фосфорилирует рецептор R1.

TNF-α является многофункциональным регуляторным цитокином иммунной системы. Связывание R55 рецептора TNF-α сопряжено с несколькими сигнальными путями. Наиболее ранний сигнал определяется фосфорилированием белка FAN, связывающего участок цитоплазматического домена R55 рецептора и нейтральной (n) -SMase. В каскаде сигналов принимают участие PTK 50kDa (PK50), 35kDa (HR35).

Активация каспаз связана с активностью фактора некроза опухолей и его рецепторами. Дефицит TNF-α сопровож-

дается замедлением или ослаблением синтеза мРНК каспаз, тогда как нокаут рецепторов p55 и p57 TNF- α сопровождается повышением экспрессии каспазы-1, -2, -7, -11 и -14.

Роль лизосом и лизосомных протеиназ в апоптозе

Лизосомы – окруженные однослойной мембраной клеточные органеллы с низким рН (4,5–5,0), содержащие набор кислых гидролаз. Лизосомы полиморфны, имеют различную форму и диаметр, обнаружены во всех клетках эукариот (кроме эритроцитов), у низших эукариот и растений они называются вакуолями.

В лизосомах содержатся все основные классы гидролаз – протеазы, липазы, карбогидразы, нуклеазы, фосфатазы, арилсульфатазы, катализирующие расщепление соответствующих субстратов. Основной функцией лизосом считается переваривание кислыми гидролазами поврежденных органелл, вирусов, бактерий и крупных макромолекул. Также известно, что лизосомные ферменты необходимы для проведения сигналов апоптоза, в частности, сопряженного с эндоплазматическим ретикулумом (ЭР). Апоптоз, начинающийся в ЭР, требует активации катепсинов в сигнальных путях, поддерживаемых каспазами.

В последнее время накопилось достаточно данных, чтобы обсуждать еще одну функцию лизосом, а именно, формирование собственного типа апоптоза, в котором каспазы не принимают участие, а их сигнальная роль осуществляется кислыми лизосомными гидролазами – катепсинами. Таким образом, в зависимости от компартмента клетки, где появляется первоначальный сигнал, в настоящее время выделяют четыре типа апоптоза:

- рецептор – зависимый,
- митохондриальный,
- апоптоз, связанный с эндоплазматическим ретикулумом,
- лизосомно-зависимый.

Вновь образованные лизосомы называются **первичными** или **ранними**, они не участвуют в гидролизе или другой активности в клетке. Матрикс первичных лизосом гомогенный, содержит ассоциированные с ним ферменты. Все остальные лизосомы называются **вторичными** или **поздними**, их матрикс содержит включения – пищевые, резидентные, аутофагические, и другие вакуоли. Поздние лизосомы содержат много везикул и часто называются мультивезикулярными тельцами, они обогащены холестерином. Транспорт белков к лизосомам идет по эндоцитозным путям через ранние и поздние эндосомы. Слияние везикул, а также поздних эндосом и лизосом, происходит в эндосомальных компартментах.

Встраивание кислых гидролаз в лизосомы. Для того чтобы вновь синтезированные кислые гидролазы появились в лизосомах, требуется наличие нескольких факторов. Во-первых, синтезированные в эндоплазматическом рети-

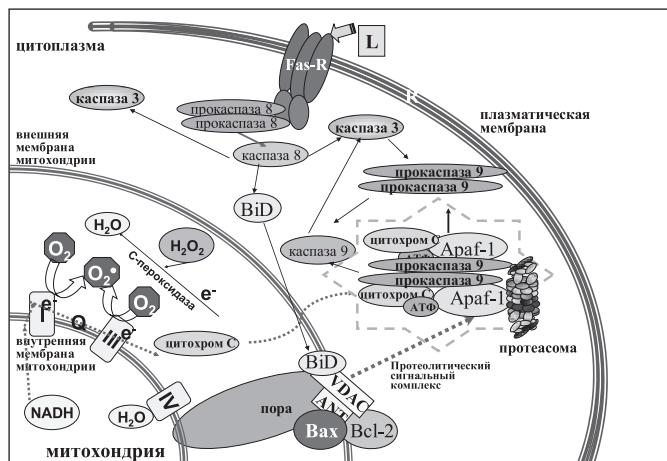


Рисунок 7. Схема активации каспазы-9 в комплексе с белками митохондрий при развитии апоптоза.

