

УДК 577.24, 577.29

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ КАСПАЗА-ЗАВИСИМОГО И МИТОХОНДРИАЛЬНОГО АПОПТОЗА: РОЛЬ В РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИИ И В ПРОЦЕССАХ КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ

© 2018 г. А. С. Дятлова^{1,2}, А. В. Дудков², Н. С. Линькова^{1,2}, В. Х. Хавинсон^{2,3,*}

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Россия

²Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Россия

³Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: khavinson@gerontology.ru

Поступила в редакцию 05.08.2017 г.

Обобщены данные о молекулярных механизмах апоптоза в норме и при патологии. Выделяют три фазы апоптоза: сигнальную, эффекторную и деградационную. Сигнальная фаза апоптоза представлена внешним (каспаза-зависимым) и собственным (митохондриальным) путями. Молекулярные маркеры внешнего и собственного путей апоптоза имеют определяющее значение для диагностики и поиска методов лечения патологии иммунной, бронхолегочной, выделительной, сердечно-сосудистой систем, при онкологических заболеваниях и старении организма. В качестве молекулярных маркеров каспаза-зависимого апоптоза в обзоре рассматриваются иницирующие каспазы-8, -9 и эффекторная каспаза-3. Маркерами митохондриального, или каспаза-независимого, пути являются белки p53, p21, p16, реагирующие на повреждения ДНК и участвующие в клеточном старении, белок-шаперон прохибитин и флавопротеин AIF.

Ключевые слова: каспаза-зависимый апоптоз, митохондриальный апоптоз, клеточное старение, молекулярные маркеры.

DOI: 10.7868/S0042132418020023

ВВЕДЕНИЕ

Современный этап развития медицины характеризуется изучением механизмов возникновения патологических процессов на молекулярном уровне. В частности, активно исследуется феномен апоптоза – запрограммированной клеточной гибели. Несмотря на большое количество исследований молекулярных механизмов апоптоза, до конца остаются невыясненными аспекты связи между нарушениями апоптотических процессов и возникновением большинства заболеваний, в том числе, онкологических (Рыжов, Новиков, 2002).

Впервые понятие апоптоза было выдвинуто в 1972 г. и обозначало “нормальную клеточную гибель при развитии тканей и их обновлении в зрелом организме” (Kerr et al., 1972, p. 239). Важно в этом определении то, что апоптоз является нормальным физиологическим процессом.

Апоптоз играет важную роль в морфогенетических процессах и регуляции численности клеток в течение онтогенеза многоклеточного организма.

Запуск апоптотических процессов происходит при различных патологических состояниях и приводит к гибели клеток, выживание которых нежелательно для организма (Рыжов, Новиков, 2002), а также при старении. Апоптоз включает в себя 3 фазы: сигнальную (индукторную), эффекторную, деградационную (фазу деструкции) (Барышников, Шишкин, 2002).

Сигнальная фаза апоптоза может быть реализована посредством двух путей апоптоза: внешнего (с участием рецепторов клеточной гибели – каспаза-зависимый путь, рис. 1) и собственного (с участием митохондрий, рис. 2).

В случае внешнего пути сигналом к началу апоптотических реакций является гипоксия, поражения физическими или химическими агентами, нарушения сигналинга клеточного цикла и т.д. Апоптоз с участием рецепторов клеточной гибели характерен для функционирования иммунной системы (Льюин, 2011).

Рецепторы клеточной гибели относятся к суперсемейству рецепторов фактора некроза опухолей

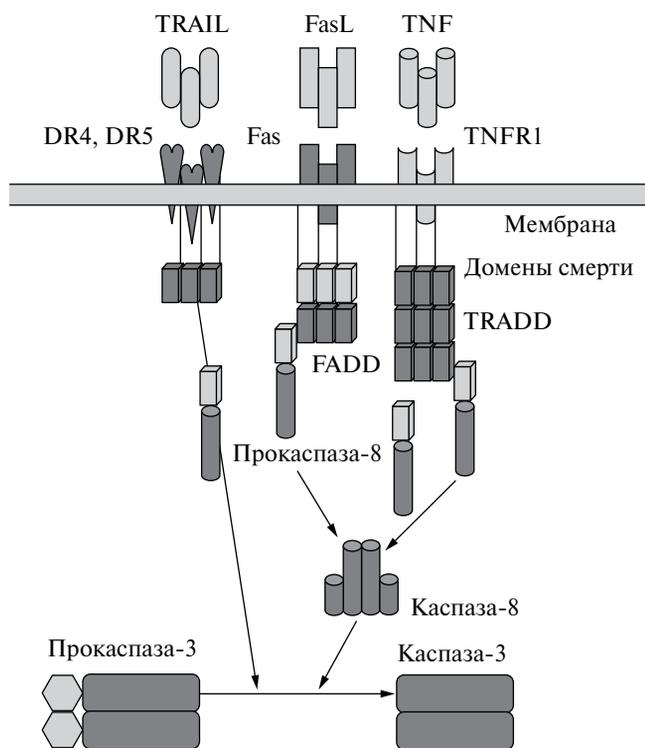


Рис. 1. Рецепторный (внешний) механизм запуска апоптоза (по Льюин, 2011, с модификациями, здесь и на рис. 2).

TNFR (tumor necrosis factor receptor) и включают в себя рецепторы типа Fas (CD95, APO-1), TNFR1 (p55, CD120A) и дополнительные рецепторы CAR1, DR3, DR4, DR5 (Гордеева и др., 2004). Все перечисленные рецепторы являются трансмембранными белками, внеклеточный домен которых взаимодействует с соответствующим лигандом – экстрацеллюлярным белком смерти (FasL – для рецептора Fas, TNF – для рецептора TNFR1 и т.д.), а цитоплазматический домен представляет собой последовательность из 80 аминокислотных остатков, называемую доменом смерти DD (death domain). В апоптотическом каскаде принимает участие внутриклеточный адаптер, специфичный для каждого типа рецепторов. Так, для рецепторов типа Fas адаптером является белок, взаимодействующий с доменом смерти Fas-рецептора FADD (Fas-associated DD-protein) (Самуилов и др., 2000).

Процесс апоптоза запускается в момент взаимодействия специфического рецептора и его лиганда. Лиганд вступает во взаимодействие с внеклеточным доменом рецептора клеточной гибели, рецептор активизируется и изменяет конформацию внутриклеточного домена так, что адаптер взаимодействует с эффекторами (Гордеева и др., 2004). Эффекторами являются прокаспазы – неактивные предшественники иницирующих каспаз. В результате взаимодействия лиганда, рецептора, адаптера и прокаспаз

формируются апоптосомы – индуцирующие клеточную смерть комплексы DISC (death inducing signalling complex), в которых происходит аутолитическая активация каспаз (Creagh, 2014). посредством рецепторов клеточной гибели могут быть активированы иницирующие каспазы -2, -8, -10. Эти каспазы далее участвуют в активации эффекторной каспазы-3 (Льюин, 2011).

