



УДК 577.152:612 + 577.354.26:612

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ КАСПАЗ В АПОПТОЗЕ

© 2003 г. Е. А. Мартынова

ГУ НИИ питания РАМН, 109240, Москва, Устьинский проезд, 2/14

Поступила в редакцию 27.12.2002 г. Принята к печати 08.02.2003 г.

Внутриклеточные цистеиновые аспартатспецифичные протеиназы (каспазы) выполняют сигнальную и эффекторную функции при реализации программы гибели клетки. Они функционируют в виде протеолитических каскадов, каждый из которых уникален для определенного типа клеток и сигнала, инициирующего апоптоз. Звенья протеолитических каскадов дублируются, а вся система имеет сигналы обратной связи. Наличие циклов амплификации между парами каспаз, например 3-й и 6-й, 9-й и 3-й, 12-й и 6-й, позволяет многократно усиливать первоначальный сигнал апоптоза. Наличие в клетке физиологических ингибиторов апоптоза, непосредственно взаимодействующих с каспазами, создает многоуровневую регуляторную систему апоптоза. Протеолитические каскады каспаз регулируются также сфинголипидными вторичными мессенджерами, в том числе церамидом, сфингозином и их фосфатами. Кроме того, в клетках показано сцепление сигнальных путей, связанных с каспазами, и убиквитинзависимого протеолиза. Применение экстраклеточных активаторов и ингибиторов каспаз позволяет, в частности, необратимо активировать апоптоз в опухолевых клетках или предотвращать гибель нейронов при нейродегенеративных заболеваниях.

Ключевые слова: апоптоз; каспазы, сигнальные пути, рецепторы; сфинголипиды; церамид; нейродегенеративные заболевания.

ВВЕДЕНИЕ

Апоптоз (или программированная гибель клеток) представляет собой геннозависимый процесс, носящий системный характер и происходящий в соответствии с общим планом развития организма. Апоптоз – интегральный компонент поддержания гомеостаза в течение всей жизни, включая органогенез в эмбриональном периоде, ремоделирование тканей, функционирование иммунной системы и т.д. [1]. Апоптоз всегда требует

затраты энергии, что принципиально отличает его от некроза, который чаще всего является результатом потери внутриклеточной энергии при блокировании митохондриального дыхания и/или гликолитического образования АТР. Резкое падение концентрации АТР в клетке делает невозможным осуществление энергозависимого апоптоза и является одним из механизмов инициации некроза [2].

Апоптоз – эволюционно-консервативный процесс, происходящий, вероятно, из противовирус-

Сокращения: AMPK – циклоаденозинмонофосфатзависимая протеинтироцинкиназа; cAMP – циклический аденоцинонофосфат; Araf-1 – активирующий апоптозные протеиназы фактор 1; $[Ca^{2+}]_i$ – внутриклеточный кальций; CAD – каспазоактивированная дезоксирибонуклеаза; CAPK – церамидассоциированные киназы; CAPP – церамидассоциированные фосфатазы; CARD – каспазоассоциированный рекрутирующий домен; CD – кластеры дифференцировки клеток; CD95/Fas/Apo-1 – рецептор сигнального пути апоптоза; cdk – циклинзависимые киназы; Ced-3 – белок гибели нематоды *Caenorhabditis elegans*; Cer-1-P – церамид-1-фосфат; DAP – апоптозассоциированные белки; DED – эффекторный домен гибели клетки; DFF40/45 – ДНК-фрагментирующий фактор; DISC – рецептор зависимый сигнальный комплекс, индуцирующий апоптоз; EMAP II – эндотелиальный полипептид, активирующий моноциты; ER – эндоплазматический ретикулум; ERK – киназный каскад передачи экстраклеточных сигналов к ядру клетки; F1A α – белок A α , связывающий Fas-рецептор; FADD – белок, ассоциированный с DD-доменами Fas-рецептора; FAF1 – фактор-1 Fas-ассоциированного протеина; Fas – рецептор апоптоза (Fas/APO-1/CD95); FAP-1 – Fas-ассоциированная фосфатаза-1; Fas-L – лиганд Fas-рецептора; FLIP – ингибитор рецепторов апоптоза; GPI – гликофосфоинозит; IAP – ингибитор апоптозных белков; ICE – IL-1 β -конвертирующий фермент; IFN- γ – гамма-интерферон; IkB α – ингибиторная единица ядерного фактора транскрипции NF-kB; IL – интерлейкины; ICAD – ингибитор каспазоактивированной дезоксирибонуклеазы; IP3-киназа – инозитидфосфат-3-киназа; JNK – c-Jun-NH₂-терминальная киназа; MAPK – митогенактивированные протеинкиназы; MBR – основной белок миэлина; NF-kB – ядерный фактор транскрипции kB; NK – натуральные киллеры; PARP – поли(ADP-рибоза)полимераза; PIP2 – фосфатидилинозит-4,5-дифосфат; PI – фосфатидилинозит; PKC – протеинкиназа C; PLC – фосфолипаза C; PTK – протеинтироцинкиназа; PTP – протеинтироинфосфатаза; Rb – белок гена ретинобластомы – регулятор клеточного цикла; RIP – белок, взаимодействующий с Fas-рецептором; SAPK – стрессактивированная протеинкиназа; SARP – секретируемые белки апоптоза; SREBP – белок, связывающий стероидрегулирующий элемент; SMase – сфингомиелиназа; Sph-1-P – сфингозин-1-фосфат; TGF- β – трансформирующий ростовый фактор бета; TNF- α – фактор некроза опухолей альфа; TNF- β – лимфотоксин (фактор некроза опухолей бета); TRAIL – лиганд рецепторов апоптоза семейства TNF; TRAK – TNF-рецепторассоциированная киназа.