куле ферменты должны попасть в комплекс Гольджи, где происходит сортировка на основании наличия маннозо-6-фосфатного остатка (M-6-P). Наличие M-6-P является сигналом для селективного транспорта через *trans*-Гольджи сеть в поздние эндосомы/лизосомы. M-6-P-зависимая сортировка лизосомных проферментов обнаружена внутри *trans*-Гольджи сети и продолжается при необходимости в незрелых секреторных гранулах. Лизосомные проферменты, которые неудачно были отсортированы в обоих сайтах, остаются в зрелых секреторных гранулах.

Мембраны лизосом. Лизосомы окружены однослойной мембраной. Для выхода катепсинов в цитозоль необходимым условием является пермеабилзация или дестабилизация мембраны лизосом. Повышение проницаемости мембраны лизосом вызывают:

- лизосомотрофные агенты (нарушение метаболизма аминокислот, окислительное деаминарование спермина аминоксидазами и т.д.)
- реактивные метаболиты кислорода,
- сигналы от рецепторов апоптоза (TNF-R1) и т.д.

Градиент рН в мембране лизосом поддерживается за счет активной протонной помпы – вакуолярной АТФ-азы, а также каналов для ионов хлора. Неспецифические моновалентные катионные каналы лизосом (TRP-ML-1) образуются белком муколипином, который участвует в транспорте липидов в лизосомы. Ионы водорода создают кислое микроокружение, оптимальное для активности лизосомных гидролаз. Обмен ионов Na⁺/H⁺ в мембране эндосом нужен для формирования мультивезикулярных поздних эндосом и сортировки белков в везикулы. Обмен и деградация белка TRP-ML-1 регулируется катепсином В. С каналами TRP-ML-1 ассоциированы NAADP (Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate) -зависимые кальциевые каналы.

Кальций регулирует многие процессы в лизосомах, в частности, слияние и конденсацию содержимого лизосом.

Везикулярные ААА АТФ-азы (V-ATPase) необходимы для везикулярного транспорта, так как закисление в отделах эндосом требуется для взаимодействия рецепторов и лигандов, а также для диссоциации рецепторов от лизосомных ферментов. V-ATPase регулируют градиент pH между везикулярными мембранами, pH внутри везикул, создает градиент pH между цитозолем и кислыми компартментами клетки, а также передают сигналы на цитозольную сторону мембран. Альфа-субъединица V-ATPase выполняет сенсорную функцию, показано pH-зависимое конформационное изменение α -субъединицы и дальнейшее взаимодействие с цитозольными малыми GTPases.

Структура и классификация катепсинов. Катепсины -гликопротеины, синтезируемые в комплексе Гольджи в виде неактивного профермента – зимогена, состоящего из 2-х доменов: продомена, или -N-концевого полипептида; большой субъединицы; малой субъединицы и связывающего региона между субъединицами. Активные зрелые катепсины состоят из двух доменов, активный центр находится в углублении между доменами. Субстрат связывается в линейной конфигурации вдоль щели активного центра. Каталитический Cys²⁵ находится на N-конце центральной α -спирали, образуя ионную пару с His¹⁵⁹ в β -цилиндрическом домене с противоположной стороны активного центра. Активная пара Cys²⁵/His¹⁵⁹ составляет тиолат-имидазолий.

Катепсины подразделяются на L-подобные (L, V, K, S, H), F-подобные (F, W) и B-подобные (B, X), отличаются строением консервативной последовательности и длиной пропептида. B-подобные катепсины содержат консервативную последовательность GNFD. L-подобные катепсины содержат две консервативные последовательности – ERF/MIN и GNFD.

Катепсины выполняют многочисленные физиологические функции в клетке, в том числе, принимают участие в процессинге пропептидов в гормоны, в презентации антигена. В экстраклеточном матриксе катепсины участвуют в remodelировании тканей, в заживлении ран. Катепсины B, H и L участвуют в апоптозе пирамидальных нейронов.

Катепсин В – фермент группы папаина, синтезируется в виде неактивного зимогена, конвертирующегося в зрелую форму – катепсин В (ЕС 3.4.22.1), которая может долго не секретироваться.