Митохондриальный путь передачи апоптотического сигнала инициируется повреждением ДНК или воздействием цитотоксических агентов, что активирует белок p53, называемый также стражем генома. Важнейшим эффектом активированного p53 является увеличение активности белков семейства Bcl-2 – ключевых регуляторов проницаемости наружной мембраны митохондрий MOMP (mitochondrial outer membrane permeabilization) (Варга, Рябков, 2006). При запуске апоптоза по митохондриальному пути MOMP повышается и из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль высвобождаются растворимые белки, участвующие в апоптозе: цитохром c, прокаспазы -2, -3, -9, фактор, индуцирующий апоптоз, – белок AIF (apoptosis inducing factor). Далее, аналогично цепи реакций во внешнем пути передачи сигнала, с участием цитохрома c формируется апоптосома, в которой происходит активация иницирующей каспазы-9. Активная каспаза-9 взаимодействует с эффекторной прокаспазой-3, активирует ее, запускается каспазный каскад для реализации дальнейших реакций эффекторной фазы апоптоза (Льюин, 2011). Белок AIF является основным эффектором собственного пути апоптоза и индуцирует апоптотические реакции независимо от каспаз, из-за чего данный путь апоптоза также иногда называют каспаза-независимым (Susin et al., 1999).

Сходство двух путей в том, что каждый из них включает в себя этап активации иницирующей каспазы с последующей активацией эффекторных каспаз. Оба пути апоптоза приводят к фрагментации ДНК и ядра, образованию апоптотических телец и их быстрому фагоцитозу (Потапнев, 2014).

Эффекторная фаза заключается в запуске каспазного каскада – основного эффектора апоптоза, представляющего собой взаимодействие иницирующих и эффекторных каспаз, в результате приводящее к разрушению клеточных структур (разрушение цитоскелета, расщепление адгезивных белков, гидролиз ядерной ламины).

Деградиционная фаза заключается в морфологических и биохимических изменениях клетки, приводящих к формированию апоптотических телец и к их последующему фагоцитозу (Голубев и др., 2006).

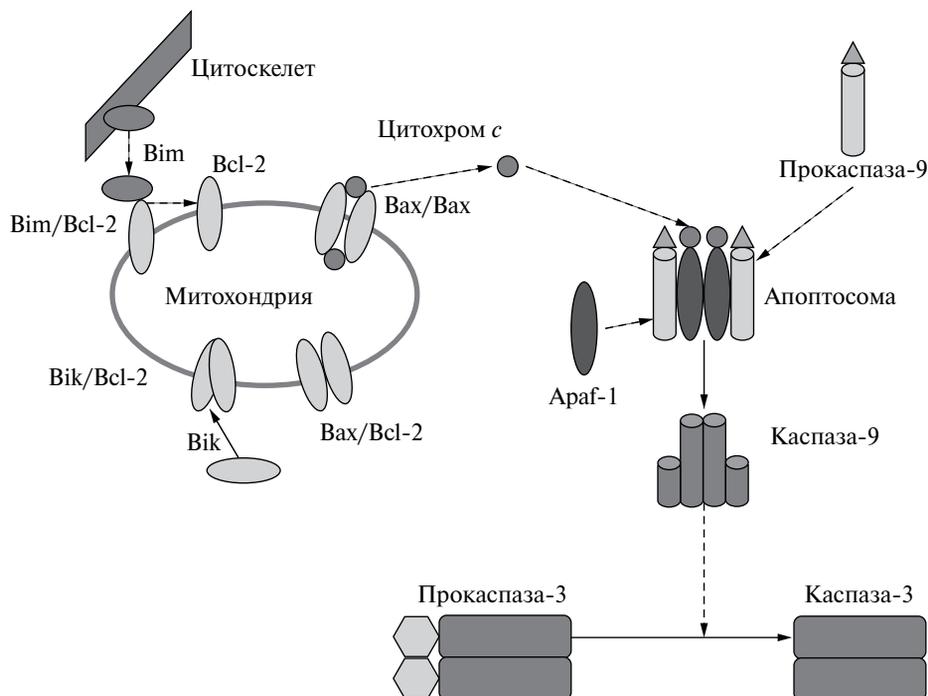


Рис. 2. Митохондриальный (собственный) механизм запуска апоптоза.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Уровень экспрессии тех или иных молекул, участвующих в апоптозе, изменяется при патологии и старении организма, что дает возможность использовать их в качестве молекулярных маркеров различных заболеваний. Так, маркер p53 используется для диагностики онкологических заболеваний и клеточного старения, каспаза-3 – для изучения заболеваний сердечно-сосудистой системы. Иницирующие каспазы -8, -9 – маркеры апоптотической активности лимфоидных клеток, а проингибитор и флавопротеин AIF целесообразно использовать для диагностики почечной недостаточности.

Каспазы -3, -8, -9: роль в иммунопатологии, онкогенезе, эндотелиальной дисфункции, патологии бронхолегочной и выделительной систем

Каспазы – семейство эволюционно консервативных цистеиновых протеаз, расщепляющих пептидные связи, образованные с участием аспарагиновой кислоты. Различают иницирующие и эффекторные каспазы. К первым относятся каспазы -8, -9, -10, -12. После активации они воздействуют на эффекторные каспазы -3, -6, -7, -14 (Широкова, 2007).

В клетке каспазы присутствуют в форме неактивных мономерных предшественников, для активации которых требуется расщепление проэнзима и последующая димеризация. Механизмы сборки различных каспаз отличаются между собой и зависят от типа белка-адаптера, с которым взаимодействует прокаспаса (McIlwain et al., 2013).

Каспазы способны активировать друг друга, образуя каспазный каскад. Как было описано выше, каспазный каскад может инициироваться двумя различными путями. В первом случае клетка получает внешний сигнал от плазмолеммы, и в качестве иницирующих каспаз выступают каспазы -8, -10. Во втором случае сигналом является повреждение ДНК, и в роли иницирующей каспазы выступает каспаза-9. Но по какому бы пути ни запускался каскад, его эффекторной каспазой является каспаза-3 (Майборода, 2013).

Каспаза-8 – классическая иницирующая каспаза при передаче сигнала от всех типов рецепторов клеточной гибели (Мартынова, 2003). Формирование апоптосомы FasL–Fas–FADD–прокаспаса-8 вызывает аутокаталитическую активацию каспазы-8 (Самуилов и др., 2000). Активированная каспаза-8 может инициировать апоптоз двумя путями. Первый из них – непосредственная активация эффекторной каспазы-3. Второй путь – обходной – запускается, если уровень каспазы-8 в апоптосоме недостаточен для активации каспазы-3. В этом случае

каспаза-8 расщепляет белок Bid семейства Bcl-2, что приводит к высвобождению из митохондрий цитохрома c и к запуску митохондриального пути апоптоза (Варга, Рябков, 2006). Таким образом, белок Bid является связующим звеном между внешним и собственным путями передачи апоптотического сигнала (рис. 3).

Показана ключевая роль каспазы-8 в формировании иммунитета в процессе исследования линии трансгенных мышей, содержащих мутацию в гене *CASP8*, приводящую к деактивации каспазы-8 (Salmena et al., 2003). Мутация была ограничена популяцией Т-клеток. У исследуемых мышей наблюдалось уменьшение количества периферических Т-лимфоцитов по сравнению с контрольной группой и нарушение реакции Т-клеток на стимулы активации, что приводило к формированию иммунодефицитных состояний.