Эл. почта: eamartinova@lycos.com; тел./факс: (095) 298-18-50.

ной защиты простейших эукариот [3]. Несмотря на разную кинетику развития программы гибели в клетках различного происхождения, в них наблюдаются сходные морфологические процессы, основанные на ингибировании синтеза белка (на уровне инициации трансляции), протеолизе, деградации ДНК и гидролизе полинуклеотидов [3].

Апоптоз реализуется в виде хорошо организованных сигнальных путей, действующих по единому принципу и включающих в себя протеолиз, который определяет основные морфологические признаки этого процесса. Характерными особенностями апоптоза являются: 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 [4].

Программа гибели клеток координируется действиями продуктов нескольких групп генов. Мутации в генах, ассоциированных с апоптозом, приводят к изменению сигнальных путей апоптоза, что обуславливает многочисленные заболевания человека, в том числе аутоиммунные, опухолевые и нейродегенеративные. Несколько сотен генов участвуют в инициации и поддержании апоптоза. К ним относятся более 40 генов семейства фактора некроза опухолей, кодирующих рецепторы апоптоза и их лиганды, а также гены, кодирующие сериновые протеиназы – перфорин, гранзимы А и В, гранулизин и другие, которые участвуют в киллинге клеток, подвергшихся опухолевой или вирусной трансформации. Проапоптозные гены *bad*, *bak*, *bax*, *bik*, *bag*, *bcl-X_(S)* и другие кодируют белки, ассоциированные с мембранными митохондрий и эндоплазматического ретикулума, что обуславливает их участие в сигнальных путях апоптоза, связанных с этими органеллами. Гены опухолевых супрессоров *p53*, *p16*, *p21*, *p27* и ассоциированных с ними белков являются регуляторными генами апоптоза. К группе генов – инициаторов апоптоза также относятся гены, кодирующие белки SARP1 – SARP3 (Secreted Apoptosis-Related Proteins) и DAP (Death Associated Proteins) с широким спектром биохимической активности, которые активны при рецепторзависимом апоптозе.

Генетический анализ нематоды *Caenorhabditis elegans* выявил три белка сигнального пути апоптоза, кодируемых генами *ced-3*, *ced-4* и *ced-9* (*C. elegans* death gene), мутации которых позволяют клеткам избежать естественной гибели в процессе развития организма [5]. Гены *ced-3* и *ced-4* были идентифицированы как проапоптозные, тогда как ген *ced-9* обладал антиапоптозной активностью. У млекопитающих гомологом белка *Ced-4* оказался

фактор Araf-1, необходимый для активации цитохром-с-зависимого каскада каспаз, а гомологом белка *Ced-9* – член семейства белков *Bcl-2*, которые проводят позитивные сигналы в клетках. Белок *Ced-3* явился гомологом цистеиновой протеиназы млекопитающих ICE (Interleukin-1beta (IL-1 β) Converting Enzyme), или каспазы-1 [6, 7]. С этого момента началось изучение целого семейства протеиназ, названных каспазами (Cysteine ASPartate – specific proteASE – CASPASE) [8].

Типы апоптоза

В настоящее время различают несколько типов апоптоза в зависимости от сигнальных путей и вовлечения вторичных мессенджеров передачи сигналов: 1) рецепторзависимый, 2) активационноиндцированный, 3) глюкокортикоидиндцированный, 4) кислородзависимый, 5) гранзим- и перфоринзависимые типы, 6) инициируемый *bcl-2*-родственными проапоптозными генами, 7) инициируемый секрецируемыми проапоптозными белками (SARP-2 и др.), 8) индуцированный опухолесупрессорными генами *p53*, *p16*, *p21*, *p27* и др. [1].