In vitro аутоактивация катепсина В – это бимолекулярный процесс, проходящий при pH 4,5, in vivo в ней участвуют гликозаминогликаны, что позволяет процессу проходить при pH 6,5. Скорость аутокаталитического превращения прокатепсина В в катепсин В коррелирует с аффинностью фермента к пропептиду, а не с его каталитической активностью, что указывает на влияние стабильности закуривающей

петли на скорость процессинга. При исследовании кристаллической структуры прокатепсина В обнаружено, что поверхность активного сайта каталитического домена недоступна для субстрата. В зрелой форме катепсина В регион в закуривающей петле между Cys¹⁰⁸ и Cys¹¹⁹ легко изменяется в зависимости от окружения, что соответствует свойству катепсина В как карбоксипептидазы. Регион между Cys¹⁰⁸ и Cys¹¹⁹ одинаков для профермента и зрелой формы, тогда как регион между Cys¹¹⁹ и Thr¹²⁹ различается.

В клетках эпителия легких бактериальный липополисахарид инициирует сигнальный путь апоптоза, зависимый от катепсина В, блокируемый ингибиторами катепсинов. B. Этот тип апоптоза сопровождается выходом из митохондрий цитохрома c и фактора AIF, который перемещается в ядро. Белок hSB1 (человеческий гомолог SETA-связывающего протеина-1) регулирует активность катепсина В: повышение экспрессии hSB1 приводит к связыванию катепсина В и препятствует его выходу из лизосом. Каспазы-11 и -1 процессирует катепсин В, который далее катализирует распад ядра клетки.

Катепсин D участвует в Fas-зависимом апоптозе, он активирует каспазу-11, а также другие провоспалительные каспазы. Аутокаталитический протеолиз приводит к формированию двух изоформ, p48 и p32, активного катепсина D (КФ 3.4.23.5) [Heinrich et al., 1999]. Катепсин D участвует в сигнальном пути апоптоза в макрофагах, инфицированных *E.coli*. В этом принимает участие каспазы-9, -3 и -7 независимо от выхода цитохрома c в цитозоль. Синтез и секреция катепсина D регулируется двумя сигнальными путями. Ключевой момент, обуславливающий этот процесс -повышение экспрессии рецептора инсулиноподобного ростового фактора и маннозо-6-фосфата (IGP-II/M-6-P) в комплексе Гольджи. Апоптоз, вызванный глюкозаминсульфатом, сопровождается активацией катепсина D, который расщепляет BCL-XL (но не Bcl-2, Bax или Bid).

Катепсин К (КФ 3.4.22.38) имеет высокую степень гомологии первичной последовательности с катепсинами S, L, В. Среди других цистеиновых протеаз катепсин К имеет уникальное предпочтение для пролиновых остатков в P2 регионе субстрата. Субстратами катепсина К являются: коллаген I и II типа, остеонектин. Это позволяет катепсину К участвовать в remodelировании тканей.

В остеокластах человека катепсин К синтезируется как зимоген, активируется при низких pH. Активация прокатепсина К человека (38 кДа) происходит спонтанно при pH 4,0 и катализируется экзогенным зрелым катепсином К. В результате расщепления по Glu¹⁹, Ser⁹⁸ и Glu¹¹⁰ образуются три интермедиата. Природный фермент состоит из смеси ферментов, на N-концах которых имеется Gly¹¹³, Arg¹¹⁴, Ala¹¹⁵. Соотношение изотипов зависит от сигналов активации. Из 8 цистеинов 6 имеют дисульфидные связи,

на С-конце содержится Met³²⁹.

Активация прокатепсина К *in vitro* идет как аутокаталитический процесс. Аутопротеолиз N-концевого пропептида (99 а.к.о.) приводит к образованию активного зрелого катепсина К. В кристаллической структуре катепсина К часть профермента занимает активный сайт, который располагается в щели между изогнутыми доменами. Между пропептидом и зрелым катепсином К обнаружены гидрофобные взаимодействия и водородные связи, что объясняет стабильность профермента: часть пропептида ингибирована и активируется только при необходимости.

Катепсин К играет ключевую роль в апоптозе и старении остеокластов. При нокауте гена катепсина К (*catK*^{-/-}) теряется способность клеток к апоптозу и старению и повышается пролиферация клеток. Повышение экспрессии катепсина К в преостеокластах приводит к преждевременному старению, повышает экспрессию генов – опухолевых супрессоров p19, p53, p21.

Кальпаины, наряду с каспазами, являются медиаторами апоптоза, их эффект наиболее выражен при индукции апоптоза перекисью водорода. Несмотря на различие в сайтах связывания ферментов, большое число белков обладают двойной специфичностью к действию каспаз и кальпаинов. Это касается альфа- и бета-фодрина, кальмодулин-зависимой протеинкиназы, АДФ-рибозил-трансферазы. Кальпастатин также чувствителен к действию каспаз. В клетках медуллобластомы человека Д283 имеется дефект митохондриального окисления, и при этих обстоятельствах экзогенный С2-церамид вызывает типичные апоптотические нарушения, ассоциированные с активацией кальпаина, причем независимо от митохондриального дыхания.