Показано участие инициирующих каспаз -8, -9 и эффекторной каспазы-3 в ганглиозид-опосредованном апоптозе Т-лимфоцитов. GBM-ганглиозид вызывает активацию инициирующих каспаз -8, -9 и эффекторной каспазы-3 в Т-клетках, индуцируя апоптотические процессы. При этом ингибиторы каспаз -8, -9 показали эффективность при блокировании апоптоза, в 60% случаев снизив его активность (Mahata et al., 2015).

В бронхиальном эпителии при взаимодействии иммуностимулятора poly I:C (polyinosinic:polycytidylic acid – полицитидиловая

кислота, используется в качестве имитатора вирусных инфекций) с toll-подобным рецептором наблюдается активация апоптотического процесса путем индукции активности каспазы-8 (Koizumi et al., 2016). В то же время, по данным исследований влияния сигаретного дыма на апоптотические процессы бронхиального эпителия, ингибиторы каспаз -3, -9 не способны предотвращать апоптоз в бронхиальной ткани, что свидетельствует о второстепенной роли этих молекул в гибели клеток, индуцированной влиянием такого апоптотического сигнала, как сигаретный дым (Bucchieri et al., 2015). Однако имеются данные о том, что аэроаллерген Der p2, продуцируемый пылевыми клещами *Dermatophagoides pteronyssinus* и вызывающий гиперчувствительность дыхательных путей и астму, индуцирует апоптоз бронхоэпителиальных клеток посредством активации внешнего и собственного пути. Рекомбинантный Der p2 вызывает повышение концентрации цитоплазматического цитохрома c, что приводит к увеличению концентрации активной инициирующей каспазы-9, а затем эффекторной каспазы-3 (Lin et al., 2015).

В настоящее время исследуются апоптотические процессы при острой почечной недостаточности (ОПН). Для моделирования ОПН культуры клеток почки обрабатывали цисплатином и исследовали процессы аутофагии и апоптоза, вызванные этим цитотоксическим агентом (Kaushal, Shah, 2016). Установлено, что каспаза-8

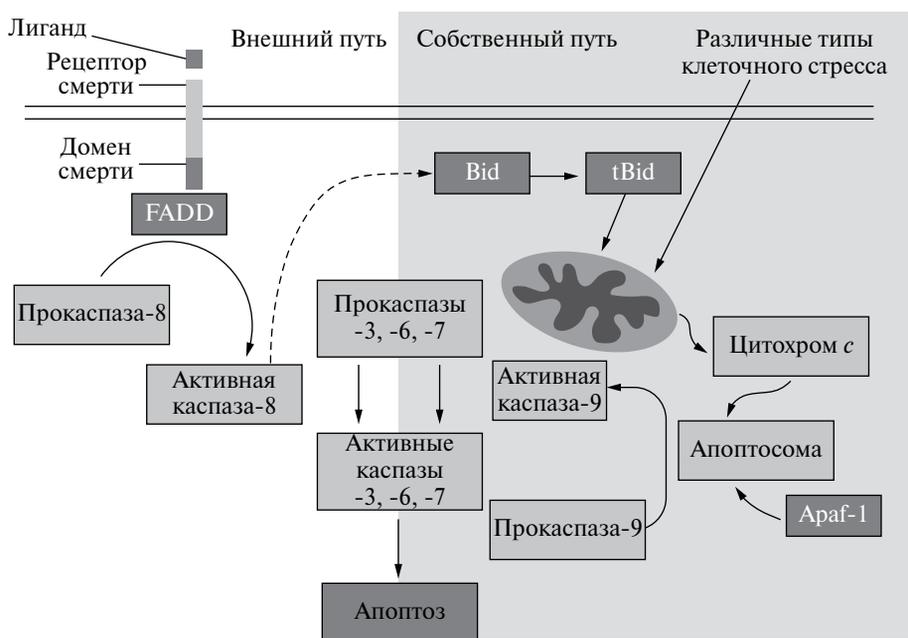


Рис. 3. Взаимосвязь внешнего и собственного путей передачи апоптотического сигнала (по McIlwain et al., 2013, с модификациями). Связующим звеном является белок Bid семейства Bcl-2.

и апоптосома Fas–FADD–каспаза-8 индуцируют аутофагические процессы посредством активации комплекса Atg5–Atg12, а каспаза-3 индуцирует активацию комплекса Atg4D. Полученные данные свидетельствуют о перекрестных механизмах аутофагии и апоптоза при ОПН. Также имеются данные о том, что апоптотическое действие каспаз -3, -8, -9 в клетках осуществляется при действии фермента SGK-1 (serum and glucocorticoid-regulated kinase 1) (Pastore et al., 2016).

Показано участие каспазы-3 в апоптозе эндотелиальных клеток коронарной артерии человека, индуцированном гомоцистеином (фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний). При этом степень активности каспазы-3 прямо коррелирует с концентрацией гомоцистеина, добавляемого в культуры эндотелиальных клеток. При гомоцистеин-индуцированном апоптозе активность каспазы-3 может быть снижена при повышенной экспрессии микроРНК miR-30b (Li F. et al., 2015). В эндотелии сосудов апоптотическая активность каспазы-3 может быть снижена под действием белка Elmo1, который способствует изменению формы клеток, их миграции и фагоцитозу, и белка Dock180 – активатора G-протеинов (Schäker et al., 2015). При исследовании эндотелиальной дисфункции как последствия сахарного диабета показано, что гипергликемия индуцирует апоптоз эндотелиальных клеток по митохондриальному пути, повышая концентрацию цитоплазматического цитохрома *c* и активность каспазы-3 (Mishiro et al., 2014).

Интересны исследования, касающиеся апоптотических процессов при лимфоме Беркитта – неходжкинской лимфоме высокой степени злокачественности, развивающейся из В-лимфоцитов и распространяющейся за пределы лимфатической системы. На поверхности клеток лимфомы Беркитта локализован гликан Gb3 (Gal α 1–4Gal β 1–4Glc), с которым специфически взаимодействует лектин M μ tiLec (mussel R-type lectin). Это взаимодействие запускает апоптоз лимфоидных клеток по внешнему пути, индуцируя экспрессию TNF- α и его взаимодействие с рецепторами клеточной смерти, а также по митохондриальному, увеличивая активность каспаз -3, -9 (Hasan et al., 2015). По другим данным, в качестве индуктора апоптоза клеток лимфомы Беркитта (и возможного терапевтического средства) может использоваться икаритин – антипролиферационный агент, ингибитор опухолевой активности в некоторых видах опухоли человека. Икаритин повышает активность каспаз -8, -9, увеличивая апоптотическую активность лимфоидных клеток (Li Z. et al., 2014).