При развитии апоптоза активируются каскады протеолитических ферментов, специфичные для первичного стимула, что обеспечивает усиление сигналов от рецепторов и взаимодействие с другими сигнальными путями апоптоза. В апоптозе принимают участие протеиназы всех известных классов: сериновые (гранзимы), цистеиновые (катепсин В, каспазы, кальпаины), треониновые (протеасомы), аспартатные (катепсин D) и металлопротеиназы.

В зависимости от участвующих каспаз апоптоз подразделяется на три основные группы: I) рецепторзависимый (инициирующими каспазами являются каспазы-8 и -10); II) связанный с митохондриями (ведущая роль отводится каспазе-9); III) связанный с эндоплазматическим ретикулумом и обусловленный стрессовыми сигналами (инициирующей является каспаза-12). Все эти сигнальные пути в клетке пересекаются, а ведущая роль одного из них определяется интенсивностью первоначального сигнала, инициирующего апоптоз.

Каспазы – внутриклеточные цистеиновые протеиназы

Каспазы (КФ 3.4.22, классификация MEROPS – клан CD, ID:C14) – это внутриклеточные пептидогидролазы, имеющие активированный цистеин внутри высококонсервативного активного сайта, включающего пентапептид QACXG (где X – R, Q или G), который определяет связывание пептидного субстрата и его гидролиз после остатка аспарагиновой кислоты в положении P_1 [8]. В настоящее время все известные каспазы пронумерованы согласно времени их открытия (табл. 1).

Таблица 1. Известные в настоящее время каспазы

Каспазы	Синонимы	Авторы, открывшие каспазы
Каспаза-1	ICE (IL-1 β -converting enzyme)	Cerretti, 1992, Thornberry, 1992
Каспаза-2	Nedd2, ICH-1	Kumar, 1994, Wang, 1994
Каспаза-3	CPP32, YAMA, apopain, IRP	Fernandes-Alnemri, 1994, Tewari, 1995, Nicholson, 1995
Каспаза-4	ICE (rel)II, TX, ICH-2	Munday, 1995, Kamens, 1995, Faucheu, 1995
Каспаза-5	ICE (rel)III, TY	Munday, 1995
Каспаза-6	Mch2	Fernandes-Alnemri, 1995
Каспаза-7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	Fernandes-Alnemri, 1995, Duna, 1996, Lippke, 1996
Каспаза-8	MACH, FLICE, CAP4, Mch5	Boldin, 1996, Muzio, 1996
Каспаза-9	ICE-LAP6, Mch6	Srinivasula, 1996, Duan, 1996
Каспаза-10	Mch4, FLICE2	Fernandes-Alnemri, 1996
Каспаза-11	ICH-3	van de Craen, 1997, Wang, 1996
Каспаза-12		van de Craen, 1997
Каспаза-13		Humke, 1998
Каспаза-14		van de Craen, 1998
	Ced-3 (from <i>C. elegans</i> & <i>vulgaris</i>)	Yuan, 1993
	drlCE, DCP-1 (from <i>Dr. melanomaster</i>)	Fraser, Evan, 1997, Song, 1997

Для изучения каспаз широко используются следующие методы: RPA (multiprobe RNA protection assay); Western blot; FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer); двух- или трехгидридный метод, проточная цитометрия с флуоресцентно-меченными антителами [1, 6–9].

Каспазы обнаружены во всех тканях млекопитающих, где они выполняют различные физиологические функции. Для каждого типа клеток характерны уникальные каспазозависимые сигнальные пути. Каспазы-1 и -11 участвуют в активации ферментов, процессинге провоспалительных цитокинов [10, 11], каспазы-3, -8 и -9 – в ремоделировании клеток и тканей, в дифференцировке и пролиферации гемоцитарных клеток, в негативной селекции тимоцитов, в развитии мозга и сердечной мышцы в эмбриональный период и регулируют активность ферментов головного мозга [12–18], каспаза-3 – в противовирусной защите путем активации IL-16, каспаза-6 – в амилогенезе и ремоделировании нервной ткани человека. Каспаза-14 активирует ферменты терминальной дифференцировки кератиноцитов [19, 20]. Изменение физиологического состояния клетки приводит к изменению мишней действия каспаз, например, при апоптозе каспазы активируют мембранные факторы транскрипции SREBP-1 и SREBP-2, которые в живой клетке поддерживают гомеостаз холестерина и активируются другими ферментами [11].

