

А. В. Юрченко, Д. В. Ботько
БИОХИМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
ЗАПРОГРАММИРОВАННОЙ ГИБЕЛИ КЛЕТОК

Научный руководитель: канд. биол. наук, доцент Е. В. Чаплинская

Кафедра биологии,

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

Резюме. Смерть, наряду с ростом и дифференцировкой, является важной частью жизненного цикла клетки. В работе освещены исторические аспекты открытия апоптоза, характерная морфология, сопровождающая этот процесс, многочисленные типы клеток и медиаторов, с которыми связана запрограммированная гибель клеток. Основная часть статьи посвящена нашему текущему пониманию биохимических и молекулярных механизмов апоптоза.

Ключевые слова: апоптоз, каспаза, рецепторы смерти, апоптотический фактор активации протеаз.

Resume. Death, along with growth and differentiation, is a critical part of the life cycle of a cell. This review covers historical perspective on the discovery of apoptosis, the characteristic morphology that accompanies this process, and the numerous cell types and mediators with which programmed cell death is associated. The bulk of the review discusses our current understanding of the biochemical and molecular mechanisms of apoptosis.

Keywords: apoptosis, caspase, death-receptors, Apaf 1 (apoptotic protease activating factor 1).

Актуальность. Проблема исследования молекулярных механизмов запрограммированной гибели клетки (апоптоза) стала в последние годы одной из самых трудных и актуальных проблем биологических наук. Актуальность этой проблемы определяется взаимосвязью нарушения регуляции процесса запрограммированной гибели клетки с большинством заболеваний. Прямая связь апоптоза и многих патологических состояний сегодня уже не вызывает сомнения, поэтому выявление конкретных механизмов нарушения регуляции апоптоза, при конкретных заболеваниях, позволит определить этиологию и патогенез данных заболеваний. И как следствие этого - возможность коррекции нарушения регуляции запрограммированной гибели клетки.

Цель: выяснить современное состояние представлений об этапах протекания апоптоза, включая морфологию, биохимию, методы обнаружения, а также обсуждение потенциальных альтернативных форм апоптоза.

Задачи:

1. Описать роль апоптотической гибели клеток в нормальном организме;
2. Выяснить значение апоптоза при некоторых патологических состояниях;
3. Изучить актуальные данные, касающиеся выявленных механизмов апоптоза, представленные в современной научной литературе;
4. Проанализировать факторы, сдерживающие апоптоз в нормальных условиях функционирования живых систем;
5. Спрогнозировать возможности применения управляемого апоптоза в практической медицине.

Материал и методы. Изучение актуальных первоисточников: научных обзоров, практических статей и монографий, освещающих проблему апоптоза.

Результаты и их обсуждение. Термин «апоптоз» был впервые употреблён в 1972 году в работе британских учёных — Дж. Керра, Э. Уайли и А. Керри, но для

всеобщего признания этой концепции потребовалось еще 20 лет. Её убедительно подтвердили генетические исследования, проведенные на нематоде *Caenorhabditis elegans* [3], в которых впервые идентифицировали гены, ответственные за клеточную смерть и ее регуляцию.

В процессе индивидуального развития животных программируемая клеточная смерть элиминирует клетки, подлежащие уничтожению. Например, данный механизм помогает сформировать форму руки или ступни в процессе эмбрионального развития. Кроме того, апоптоз выполняет функцию контроля качества при индивидуальном развитии, уничтожая нездоровые, оказавшиеся не на своем месте, нефункциональные или потенциально опасные для животного клетки. В тканях взрослого, которые не растут и не становятся меньше, смерть и деление клеток должны тонко регулироваться, чтобы между ними поддерживался точный баланс. Животные клетки могут распознавать повреждения в своих многочисленных органеллах, и, если повреждение достаточно сильно, они убивают себя, запуская апоптоз [2].