Таким образом, инициирующие каспазы -8, -9 и эффекторная каспаза-3 активно изучаются как терапевтические мишени при опухолевых заболеваниях, в которых необходимо запустить процессы апоптоза и увеличить их активность. Также экспрессия каспаз -3, -8, -9 является показателем цитотоксичности апоптотического стимула, что делает эти маркеры важной частью исследований, касающихся апоптотических процессов.

Белки p53, p21, p16: роль в иммунопатологии, онкогенезе, эндотелиальной дисфункции, патологии выделительной системы

Белок p53 – продукт гена-супрессора опухоли TP53 – представляет собой транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл. Активация p53 приводит к остановке клеточного цикла и репликации поврежденной ДНК. Помимо непосредственных повреждений ДНК p53 активируется в ответ на уменьшение концентрации свободных рибонуклеотидов, гипоксию, тепловой шок, высокую концентрацию монооксида азота, ионизирующее излучение (Read, Strachan, 1999).

Схема активации и реализации биологических функций белка p53 представлена на рисунке 4.

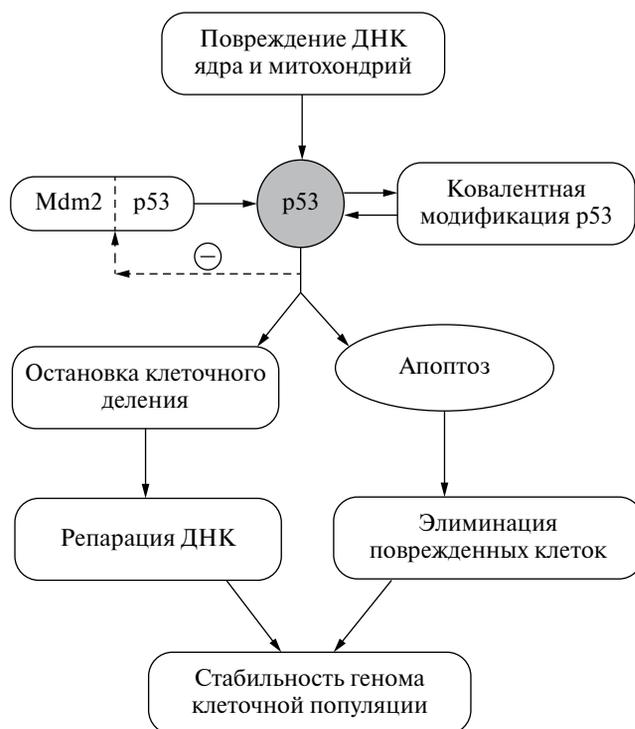


Рис. 4. Схема активации белка p53 (Губский, 2015).

При нормальных условиях в клетке экспрессируется белок Mdm2 (mouse double minute 2 homolog, другое название — E3-убиквитин-лигаза). Его N-концевой домен при отсутствии повреждений ДНК связан с N-концевым доменом белка p53, препятствуя образованию активной формы p53. При возникновении стрессовых стимулов комплекс Mdm2:p53 распадается, и происходит быстрая аккумуляция активного p53, который стимулирует экспрессию гена *mdm2* по механизму отрицательной обратной связи. Активированный p53 из цитоплазмы поступает в ядро, где регулирует транскрипцию генов-мишеней, что приводит либо к остановке клеточного деления с целью начать репарацию ДНК, либо к запуску апоптоза с целью элиминировать клетки с мутантным геномом (Губский, 2015; Eleftheriadis et al., 2015).

Показано, что p53 экспрессируется в Т-лимфоцитах, активированных фитогемоагглютинином, и способствует их гемостазу (Nagy et al., 2009). По данным исследований (Madarura et al., 2016), активация p53 в Т-клетках происходит через путь, опосредованный белками Мус и p14ARF, при этом мутации в генах *MYC* или *p14ARF*, кодирующих эти белки, приводят к нарушению механизмов активации p53 через Mdm2 и возникновению опухолевых заболеваний. Предполагается, что экспрессия p53 в Т-лимфоцитах регулируется фосфатазой Wip1 для поддержания функциональной организации тимуса как ключевого органа иммунной системы. Wip1 предотвращает гиперактивацию путей p53 и p38MAPK в клетках тимуса (Uyanik et al., 2017). Установлено, что апоптоз в Т-клетках при лейкозе запускается аналогами нуклеозидов — децитабином и зебуларинном (Ruiz-Magaña et al., 2011), а также гипотензивным препаратом гидралазином (Ruiz-Magaña et al., 2016). При этом все исследуемые вещества воздействуют на p53 и увеличивают его активность, но децитабин и зебуларин запускают каспаза-зависимый путь апоптоза, а гидралазин — митохондриальный.

В эндотелиальных клетках сосудов апоптоз, индуцируемый увеличением экспрессии p53, вызывает повышение экспрессии трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), что приводит к накоплению неоинтимальных гладкомышечных клеток (Li J. et al., 2015). Показано, что в проксимальных трубчатых эпителиальных клетках почек p53-индуцированный апоптоз вызывается хроническим воздействием кадмия, который ингибирует экспрессию гена убиквитин-конъюгирующего фермента. Механизм p53-индуцированного апоптоза реализуется в эндотелии сосудов,

нейронах головного мозга и астроцитах (Lee et al., 2016).

Белок p21, также известный как CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, внутриклеточный белок-ингибитор циклин-зависимой киназы 1A), представляет собой главную мишень p53 и вызывает остановку клеточного цикла в стадии G1 (Bunz et al., 1998). Белок p21 совместно с p53 блокирует последующие повреждения ДНК посредством участия в запуске процессов репарации (Новик и др., 2005).

Установлено, что фенотип мышей, нокаутных по гену *Cdkn1a* (*p21*), не отличается от мышей дикого типа. Вероятно, присутствие *p21* не является необходимым для нормального роста и развития организма. Однако при достижении 16-месячного возраста у мутантных мышей спонтанно развивались опухоли (Martin-Caballero, 2001).

Вместе с тем, белок p21 обладает антиапоптотической активностью. Киназа Akt, фосфорилируя белок p21, способствует выходу белка из ядра в цитоплазму. В цитоплазме p21 ингибирует активность прокаспазы-3, каспазы-8, каспазы-10 и способствует клеточному делению, активируя комплексы циклин D—CDK4, циклин A—CDK1 (рис. 5) (Dotto, 2000). Это свидетельствует о двойной роли p21 в организме: цитоплазматическая форма может являться онкопротектором и ингибирует апоптоз, а ядерная форма обладает обратным эффектом. Снижение активности белка p21 повышает способность организма к регенерации тканей (Bedelbaeva et al., 2010).

Установлено, что при атеросклерозе длинная некодирующая РНК-p21 (*lincRNA-p21*) способна подавлять пролиферацию клеток и индуцировать апоптоз сосудистых гладкомышечных клеток. Ингибирование *lincRNA-p21* приводит к неоинтимальной гиперплазии *in vivo* в модели повреждения внутренней сонной артерии и нарушает взаимодействие белков — мишеней p53 (Wu et al., 2014).

p21 может регулировать пролиферацию и активность Т-клеток, поэтому возможно использование регуляции экспрессии p21 для лечения аутоиммунных заболеваний, таких как системная красная волчанка (Daszkiewicz et al., 2015).