Структура каспаз

Каспаза синтезируется в клетке первоначально в виде неактивного профермента, состоящего из *N*-концевого полипептида (так называемого продомена), большой и малой субъединиц и связующего региона между ними (рис. 1).

Образование активных форм каспаз инициируется протеолитическим расщеплением по связи Asp-Xaa во внутренних сайтах между доменами, что приводит к последовательному высвобождению малой субъединицы, связующего региона, большой субъединицы и удалению продомена. Большая и малая субъединицы из разных прокаспаз собираются в единый комплекс. Активная форма каспазы – это тетramer, в котором связь осуществляется двумя малыми субъединицами, окруженными двумя большими субъединицами (рис. 1). Два каталитических центра формируются аминокислотами большой и малой субъединиц [21, 22].

В протеолитических каскадах апоптоза каспазы подразделяются на инициирующие и эффекторные. Каспазы-3, -6, -7 и -14 имеют короткие продомены и функционируют, в основном, как эффекторы. Инициирующие каспазы имеют продомены большой молекулярной массы, включающие регуляторные модули. Наличие модулей определяет взаимодействие с регуляторными молекулами и расположение каспазы в сигнальном пути апоптоза. Характеристики прокаспаз и субъединиц их активных форм приведены в табл. 2.

Показано наличие трех типов модулей в продоменах инициирующих каспаз: CARD (Caspase

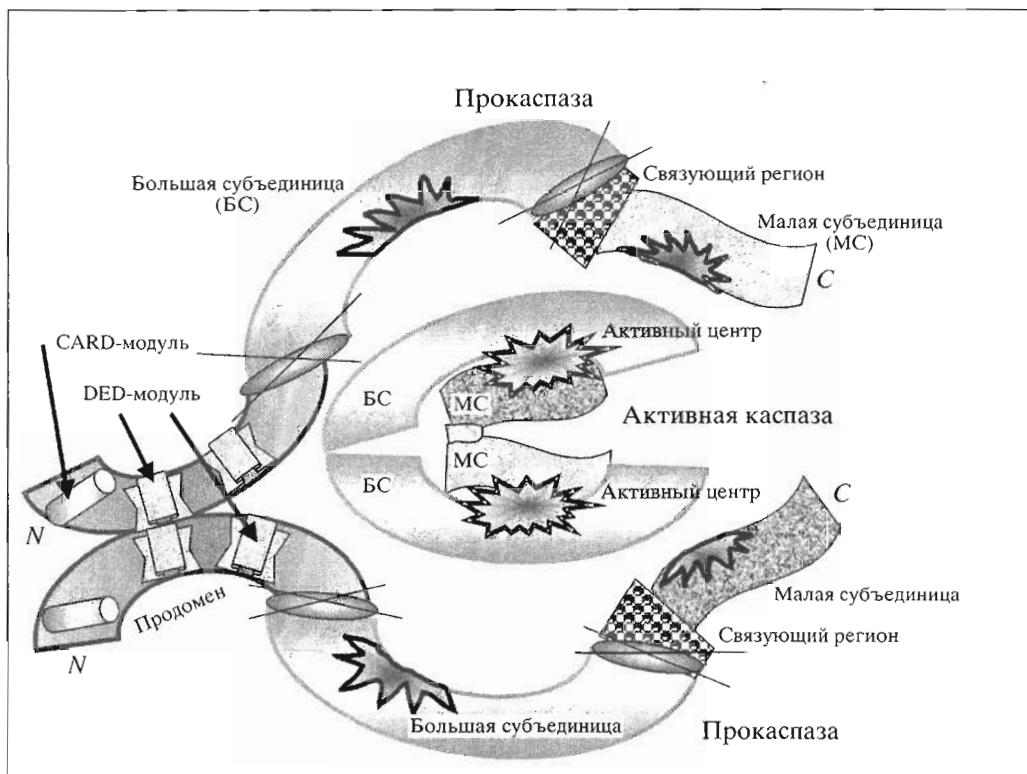


Рис. 1. Образование активных каспаз. Активация каспаз начинается с распознавания и взаимодействия модулей DED (Death Effector Domain) или CARD (Caspase Associated Recruitment Domain) продоменов двух прокаспаз. Последующее протеолитическое расщепление приводит к образованию большой и малой субъединицы и отделению продомена. Большая и малая субъединицы из разных прокаспаз собираются в димер, который соединяется со вторым димером с образованием активного тетрамера, в котором связь осуществляется малыми субъединицами. Каталитические центры формируются из аминокислот большой и малой субъединиц.