Участие эластазы лейкоцитов в апоптозе

Одной из причин начала апоптоза является окислительный стресс, который обуславливает активацию протеолитической активности полиморфноядерных лейкоцитов, стимулируя секрецию протеаз, деградирующих белковые субстраты. Протеазы нейтрофилов, высвобождаемые из азурофильных гранул при окислительном стрессе, принимают участие в апоптозе клеток крови. Одной из таких протеаз является эластаза.

Эластаза лейкоцитов индуцирует апоптоз эпителиальных клеток легких путем изменения проницаемости митохондрий и регуляции энергезависимых путей в клетке, сопряженных с Akt. При остром воспалении активность протеолитических ферментов нейтрофилов приводит к повреждению тканей легкого и нарушению его функциональной активности.

На ранних этапах созревания полиморфноядерных лейкоцитов эластаза находится в виде профермента в течение ~90 часов, затем активируется и находится в гранулах уже в виде активного фермента. В физиологических условиях

эластаза участвует в деградации фибриллярных белков при фагоцитозе микроорганизмов, в расщеплении чужеродных и аномальных структур. В плазме крови эластаза расщепляет целый спектр белков.

При активации лейкоцитов эластаза высвобождается в плазму крови и, проникая в клетки, взаимодействует с PAR-1, активирует его, снижает уровень фосфорилирования протеинкиназы В/Akt, передающей сигналы факторов выживания в клетке.

Основным ингибитором эластазы в плазме крови является α 1-протеиназный ингибитор (α 1-ПИ), который ранее назывался α 1-антитрипсином. Ингибитор α 1-ПИ предотвращает деструктивные эффекты эластазы, например, её влияние на клетки эндотелия и эпителия легочных альвеол, что имеет значение в патогенезе эмфиземы легких. Есть все основания полагать, что нарушение баланса между активностью эластазы и активностью её ингибитора α 1-ПИ является критическим фактором в развитии индуцированного апоптоза путем вовлечения сигнального пути PAR-1 и ослабления сигнальных путей выживания клетки, подавляющих сигналы апоптоза.

Одна из функций эластазы при воспалительных заболеваниях в различных органах, в частности, при воспалении легких, связана не только с деструкцией тканевых белков, в том числе эластиновой выстилки альвеол, но и с разрушением эпителиальных и эндотелиальных клеток. Лейкоцитарная эластаза инициирует апоптоз эпителиальных клеток, в основе которого лежат нарушения в митохондриях – повышение проницаемости мембран митохондрий, падение мембранного потенциала дельта пси мю, а также активация сигнального пути протеинкиназы В/Akt.

При остром воспалении легких повреждения клеток эпителия, вызванные накоплением нейтрофилов в очаге воспаления и синтезом ими протеолитических ферментов, могут приводить к нарушению функциональной активности легких. Одним из механизмов апоптоза в клетках эпителия является активация специфического протеазо-активированного рецептора PAR-1. Сигнальные пути, сопряженные с PAR-1, включают JASK/STAT сигнальный путь, ERK-1/2, ГТФазы RhoA и другие, а также несколько белков семейства Bcl-2. Рецепторы PAR-1 регулируют как апоптоз, так и выживание клеток эпителия, что зависит от дополнительных сигналов, в частности, агонистов тромбина, или активации сигнальных путей ростовых факторов. Рецепторы PAR-1 экспрессируются на клетках эндотелия, эпителия, на фибробластах и нейтрональных клетках.

Накопление нейтрофилов в очаге воспаления координируется интерлейкином IL-17, который регулирует синтез и секрецию миелопероксидазы и эластазы нейтрофилами, усиливает фагоцитоз старых нейтрофильных гранулоцитов

макрофагами. Ингибиторы эластазы подавляют секрецию TNF- α и замедляют или прерывают развитие каспазо-зависимого апоптоза нейтрофилов. Эластаза может работать в паре с миелопероксидазой и протеиназой-3, а также инициировать апоптоз в клетках эндотелия сосудов после их контакта с миелопероксидазой. Секреция активированными нейтрофилами эластазы и протеиназы-3 резко усиливается после контакта клеток с антителами к нейтрофилам, что приводит к накоплению протеолитических ферментов в экстраклеточном матриксе и развитию васкулитов, как локальных, так и системных.