В клетках лимфомы Беркитта под воздействием MytiLec (нового лектина, полученного из средиземноморской мидии *Mytilus galloprovincialis*) p21 приводит к остановке клеточного цикла и продуцированию TNF- α , вызывая активацию апоптоза (Hasan et al., 2015).

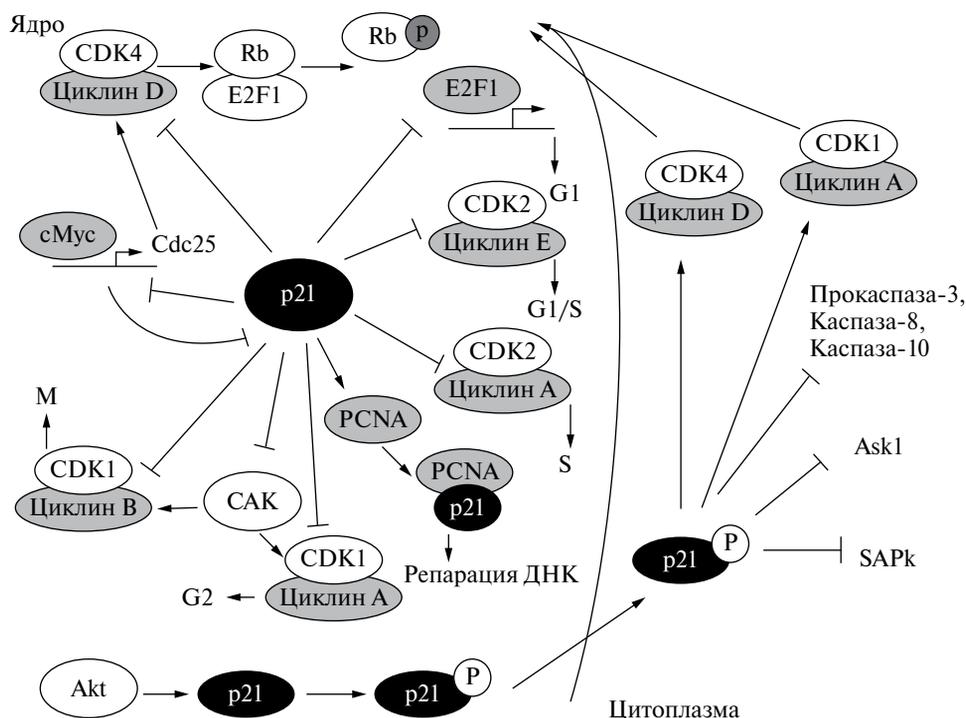


Рис. 5. Схематическое изображение функций p21 в клетке (Губский, 2015).

Белок p16 является опухолевым супрессором, тормозящим клеточный цикл путем инактивации циклин-зависимой киназы-2A, вовлеченной в фосфорилирование белка ретинобластомы pRb (белок-супрессор опухолевого роста, который ингибирует переход в S-фазу клеточного цикла и регулируется через фосфорилирование циклина D1). Инактивация циклин-D-циклин-зависимого комплекса киназы-2A инактивирует pRb. Этот эффект блокирует транскрипцию регуляторных белков клеточного цикла и приводит к остановке клеточного цикла. p16 является основной мишенью при терапии рака (Liggett, Sidransky, 1998).

Изучается возможная роль p16 как предиктора восстановления иммунной системы человека после операций. Уровень экспрессии p16 в Т-лимфоцитах периферической крови у пожилых людей после коронарного шунтирования был исследован для прогнозирования продолжительности пребывания в больнице после операции (Pustavoitau et al., 2016). Было показано, что уровень экспрессии p16 с возрастом снижается. Однако корреляционной связи между экспрессией p16 и продолжительностью пребывания в больнице после операции не обнаружено, то есть предикторная оценка этого показателя должна включать дополнительные маркеры функциональной активности иммунной системы.

p16 участвует в клеточном старении проксимальных трубчатых эпителиальных клеток почек в качестве компонента сигнального пути ATF4/p16 (ATF4 – activating transcription factor 4) при развитии диабетической нефропатии (Liu et al., 2015).

Прохибитин: участие в регуляции апоптоза и в развитии новообразований

Прохибитин (PHB) – многофункциональный белок, вовлеченный в регуляцию апоптоза, контроль клеточного цикла и стабилизацию митохондриальных белков. PHB локализуется на внутренней мембране митохондрий, где выполняет функцию шаперона, контролируя протеолиз митохондриальных белков. PHB также локализуется в ядре, где модулирует транскрипцию ДНК, и в плазматической мембране, участвуя в передаче клеточного сигнала от инсулинового рецептора и рецептора, активируемого протеазами I типа (PAR1) (Chiu et al., 2013; Giannotta et al., 2015). В геноме человека две копии гена *phb*, кодирующие две гомологичные субъединицы PHB-комплекса: PHB1 и PHB2 (van Aken, 2007).

PHB участвует в передаче апоптотического сигнала по внешнему и по митохондриальному пути. Мутации в гене этого белка, его посттрансляционные модификации или изменения в ядерной или митохондриальной транслокации могут

влиять на жизненный цикл клетки (Peng et al., 2015). Повышенная экспрессия прохибитина индуцирует устойчивость клеток к различным стимулам через митохондриальный апоптотический путь, а нокдаун гена *phb* повышает восприимчивость к апоптотическим стимулам. Нарушения функции PNB2 вызывает апоптоз и гибель в эмбриональном периоде у мышей (Baris et al., 2011).

В раковых клетках PNB необходим для активации Ras-опосредованного пути передачи сигналов, который может модулировать выживаемость и миграцию раковых клеток. Установлено, что противораковый препарат рокагламид может увеличивать апоптотическую активность в резистентных раковых клетках посредством избирательного связывания с PNB1 и PNB2. Это приводит к нарушению связывания PNB с протоонкогенным ферментом *c-Raf*, к остановке клеточного цикла в фазе G0/G1 и к инактивации онкогенного пути передачи сигнала *Raf*–*MEK*–*ERK*. Такой эффект рокагламида был показан на линии Т-лимфоцитов Jurkat (Т-лимфобластный лейкоз человека), а также на линии HeLa (рак шейки матки человека) и линии AsPC-1 (рак поджелудочной железы) (Yang et al., 2014).

PNB1 также действует как специфический рецептор в сосудах белой жировой ткани. Эндотелиальные клетки белой жировой ткани у мышей и людей богаты PNB1, а связанный с мембраной рецептор PNB1 является мишенью для жироспецифического пептида (Kolonin et al., 2004). PNB1 посредством индукции цитохрома *c* вызывает апоптоз в эндотелиальных клетках сосудов белой жировой ткани *in vivo* и предотвращает ожирение, вызванное диетой с высоким потреблением жиров. Вероятно, специфический PNB1-рецепторный комплекс в белой жировой клетчатке может способствовать индукции апоптоза как механизма лечения ожирения (Hossen et al., 2013).