Associated Recruitment Domain), DED (Death Effector Domain) и BIR (Baculovirus Inhibitor Apoptosis Protein Repeat) [23–25]. Взаимодействующие с каспазами белки, содержащие модули CARD, разделяются на четыре подгруппы: NOD, BIMP, Decoy и адапторы; при этом существенную роль играют две группы – NOD и адапторы. К подгруппе NOD относятся: Apaf-1 (активирует прокаспазу-9 и образует комплексы с цитохромом *c*, Bcl-x_(L), прокаспазой-8); Nod1/CRAD4h (образует комплексы с прокаспазой-9); Ipaf/CARD12h (образует комплексы с прокаспазой-1, Nod2); DEFCAP/CARD7 (образует комплексы с прокаспазами-1, -2, -9, Apaf-1); белки DARK, Nod2, CIITA и др. В подгруппу адапторов входят белки: RAIDD/CRADD (образует комплексы с прокаспазами-2 и -3); адапторы, имеющие структуру CARD/DD: R18-2 (дает комплексы с прокаспазой-1 или входит в состав сигнального комплекса рецепторов апоптоза); Bcl-10 (формирует комплексы с адапторными белками рецепторов апоптоза); ASC (образует комплексы с прокаспазой-1, CARD12 и т.д.).

Белки, несущие модули DED, подразделяются на адапторный и DEDD-типы. К первому относят-

ся все адапторные белки сигнального комплекса рецепторов апоптоза и ингибиторный белок FLIP. Они имеют по два DED₃-модуля и функционируют в олигомерной форме, что позволяет одновременно взаимодействовать вторичным мессенджерам нескольких сигнальных путей. Белки DEDD-типа связаны с сигнальным комплексом рецепторов апоптоза и непосредственно передают сигнал в ядро клетки [25].

Белки, несущие модули BIR, осуществляют связь каспаз с физиологическими ингибиторами, а также с убиквитинзависимым протеолизом. Модуль BIR-2 является фрагментом ингибиторного белка апоптоза IAP. Взаимодействие модулей приводит к образованию комплекса BIR₂×3/CARD/RING-finger, причем последовательность “RING-finger” осуществляется связью с убиквитин зависимой лигазой. Этот тип связей достоверно показан для каспаз-3, -7 и -9 [25].

Для пар каспаз-3/-6, -3/-9 и -12/-6 показано наличие циклов амплификации, когда одна каспаза активирует другую, предшествующую ей в сигнальном пути, что многократно усиливает первоначальный сигнал и позволяет быстро элиминировать структурные компоненты клетки.

Таблица 2. Характеристика прокаспаз человека и их активных форм

Каспазы	Проферменты <i>M</i> (Да)	Активные формы каспаз*	Продомён**	Локус в геноме человека
Каспаза-1	45 159 (p45)	p20; p10	Д	11q22.2-q22.4
Каспаза-2	48855	p19; p12/14	Д	
Каспаза-3	31594	p17; p12	К	4q33-q35.1
Каспаза-4	43262	?	Д	11q22.2-q22.3
Каспаза-5	47814	p20; p10	Д	11q22.2-q22.3
Каспаза-6	33409	p18; p11	К	4q25
Каспаза-7	34276	p20; p11	К	10q25.1-q25.2
Каспаза-8	55391	p18; p10	Д	2q33-q34
Каспаза-9	46322	p35; p10	Д	1p36.1-p36.3
Каспаза-10	58878	p23/17; p12	Д	2q33-q34
Каспаза-11	43000		Д	
Каспаза-12			Д	
Каспаза-13			Д	
Каспаза-14		p18; p11	К	19p13.1

* Большие и малые субъединицы: p20- и p10-субъединицы каспазы-1 с *M* 20 и 10 кДа и т.д.

** Д – длинный продомен; К – короткий продомен.

Таблица 3. Активные центры и субстраты каспаз

Каспазы	Активный центр*	Субстраты
Каспаза-1	QACRG	про-IL-1 β , про-IL-18, прокаспазы-1, -3, -4, PARP
Каспаза-2	QACRG	PARP
Каспаза-3	QACRG	PARP, ДНК-протеинкиназа, РКСδ, Rb-протеин, DFF, актин, фодрин, MDM2, UI-70
Каспаза-4	QACRG	про-IL-1 β , прокаспаза-1, про-IL-16
Каспаза-5	QACRG	ламины A, B1/B2, C; UI-70, PARP
Каспаза-6	QACRG	ламины A, B, C; PARP, NuMa; прокаспазы-3, -12
Каспаза-7	QACRG	PARP, прокаспазы-3, -6, -7, -14; кинектин, ЕMAP II
Каспаза-8	QACQG	PARP, прокаспаза-3
Каспаза-9	QACGG	прокаспазы-3, -7
Каспаза-10	QACQG	прокаспазы-3, -7 <i>in vivo</i> ; все прокаспазы <i>in vitro</i>
Каспаза-11	QACRG	прокаспазы-1, -3
Каспаза-12	QACRG	прокаспазы-3, -9; кальпаин
Каспаза-13	QACRG	PARP
Каспаза-14	QACRG	ферменты активации кератиноцитов

* Приведен фрагмент последовательности, включающий каталитический остаток цистеина.