Синдром острого респираторного стресса (ОРДС) в настоящее время получает все большее распространение в связи с ухудшающимися условиями окружающей среды и аллергизацией населения. В основе патогенеза ОРДС лежит взаимодействие нескольких факторов, в том числе накопление в тканях легких нейтрофилов, синтезирующих провоспалительные цитокины (TNF- α , IL-1b, IL-13), которые инициируют апоптоз в клетках эндотелия и эпителия легких за счет активации специфических рецепторов. Сигнальные пути апоптоза включают PI3-киназу, фактор транскрипции NF-kB и другие.

Эластаза лейкоцитов принимает участие в повреждении легочной ткани при эмфиземе легких, ОРДС, обструктивном бронхите, хронической легочной недостаточности. Основной причиной протеолитического повреждения клеток и тканей является накопление нейтрофилов в очаге воспаления, их активация и повышенная секреция как провоспалительных цитокинов, так и протеолитических ферментов, в том числе эластазы. Нарушение баланса между концентрацией эластазы и её ингибитором α 1-ПИ является пусковым механизмом, способствующим проявлению проапоптотической активности эластазы, активации PAR-1 и индукции сигнальных путей апоптоза в клетках.

Заключение

Механизм и функциональная активность генетически-детерминированной гибели клеток, обозначаемой термином апоптоз, привлекает особое внимание исследователей и специалистов, работающих в практическом здравоохранении. Это связано, прежде всего, с огромными возможностями, которые дает изучение апоптоза для ранней диагностики целого ряда заболеваний, а также для прогноза течения хронической патологии. В настоящее время накоплен большой объем информации, касающейся фундаментальных основ жизнедеятельности клетки, в том числе окончания её жизненного цикла. Кроме полярных типов гибели клетки путем некроза или апоптоза, принципиально различающихся потреблением энергии, обменом белков и экспрессией генов, существуют другие виды завершения жизни клетки, в частности, аутофагия.

Развитие апоптоза в клетке является сложным и многофакторным процессом. Среди программ апоптоза обнаружено многообразие, касающееся, прежде всего, участия протеиназ различных классов в сигнальных путях и морфологических изменениях в клетке. Для физиологического окончания жизненного цикла клеток такое разнообразие программ апоптоза обусловлено разнообразием самих клеток организма и различными путями регуляции их функций. В связи с этим для обновления клеток должна работать хорошо скоординированная система передачи генетической информации, контролирующей апоптоз. Нарушения в регуляторных механизмах этой программы приводят к развитию множества заболеваний, в том числе онкологических, аутоиммунных, нейродегенеративных и других.

Крайне важным является правильное понимание различий между апоптозом и некрозом клеток, несмотря на то, что оба эти процесса могут происходить в тканях одновременно. Прогноз течения заболевания, при котором преимущественно повышается уровень апоптоза, будет отличаться от прогноза патологий с преимущественным развитием некроза именно в связи с принципиальным различием в механизмах этих процессов, также должны различаться подходы к лечению данных заболеваний. В связи с этим важно включение в перечень лабораторных диагностических тестов оценку состояния жизнеспособности клеток, механизма их обновления или гибели путем апоптоза или некроза. Наиболее значима подобная диагностика для клеток крови.

Проточная цитометрия – это один из наиболее адекватных методов оценки молекулярных изменений, происходящих при апоптозе клеток, так как позволяет одновременно определять фенотип, структурные изменения, экспрессию внутриклеточных белков, статус хроматина и ДНК, а также механизм гибели индивидуальной клетки и её положение в клеточном цикле на момент исследования.

Простые методы фиксации и пермеабиллизации клеток дают возможность окрасить их антителами к внутриклеточным белкам и ДНК-связующим красителям одновременно с антителами к структурным компонентам клетки. Кроме того, одновременно исследуются оптические свойства самой клетки, её размер, гранулярность, гладкость или шероховатость плазматической мембраны, что обуславливает распределение клеток в системе координат прямого и бокового рассеяния лазера.

Современные приборы для проточной цитометрии оснащены тремя или четырьмя лазерами, имеют стабильную систему прохождения потока суспензии клеток, надежную оптику и каналы регистрации флуоресценции. Это позволяет регистрировать наномолекулярные различия в размере клеток, их структуре, интенсивности флуоресценции красителей, одновременно определять более 8 показателей.*

* Список литературы находится в редакции