PNB, фосфорилированный по 258 треонину, является потенциальным медиатором метастазирования при раке легкого. Стабильная экспрессия модифицированного PNB в плазматической мембране клеток рака легкого человека повышает инвазивную способность раковых клеток (Ho et al., 2015).

Инактивация PNB2 в подоцитах почки у мышей вызывает прогрессирующую протеинурию, почечную недостаточность и приводит к гиперфосфорилированию рибосомального белка S6 (S6RP), известного медиатора сигнального пути mTOR. Ингибирование системы передачи сигналов инсулин/инсулиноподобный фактор роста-1 (ИФР-1) предотвращало гиперфосфорилирование

S6RP без влияния на структурный дефект митохондрий и замедляло развитие почечной недостаточности у животных с дефицитом PNB2 (Ising et al., 2015).

Белок AIF: участие в регуляции митохондриального апоптоза и в нарушении функций иммунной, бронхолегочной и выделительной систем

AIF – один из проапоптотических факторов, высвобождаемых из митохондрий и реализующих апоптоз по митохондриальному (каспаза-независимому) пути (Farina et al., 2017).

AIF – флавопротеин митохондрий, вовлеченный в эмбриональное развитие и выживаемость клеток сердца. Зрелая форма AIF, содержащая два FAD-связывающих домена, NADH-связывающий домен и С-концевой домен, прикреплен к внутренней митохондриальной мембране, где регулирует активность комплекса митохондриальной дыхательной цепи (Hangen, 2015). AIF индуцирует гибель клеток в ответ на окислительный стресс, повреждение ДНК, гипоксию и т.д. Многочисленные внутриклеточные стресс-пути в конце сводятся к деполяризации и фрагментации митохондрий и к последующему высвобождению апоптогенной формы AIF из митохондрии в ядро, где она вызывает конденсацию хроматина и фрагментацию ДНК (Thal et al., 2011).

У мутантных мышей с дефицитом белка AIF по сравнению с мышами дикого типа снижается активность мультибелкового комплекса I дыхательной цепи переноса электронов. То есть дефицит AIF приводит к нарушению окислительного фосфорилирования (Klein et al., 2002; Vahsen et al., 2004).

Показано, что у человека экспрессия белка AIF в почечной ткани значительно уменьшается при диабетической нефропатии пропорционально снижению функции почек. У мышей со сниженным синтезом белка AIF выявлены признаки хронической болезни почек, включая протеинурию, гломерулосклероз, тубулоинтерстициальный фиброз и гиперфильтрацию. Индукция экспериментального диабета у таких мышей приводила к более тяжелому заболеванию почек, чем у мышей дикого типа с диабетом. Эти исследования указывают на роль AIF в развитии почечных патологий у человека (Coughlan et al., 2016).

Делеция в гене *aif* нарушает окислительное фосфорилирование в Т-лимфоцитах. Дефицит AIF вызывает снижение активности Т-клеток, уменьшение их количества. При этом CD8⁺ Т-клетки более

чувствительны к мутациям в гене *aif*, чем CD4⁺ Т-клетки. Однако снижение экспрессии белка AIF не влияет на дифференцировку тимоцитов (Milasta et al., 2016).

В ответ на повреждение ДНК бронхиального эпителия сигаретным дымом AIF транслоцируется из митохондрий в ядро, где вызывает конденсацию хроматина и апоптотическую фрагментацию ДНК. В дополнение к этому эффекту, цитоплазматический AIF ускоряет высвобождение других проапоптотических белков — цитохрома *c* и прокаспазы-9 (Bucchieri et al., 2015).

Молекулярные маркеры апоптоза и клеточное старение

Наряду с генетической нестабильностью и эпигенетическими взаимодействиями, апоптоз является одним из центральных механизмов старения организма. Наиболее изученными в настоящее время маркерами клеточного старения являются белки p53, p21, p16.

Так, например, старение головного мозга сопровождается снижением экспрессии белка HMGB1 (high mobility group box 1), который обеспечивает негомологичное соединение концов нитей ДНК при повреждении. HMGB1 взаимодействует с p53, играя роль сенсора повреждения ДНК. Синтез HMGB1 является p53-зависимым, то есть снижение экспрессии HMGB1 при старении вызвано снижением уровня p53 в стареющих нейрональных клетках (Салмина и др., 2015).

Несмотря на то, что в клетках при старении уровень экспрессии белка p53 или его мРНК не всегда увеличивается, часто возрастает степень его фосфорилирования и, следовательно, ДНК-связывающая активность. В результате, уровень белка p21, основной мишени p53, повышается. Белок p21 отвечает за p53-зависимую остановку клеточного деления. p53-зависимая индукция гена *p21* приводит к клеточному старению путем ингибирования ключевых регуляторов клеточного цикла — циклин-зависимых протеинкиназ — и блокирует репликацию ДНК (Москалев, 2009). Гибель клеток при их старении также является защитным механизмом от их возможной трансформации в опухолевые клетки (Baker et al., 2011). Белок p16, как и p21, выступает в роли ингибитора циклин-зависимых киназ (Rheinwald et al., 2002). Экспрессия p16 повышается с возрастом практически во всех тканях (Krishnamurthy et al., 2004).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение апоптоза характеризуется описанием молекулярных маркеров, вовлеченных в клеточную гибель: индукторов, рецепторов, посредников, эффекторов. На данный момент открыты десятки молекул, участвующих в апоптозе, но функции многих из них изучены недостаточно.

Наиболее изученными молекулами — маркерами апоптоза являются каспазы, запускающие и реализующие каспаза-зависимый апоптоз, а также белок p53, инициирующий запуск митохондриального апоптоза. Активно изучаются белки p21 и p16, являющиеся мишенями p53 и посредниками в передаче сигнала при митохондриальном апоптозе. Немаловажную роль в апоптотических процессах в митохондриях играют белки прохибитин и флавопротеин AIF.

Проводятся исследования по регуляции клеточного старения посредством воздействия на белок p53 и его мишени p21 и p16.

Рассмотренные в обзоре маркеры апоптоза (каспазы -3, -8, -9, белки p53, p21, p16, РНВ, AIF) играют важную роль в исследовании патологических процессов в иммунной, бронхолегочной, выделительной, сердечно-сосудистой системах, при онкологических заболеваниях. Указанные молекулы-маркеры внешнего и внутреннего путей апоптоза могут служить мишенями действия геропротекторных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. М.: Эдиториал УРСС, 2002. 320 с.
- Варга О.Ю., Рябков В.А. Апоптоз: понятие, механизмы реализации, значение // Экол. чел. 2006. № 7. С. 28–32.
- Голубев А.М., Москалева Е.Ю., Северин С.Е. и др. Апоптоз при критических состояниях // Общ. реаниматол. 2006. № 2 (6). С. 184–190.
- Гордеева А.В., Лабас Ю.А., Звягильская Р.А. Апоптоз одноклеточных организмов: механизмы и эволюция // Биохимия. 2004. Т. 69. № 10. С. 1301–1313.
- Губский Ю.И. Смерть клетки: свободные радикалы, некроз, апоптоз. Винница: Нова Книга, 2015. 360 с.
- Льюин Б. Клетки. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. 951 с.
- Майборода А.А. Апоптоз: гены и белки // Сиб. мед. ж. 2013. № 3. С. 130–135.
- Мартынова Е.А. Регуляция активности каспаз в апоптозе // Биоорг. хим. 2003. Т. 29. № 5. С. 518–543.