Активные центры и субстраты каспаз

Активные центры каспаз обладают консервативными фрагментами аминокислотной последовательности Gln-Ala-Cys-Xaa-Gly, включающими каталитический остаток цистеина (табл. 3) [26]. Физиологическими субстратами каспаз (табл. 3) являются белки, расщепление которых приводит к образованию их активных форм (IL-1 β , IL-18, кальпаин, проферменты активации кератиноцитов и т.д.) [6, 7, 10–12, 18–20]. Каспазы участвуют в изменении всех частей клетки при апоптозе, что определяет его морфологические характеристики. Они расщепляют структурные белки цитоскелета (актин, фодрин), фокальные киназы, что при-

водит к потере адгезии клетки, а также РАК-2 и гельсолин, что модифицирует клеточную мембрану. Важно подчеркнуть, что каспазы расщепляют только незначительную фракцию белков в клетке, что, однако, достаточно для ее полной разборки на апоптозные тельца [1].

Каспазы обусловливают такой важный признак апоптоза, как олигонуклеосомальную фрагментацию ДНК, которая осуществляется ДНК-фрагментирующими факторами, активированными каспазозависимыми эндонуклеазами, а также при каспазозависимом расщеплении PARP и потере ферментов репликации и сплайсинга ДНК.

К настоящему времени открыто несколько изомеров поли(ADP-рибоза)полимеразы (PARP, КФ 2.4.2.30) и показано их участие в регуляции структуры хроматина и в регуляции транскрипции. PARP-1 отвечает за способность клетки к полигибридизированнию, PARP-4 катализирует образование полимеров ADP-рибозы, ковалентно связанных с белками, используя ATP и NAD⁺ как субстраты. PARP активируется при повреждении одной или двух нитей ДНК, что в физиологическом состоянии приводит к восстановлению ДНК. Ингибирование PARP приводит к нарушению репарации ДНК и нестабильности генома [27]. Повышенная активация PARP на фоне стресса сопровождается некрозом клетки в связи с потерей NAD⁺ и ATP [28].

Каспазы расщепляют белок гена ретинобластомы (Rb-протеин), ингибитор p21^{WAF1} и другие регуляторные молекулы клеточного цикла. Субстратами каспаз, важными для реализации апоптоза, служат также изоформы протеинкиназы C – δ, ξ и ε, рецептор фосфоинозит-трифосфата, регулирующий активность Ca²⁺-каналов и уровень [Ca²⁺]_i [29], фосфолипазы A₂ и PLC-γ-1; расщепление последней каспазами-3 и -7 идет по сайту Ala-Glu-Pro-Asp⁷⁷⁰↓ [30].

Классификация каспаз

В зависимости от гомологии последовательностей ферментов или вариабельности региона P₂–P₄ субстрата, каспазы классифицируются на подсемейства или группы (табл. 4). В проведении сигнала от рецепторов апоптоза важную роль играют каспазы II и III групп, связывающие фрагменты DEXD и (IVL)/EXD последовательностей субстратов [5, 8, 12, 23–28].

Каспазы можно также подразделить на две группы в зависимости от наличия модулей CARD (каспазы-9, -2, -1, -4, -5, -13, -11, -12) или DED (каспазы-8, -10, -3, -7, -6, -14) [31].

Подсемейство каспаз ICE

Подсемейство ICE включает ферменты, максимально соответствующие каспазе-1 по аминокислотной последовательности продомена, а также видоспецифичные изоформы самой каспазы-1 [32] (табл. 4). Каспазы-1, -4 и -5 составляют отдельную группу ферментов, связывающих фрагмент WEHD последовательности субстрата; они участвуют в воспалительных реакциях, а их роль в апоптозе сводится к передаче сигналов путем активации цитокинов [33–35].