Клетки в состоянии апоптоза не только приобретают характерные морфологические признаки, но также претерпевают специфические биохимические изменения, которые можно использовать для определения апоптозных клеток [1]. Итак, маркерами апоптоза служат:

1) Разрезанная эндонуклеазами ДНК (поскольку разрывы появляются в области линкеров между нуклеосомами, при анализе этих фрагментов методом гель-электрофореза они выстраиваются в характерную лестничную структуру. Более того, из-за расщепления у ДНК появляется множество новых свободных концов, которые можно увидеть в апоптозных ядрах с помощью так называемого TUNEL-метода, используя меченый нуклеотид;

2) Отрицательно заряженный фосфолипид фосфатидилсерин обычно расположен исключительно во внутреннем слое липидного бислоя плазматической мембраны, но в апоптозных клетках он перескакивает на внешнюю сторону и может служить маркером таких клеток. Фосфатидилсерин на поверхности апоптозных клеток можно выявить с помощью меченого белка аннексина V, который специфически связывается с этим фосфолипидом. Он подаёт сигнал макрофагам «съешь меня», а также предотвращает воспаление;

3) Клетки, претерпевающие апоптоз, часто теряют электрический потенциал который обычно поддерживается на внутренней мембране их митохондрий. Этот мембранный потенциал можно измерить, используя положительно заряженные флуоресцентные красители.

4) Выход цитохрома с из митохондрий в цитозоль.

Внутриклеточные механизмы, ответственные за апоптоз, схожи у всех животных клеток. В них принимает участие семейство протеаз – каспазы [1]. Каспазы синтезируются в клетках в виде неактивных предшественников, или прокаспаз, которые, как правило, активируются посредством протеолитического расщепления. Начиная с самых ранних стадий индивидуального развития животного, здоровые клетки непрерывно производят прокаспазы и другие белки, необходимые для апоптоза. Некоторые из прокаспаз, задействованных в апоптозе, запускают протеолитический каскад и

называются инициаторными прокаспазами; будучи активированными, они расщепляют и активируют следующие, эффекторные каспазы, которые затем подвергают процессингу и активируют другие эффекторные каспазы, а также расщепляют определенные белки мишени в клетке, а именно: 1) белки ядерной ламины; 2) белки, которые в норме удерживают эндонуклеазу в неактивной форме; 3) компоненты цитоскелета и белки клеточной адгезии. Каспазный каскад является необратимым.

Таким образом, в любой момент в клетке есть все, что требуется для апоптоза, нужен лишь стимул для его запуска.

Наилучшим образом описаны два пути активации каспазного каскада, который ведет к апоптозу в клетках млекопитающих, — внешний и внутренний [1].

Внеклеточные сигнальные белки, связывающиеся death-рецепторами (рецепторами смерти) на поверхности клетки, запускают апоптоз по внешнему пути. Рецепторы смерти представляют собой трансмембранные белки, единственный трансмембранный домен которых связывается с лигандом, а внутриклеточный «домен смерти» необходим для активации программы апоптоза. Рецепторы являются гомотримерами и принадлежат к семейству рецепторов факторов некроза опухоли (tumor necrosis factors, TNF), которое включает в себя рецептор самого TNF и рецептор смерти Fas. Известный пример того, как рецепторы смерти запускают внешний путь апоптоза, представляет собой активация Fas на поверхности клетки-мишени Fas-лигандом, располагающимся на поверхности лимфоцита-киллера (цитотоксического лимфоцита). При присоединении лиганда Fas-рецептор активируется, и его цитоплазматический домен смерти связывает внутриклеточные адаптерные белки, которые, в свою очередь, связывают инициаторные прокаспазы-8 и/или -10. В результате образуется DISC-комплекс (death inducing signaling complex сигнальный комплекс, индуцирующий смерть). Становясь активными в DISC комплексе, инициаторные каспазы активируют эффекторные прокаспазы и индуцируют апоптоз. В некоторых клетках внешний путь должен задействовать также и внутренний путь апоптоза, чтобы усилить каспазный каскад и убить клетку.

Клетки могут также запускать свою программу апоптоза изнутри, обычно в ответ на стрессовое воздействие, такое как повреждение ДНК или недостаток кислорода, питательных веществ или внеклеточных сигналов выживания. В клетках позвоночных такая внутриклеточная активация апоптотической программы смерти происходит особым образом: в цитоплазму выходят митохондриальные белки, в норме находящиеся в межмембранном пространстве этих органелл. Некоторые из вышедших в цитоплазму белков активируют там каспазный протеолитический каскад, что приводит к апоптозу.

Среди белков митохондрий, участвующих в запуске апоптоза изнутри клетки, особую роль играет **цитохром с**, водорастворимый компонент митохондриальной электрон транспортной цепи. В цитоплазме он выполняет совершенно другую функцию: он связывается с адаптерным белком Araf 1 (*apoptotic protease activating factor 1* — *апоптотический фактор активации протеаз*), активирующим прокаспазу, в результате чего Araf 1 олигомеризуется, образуя колесовидный гептамер, получивший название **апоптосомы**. Белки Araf 1 затем связывают инициаторные прокаспазы (*прокаспазу-9*), которые активируются, сближаясь друг с другом в апоптосоме, точно

так же, как прокаспазы-8 и 10 активируются в комплексе DISC. Молекулы активной каспазы-9 затем активируют следующие — эффекторные — прокаспазы и индуцируют апоптоз.