- Москалев А.А.* Перспективные направления генетики старения и продолжительность жизни // Успехи геронтол. 2009. Т. 22. № 1. С. 92–103.
- Новик А.А., Камилова Т.А., Цыган В.Н.* Введение в молекулярную биологию канцерогенеза. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. 224 с.
- Потапнев М.П.* Аутофагия, апоптоз, некроз клеток и иммунное распознавание своего и чужого // Иммунология. 2014. Т. 35. № 2. С. 95–102.
- Рыжов С.В., Новиков В.В.* Молекулярные механизмы апоптотических процессов // Рос. биотерап. ж. 2002. № 3. Т. 1. С. 27–33.
- Салмина А.Б., Комлева Ю.К., Кувачева Н.В. и др.* Воспаление и старение мозга // Вестн. РАМН. 2015. Т. 70. № 1. С. 17–25.
- Самуилов В.Д., Олескин А.В., Лагунова Е.М.* Программируемая клеточная смерть // Биохимия. 2000. Т. 65. № 8. С. 1029–1046.
- Широкова А.В.* Апоптоз. Сигнальные пути и изменение ионного и водного баланса клетки // Цитология. 2007. Т. 49. № 5. С. 385–394.
- Baker D.J., Wijshake T., Tchkonja T.* Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders // Nature. 2011. № 479 (7372). P. 232–236.
- Baris O.R., Klose A., Klopper J.E. et al.* The mitochondrial electron transport chain is dispensable for proliferation and differentiation of epidermal progenitor cells // Stem Cells. 2011. № 29. P. 1459–1468.
- Bedelbaeva K., Snyder A., Gourevitch D.* Lack of p21 expression links cell cycle control and appendage regeneration in mice // PNAS USA. 2010. V. 30. P. 45–50.
- Bucchieri F., Marino Gammazza A., Pitruzzella A. et al.* Cigarette smoke causes caspase-independent apoptosis of bronchial epithelial cells from asthmatic donors // PLoS One. 2015. № 10 (3). P. e0120510.
- Bunz F., Dutriaux A., Lengauer C. et al.* Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage // Science. 1998. V. 282 (5393). P. 1497–1501.
- Chiu C.-F., Ho M.-Y., Peng J.-M.* Raf activation by Ras and promotion of cellular metastasis require phosphorylation of prohibitin in the raft domain of the plasma membrane // Oncogene. 2013. V. 32. № 6. P. 777–787.
- Coughlan M.T., Higgins G.C., Nguyen T.V. et al.* Deficiency in apoptosis-inducing factor recapitulates chronic kidney disease *via* aberrant mitochondrial homeostasis // Diabetes. 2016. № 65 (4). P. 1085–1098.
- Creagh E.M.* Caspase crosstalk: integration of apoptotic and innate immune signalling pathways // Tren. Immunol. 2014. V. 35 (12). P. 631–639.
- Daszkiewicz L., Vázquez-Mateo C., Rackov G. et al.* Distinct p21 requirements for regulating normal and self-reactive T cells through IFN- γ production // Sci. Rep. 2015. № 5. P. 76–91.
- Dotto G.P.* p21 (WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? // Biochim. Biophys. Acta. 2000. № 1471 (1). P. M43–M56.
- Eleftheriadis T., Pissas G., Antoniadis G. et al.* Malate dehydrogenase-2 inhibitor LW6 promotes metabolic adaptations and reduces proliferation and apoptosis in activated human T-cells // Exp. Ther. Med. 2015. № 10 (5). P. 1959–1966.
- Farina B., Di Sorbo G., Chambery A. et al.* Structural and biochemical insights of CypA and AIF interaction // Sci. Rep. 2017. № 7 (1). P. 1138–1145.
- Giannotta M., Fragassi G., Tamburro A. et al.* Prohibitin: a novel molecular player in KDEL receptor signalling // BioMed Res. Int. 2015. Art. ID 319454.
- Hangen E.* Interaction between AIF and CHCHD4 regulates respiratory chain biogenesis // Mol. Cell. 2015. № 58. P. 1001–1014.
- Hasan I., Sugawara S., Fujii Y. et al.* MytiLec, a mussel R-type lectin, interacts with surface glycan Gb3 on Burkitt's lymphoma cells to trigger apoptosis through multiple pathways // Mar. Drugs. 2015. № 13 (12). P. 7377–7389.
- Ho M.Y., Liang C.M., Liang S.M.* MIG-7 and phosphorylated prohibitin coordinately regulate lung cancer invasion/metastasis // Oncotarget. 2015. № 6 (1). P. 381–393.
- Hossen M.N., Kajimoto K., Akita H. et al.* Therapeutic assessment of cytochrome C for the prevention of obesity through endothelial cell-targeted nanoparticulate system // Mol. Ther. 2013. № 21. P. 533–541.
- Ising C., Koehler S., Brähler S. et al.* Inhibition of insulin/IGF-1 receptor signaling protects from mitochondria-mediated kidney failure // EMBO Mol. Med. 2015. № 3. P. 275–287.
- Kaushal G.P., Shah S.V.* Autophagy in acute kidney injury // Kidney Int. 2016. № 89 (4). P. 779–791.
- Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R.* Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics // Br. J. Cancer. 1972. № 26 (4). P. 239–257.
- Klein J.A., Longo-Guess C.M., Rossmann M.P.* The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor // Nature. 2002. № 419. P. 367–374.
- Koizumi Y., Nagase H., Nakajima T. et al.* Toll-like receptor 3 ligand specifically induced bronchial epithelial cell death in caspase dependent manner and functionally upregulated Fas expression // Allergol. Int. 2016. № 65. P. 30–37.
- Kolonin M.G., Saha P.K., Chan L. et al.* Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue // Nat. Med. 2004. № 10. P. 625–632.
- Krishnamurthy J., Torrice C., Ramsey M.R. et al.* Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging // J. Clin. Invest. 2004. V. 114. № 9. P. 1299–1307.
- Lee J.Y., Tokumoto M., Hattori Y. et al.* Different regulation of p53 expression by cadmium exposure in kidney, liver,