Каспаза-1, первая идентифицированная каспаза, является IL-1β-конвертирующим ферментом (КФ 3.4.22.36, MEROPS, ID:C14.001), катализирующим протеолиз неактивного про-IL-1β (33 кДа) в активный IL-1β (17 кДа) по сайту Asp¹¹⁶↓Ala¹¹⁷

Таблица 4. Современные варианты классификации каспаз

Классификация каспаз			
Согласно гомологии последовательностей:		Согласно вариабельности региона P ₂ –P ₄ субстрата:	
подсемейство	каспазы	группы (фрагменты последовательности)	каспазы
ICE	1, 4, 5, 13, 11, 12	I (-WEHD-)	1, 4, 5
Ced-3/CPP32	3, 6, 7, 8, 9, 10	II (-DEXD-)	3, 2, 7
ICH-1/Nedd2	2	III (-IVL/EXD-)	6, 8, 9, 10

[6, 7]. В макрофагах каспаза-1 активирует про-IL-18 по сайту Asp-Xaa с образованием IL-18 (IFN-γ-индуктора, IGIF), который стимулирует в лимфоцитах синтез IFN-γ и экспрессию Fas-лиганды (Fas-L) [36, 37]. Это определяет роль каспазы-1 как регулятора провоспалительных цитокинов.

Ген человека, кодирующий каспазу-1, картирован на плече 11-й хромосомы в сайте, часто вовлекаемом в активацию при опухолевом росте. Альтернативный сплайсинг дает четыре изоформы каспазы-1 (404 а. о.) с различными эффектами при апоптозе [38]. Каспаза-1 человека проявляет высокую гомологию с подобными ферментами млекопитающих: для лошадиной каспазы-1 (405 а. о.) идентичность составляет 72 и 63% с ферментами человека и мыши при консервативности сайтов протеолитического расщепления [39]. Каспаза-1 человека может гидролизовать мышиные IL-1β и IL-18 [40]. Мыши, дефицитные по каспазе-1, дефицитны по синтезу IFN-γ, индуцированному бактериальным липополисахаридом [40].

Согласно общепринятой модели, активация про-каспазы-1 начинается по связи Asp²⁹⁷↓Ser²⁹⁸ [41, 42]. Сначала происходит ассоциация двух p45-субъединиц и их процессинг. При этом фрагменты 120–297 из p20 (большой субъединицы) и 317–404 из p10 (малой субъединицы), которые происходят из разных предшественников, формируют один активный центр. Упрощенная схема образования активной формы каспазы представлена на рис. 1. Этот процесс идет с образованием нескольких интермедиатов. Субъединица p10 высвобождается из предшественника p45 прежде субъединицы p20, но только после гидролиза связующего региона (а. о. 298–316). N-Концевой продомен высвобождается последним, так как выполняет регуляторную роль и абсолютно необходим для димеризации и аутоактивации фермента [43]. Прокаспаза-1 локализуется в цитозоле, откуда после активации перемещается в плазматическую мемброну.

Активная форма каспазы-1 представляет собой тетramer, в котором две большие p20-субъе-

диницы окружают две малые p10-субъединицы (рис. 1). Активный центр формируется сульфогидрильной группой Cys²⁸⁵ и имидазольным кольцом His²³⁷ p20-субъединицы, образующими каталитическую диаду, стабилизация которой осуществляется за счет водородных связей с амидными группами Cys²⁸⁵ и Gly²³⁸. При этом два остатка аргинина (Arg¹⁷⁹ из p20 и Arg³⁴¹ из p10) образуют водородные связи с аспартатом в P₁-сайте субстрата. Мутации активного пентапептида Gln-Ala-Cys-Arg-Gly приводят к потере каталитической активности. Боковые цепи остатков фрагмента Val³³⁸-Pro³⁴³ субъединицы p10 взаимодействуют с P₂-P₄-сайтами специфического ингибитора каспазы-1 [21, 22].

Гетеродимер p10/p20 относится к α/β белкам и функционирует как единый домен. Энзиматический корп состоит из шести β-тяжей: пяти параллельных (а. о. 164–170, 199–205, 230–236, 278–283, 327–331) и одного антипараллельного (а. о. 388–393). Четыре первые тяжа относятся к p20-субъединице, остальные два – к p10. Шесть α-спиралей (а. о. 139–149, 182–196, 207–226, 257–269, 348–363, 366–377) располагаются параллельно друг другу, образуя единую структуру под углом 60° по отношению к β-кору [21, 22].

Каспаза-1 содержит модуль CARD, который необходим для взаимодействия между белками в сигнальных путях. Белок CARD-8, обнаруженный у человека в моноцитах, лимфоцитах и клетках плаценты, имеет в C-концевом регионе модуль CARD, что позволяет ему физически взаимодействовать с каспазой-1 и регулировать ее активность [44].