Белки Bcl2 млекопитающих регулируют внутренний путь запуска апоптоза, контролируя выход цитохрома *c* и других межмембранных митохондриальных белков в цитоплазму. Некоторые белки Bcl2 являются проапоптотическими и способствуют апоптозу, ускоряя высвобождение белков в цитоплазму, в то время как другие являются антиапоптотическими и ингибируют апоптоз, препятствуя выходу белков. Проапоптотические и антиапоптотические белки Bcl2 могут в различных комбинациях связываться друг с другом, образуя гетеродимеры, в которых два белка ингибируют активность друг друга. Баланс активностей этих двух функциональных классов белков Bcl2 во многом определяет, выживет ли клетка или погибнет путем апоптоза, запущенного изнутри нее.

Достаточно убедительно показано, что раковые клетки являются устойчивыми к апоптозу. Это позволяет им размножаться и выживать при любых условиях. Один из генов, отвечающих за контроль апоптоза, обнаруживается при многих формах рака. Этот ген-супрессор кодирует белок, находящийся на перекрестке разнообразных регуляторных путей, управляющих реакцией клетки на повреждения ДНК и многие другие стрессовые воздействия. Речь идет об опухолевом супрессоре p53, который кодируется геном Trp53.

Ген p53 («страж генома») является важнейшим геном, предотвращающим рак у человека [4]. Почти во всех раковых клетках человека мутирован либо сам ген p53, либо гены других участников p53-пути. Множественные функции данных генов в клетке могут быть сведены к следующим: поддержание генетической стабильности, регуляция клеточного цикла, контроль апоптоза. Эти свидетельства подтверждают фундаментальную роль данных генетических агентов как в защите от последствий к которым ведет повреждение клетки, так и в снижении риска онкогенного перерождения клетки. Клетки, дефектные по p53, не могут реагировать на стресс. Они избегают апоптоза и зачастую продолжают делиться, не останавливаясь для того, чтобы нейтрализовать имеющее место повреждение ДНК. В результате клетка или погибает или продолжает пролиферировать, несмотря на нарушения в геноме. Такое генетическое «увечье» может привести как к утрате гена-супрессора, так и к активации онкогенов. Утрата p53 к тому же делает некоторые раковые клетки намного менее чувствительными к облучению и многим противоопухолевым препаратам, которые в ином случае заставили бы их погибнуть или прекратить деление.

Таким образом, к настоящему времени многие ключевые белки апоптоза достаточно точно идентифицированы, однако молекулярные механизмы их действия или бездействия остаются недостаточно выясненными.

Выводы:

1 Процесс запрограммированной гибели клеток характеризуется выразительными морфологическими характеристиками и энергозависимыми биохимическими проявлениями.

2 Апоптоз является жизненно важным компонентом различных нормальных биологических процессов (функционирование иммунной системы, эмбриональное развитие, химическая гибель клеток и др.).

3 Нарушенный ход апоптоза причастен к формированию ряда патологических состояний организма.

4 Модулирование апоптоза открывает новые перспективы для лечения критических состояний организма. В этой связи, исследования продолжаются в направлении выяснения детальных механизмов клеточного цикла и сигнальных путей, контролирующих остановку клеточного цикла и апоптоза.

A. V. Yurchanka, D.V.Batsko

THE BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY OF PROGRAMMED CELL DEATH

Tutors: Candidate of Biological Sciences, assistant professor E.V.Chaplinskaya

Department of Biology

Belarusian State Medical University, Minsk

Литература

1. Албертс, Б. Молекулярная биология клетки / Албертс Б. - Мир, 2013 – С. 1713-1736.
2. Варга О.Ю. Апоптоз: понятие, механизмы реализации, значение// Экология человека. – 2006. – С.28-31
3. Хансон, К.П. Програмированная клеточная гибель (апоптоз): молекулярные механизмы и роль в биологии и медицине // Вопросы медицинской химии.– 1997. - том: 43(5), с.407.
4. Ярилин, А.А. Апоптоз и его роль в целостном организме // Глаукома. 2003.- С.46-54.