- intestine, vasculature, and brain astrocytes // *Toxicol. Res.* 2016. № 32 (1). P. 73–80.
- Li Z.J., Yao C., Liu S.F. *et al.* Cytotoxic effect of icaritin and its mechanisms in inducing apoptosis in human Burkitt lymphoma cell line // *Biomed. Res. Int.* 2014. P. e391512.
- Li F., Chen Q., Song X. *et al.* miR-30b is involved in the homocysteine-induced apoptosis in human coronary artery endothelial cells by regulating the expression of caspase 3 // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. № 16 (8). P. 682–695.
- Li J., Xiong J., Yang B. *et al.* Endothelial cell apoptosis induces TGF- β signaling-dependent host endothelial-mesenchymal transition to promote transplant arteriosclerosis // *Am. J. Transplant.* 2015. № 15 (12). P. 3095–3111.
- Liggett W.H.Jr., Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer // *J. Clin. Oncol.* 1998. № 16 (3). P. 1197–1206.
- Lin C.H., Hong Y.C., Kao S.H. Aeroallergen Der p2 induces apoptosis of bronchial epithelial BEAS-2B cells *via* activation of both intrinsic and extrinsic pathway // *Cell Biosci.* 2015. № 5. P. 1–11.
- Liu J., Yang J.R., Chen X.M. *et al.* Impact of ER stress-regulated ATF4/p16 signaling on the premature senescence of renal tubular epithelial cells in diabetic nephropathy // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2015. № 308 (8). P. 621–630.
- Madapura H.S., Salamon D., Wiman K.G. *et al.* cMyc-p53 feedback mechanism regulates the dynamics of T lymphocytes in the immune response // *Cell Cycle.* 2016. № 15 (9). P. 1267–1275.
- Mahata B., Biswas S., Rayman P. *et al.* GBM derived gangliosides induce T cell apoptosis through activation of the caspase cascade involving both the extrinsic and the intrinsic pathway // *PLoS One.* 2015. № 10 (7). P. e0134425.
- Martín-Caballero J., Flores J.M., García-Palencia P., Serrano M. Tumor susceptibility of p21 (Waf1/Cip1)-deficient mice // *Canc. Res.* 2001. № 61 (16). P. 6234–6238.
- McIlwain D.R., Berger T., Mak T.W. Caspase functions in cell death and disease // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013. № 5 (4). P. 1–28.
- Milasta S., Dillon C.P., Sturm O.E. *et al.* Apoptosis-inducing-factor-dependent mitochondrial function is required for T cell but not B cell function // *Immunity.* 2016. № 44 (1). P. 88–102.
- Mishiro K., Imai T., Sugitani S. *et al.* Diabetes mellitus aggravates hemorrhagic transformation after ischemic stroke *via* mitochondrial defects leading to endothelial apoptosis // *PLoS One.* 2014. V. 9 (8). P. e103818.
- Nagy N., Matskova L., Kis L.L. *et al.* The proapoptotic function of SAP provides a clue to the clinical picture of X-linked lymphoproliferative disease // *PNAS USA.* 2009. № 106. P. 11966–11971.
- Pastore D., Della-Morte D., Coppola A. *et al.* SGK-1 protects kidney cells against apoptosis induced by ceramide and TNF- α // *Cell Death Dis.* 2015. № 6. P. e1890.
- Peng Y.T., Chen P., Ouyang R.Y., Song L. Multifaceted role of prohibitin in cell survival and apoptosis // *Apoptosis.* 2015. № 20 (9). P. 1135–1149.
- Pustavoitau A., Barodka V., Sharpless N.E. *et al.* Role of senescence marker p16 INK4a measured in peripheral blood T-lymphocytes in predicting length of hospital stay after coronary artery bypass surgery in older adults // *Exp. Gerontol.* 2016. № 74. P. 29–36.
- Read A.P., Strachan T. *Human molecular genetics 2.* N.Y.: Wiley-Liss, 1999. 576 p.
- Rheinwald J.G., Hahn W.C., Ramsey M.R. *et al.* A twostage, p16(INK4A)- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status // *Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 22. № 14. P. 5157–1572.
- Ruiz-Magaña M.J., Rodriguez-Vargas J.M., Morales J.C. *et al.* The DNA methyltransferase inhibitors zebularine and decitabine induce mitochondria-mediated apoptosis and DNA damage in p53 mutant leukemic T cells // *Int. J. Cancer.* 2011. № 130. P. 1195–1207.
- Ruiz-Magaña M.J., Martínez-Aguilar R., Lucendo E. *et al.* The antihypertensive drug hydralazine activates the intrinsic pathway of apoptosis and causes DNA damage in leukemic T cells // *Oncotarget.* 2016. № 7 (16). P. 21875–21886.
- Salmena L., Lemmers B., Hakem A. *et al.* Essential role for caspase-8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity // *Genes Dev.* 2003. № 17 (7). P. 883–895.
- Schäker K., Bartsch S., Patry C. *et al.* The bipartite rac1 guanine nucleotide exchange factor engulfment and cell motility 1/dedicator of cytokinesis 180 (elmo1/dock180) protects endothelial cells from apoptosis in blood vessel development // *J. Biol. Chem.* 2015. № 290 (10). P. 6408–6418.
- Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process // *J. Exp. Med.* 1999. № 189. P. 381–394.
- Thal S.E., Zhu C., Thal S.C. *et al.* Role of apoptosis inducing factor (AIF) for hippocampal neuronal cell death following global cerebral ischemia in mice // *Neurosci. Lett.* 2011. № 499. P. 1–3.
- Uyanik B., Grigorash B.B., Goloudina A.R., Demidov O.N. DNA damage-induced phosphatase Wip1 in regulation of hematopoiesis, immune system and inflammation // *Cell Death Discov.* 2017. V. 3. P. 17–18.
- Vahsen N., Candé C., Brière J.J. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation // *EMBO J.* 2004. № 23. P. 4679–4689.
- van Aken O. Mitochondrial type-I prohibitins of *Arabidopsis thaliana* are required for supporting proficient meristem development // *Plant J.* 2007. № 52 (5). P. 850–864.

Wu G., Cai J., Han Y. et al. LincRNA-p21 regulates neointima formation, vascular smooth muscle cell proliferation, apoptosis, and atherosclerosis by enhancing p53 activity // *Circulation*. 2014. № 130 (17). P. 1452–1465.

Yang H.B., Song W., Chen L.Y. et al. Differential expression and regulation of prohibitin during curcumin-induced apoptosis of immortalized human epidermal HaCaT cells // *Int. J. Mol. Med*. 2014. № 33. P. 507–514.

Molecular Markers of Caspase-Dependent and Mitochondrial Apoptosis: the Role of Pathology and Cell Senescence

A. S. Diatlova^{1,2}, A. V. Dudkov², N. S. Linkova^{1,2}, V. Kh. Khavinson^{2,3,*}

¹*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia*

²*St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, St. Petersburg, Russia*

³*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

**E-mail: khavinson@gerontology.ru*

The data on molecular mechanisms of normal and pathological apoptosis are summarized. Three phases of apoptosis are distinguished: signal, effector and degradation. The signal phase includes external (caspase-dependent) and genuine (mitochondrial) pathways. Molecular markers of external and genuine apoptosis pathways play an important role in the diagnostics and treatment of immune, bronco-pulmonary, excretory, pathology of the cardio-vascular system, oncology and ageing. The review considers initiating caspase-8, -9 and effector caspase-3 as the molecular markers of caspase-dependent apoptosis. The main molecular markers of mitochondrial apoptosis are p53, p21, p16 that respond to the damage of DNA and take part in cell senescence, chaperon prohibitin, and flavoprotein AIF.

Keywords: caspase-dependent apoptosis, mitochondrial apoptosis, cell senescence, molecular markers.