Перенос гена каспазы-1 человека в клетки кожи трансгенных мышей приводит к образованию язв и стойкому дерматиту [37]. Это обусловлено воспалительными инфильтратами, в которых значительно повышен уровень активности IL-1β, что приводит к апоптозу кератиноцитов [45]. Дефицит каспазы-1 обуславливает супрессию синтеза провоспалительных цитокинов и значительно снижает воспалительную реакцию [46].

Доминантным регулятором в сигнальных путях апоптоза с участием каспазы-1 является церамид, синтезированный *de novo*, что показано с помощью специфического ингибитора церамидсинтазы фумонизина B1 [47]. Другой путь церамида, образованный при распаде сфингомиелина плазматической мембранны при активации сфингомиелиназы интерлейкином-1β, активированным каспазой-1, необходим на ранних стадиях проведения апоптозного сигнала [48, 49].

Каспазы-4 и -5 (MEROPS, ID : C14.007 и C14.008) проявляют 52% гомологии с каспазой-1 человека, каспаза-4 также имеет 30% гомологии с каспазой-2. Прокаспазы-4 и -5 локализуются в цитоплазме, имеют большую молекулярную массу и процессируются с образованием активных тетramerов p20/p10. Каспаза-4 может аутоката-

лизироваться и активировать каспазу-1 [35] или активироваться в ответ на связывание Fas-рецепторов (Fas-R) антителами. Мутации в активном центре каспазы-4 удлиняют передачу сигналов от Fas-R, а антитела к каспазе-4 блокируют Fas-зависимый апоптоз [50]. Гомологом каспазы-4 человека является каспаза-11 мыши.

Каспаза-11 (MEROPS, ID:C14.012) проводит сигнал апоптоза в олигодендроцитах и участвует в развитии аутоиммунной демиелинизации [51]. Каспаза-11 регулирует образование функциональных IL-1β и IL-18 в клетках нервной системы мышей, а также каспазы-1, что позволяет рассматривать ее как провоспалительный фермент [52]. Каспаза-11 проводит сигнал апоптоза в астроцитах и клетках микроглии через каспазу-3 [52, 53]. Фермент протеолитически активируется катепсином В и каспазами, локализованными в лизосомах [54].

Каспаза-13 (ERICE – Evolutionary Related IL-1β Converting Enzyme) (MEROPS, ID:C14.017) относится к подсемейству ICE на основании филогенетического анализа. Экспрессия каспазы-13 показана в клетках MCF-7 карциномы молочной железы человека, линии 293Н клеток эмбриональной почки и в периферических мононуклеарах быка [55]. Подобно другим членам подсемейства ICE, каспаза-13 принимает участие в рецепторзависимом апоптозе и активируется каспазой-8 [56].

Каспаза-14 (MEROPS, ID:C14.018) мышей обнаружена во всех эмбриональных тканях и в коже взрослых особей, имеет 83% гомологии с каспазой-14 человека. Каспаза-14 человека экспрессируется в дифференцирующихся кератиноцитах поверхностного слоя эпидермиса, в гранулярном слое волосяных фолликулов и субаценоэзных узелках. Она катализирует образование активной формы ферментов при терминальной дифференцировке кератиноцитов, создающих защитный барьер кожи [20]. В этом случае каспаза-14 процессируется только каспазой-8 и не взаимодействует с сигнальными путями апоптоза [31].

N-Концевой продомен каспазы-14 имеет крайне малую молекулярную массу, что вынуждает фермент взаимодействовать с каспазами-1, -2, -4, -8 и -10, имеющими продомены большой молекулярной массы. Каспаза-14 может быть вторичным мессенджером сигнальных путей апоптоза, инициированных лигандами Fas-L, TRAIL или гранзимом В. Активность ферmenta ингибируется в присутствии экстраклеточного кальция.

Подсемейство Ced-3/CPP32

Каспаза-3 (MEROPS, ID : C14.003) обладает максимальным подобием белку Ced-3 нематоды и возглавляет соответствующее подсемейство. Это ведущая эффекторная каспаза апоптоза, которая экспрессируется во всех тканях. Каспаза-3 – цито-

зольный фермент, при некоторых типах апоптоза ее находят в цитоплазме клеток в виде комплексов с M 250 или 600 кДа [57].

Активация прокаспазы-3 (32 кДа) начинается по связи $\text{Asp}^{28}\downarrow\text{Ser}^{29}$, затем по $\text{Asp}^{175}\downarrow\text{Ser}^{176}$ между большой и малой субъединицами; отщепление продомена идет по Asp^9 [14, 58, 59].

Каспаза-3 подобна каспазе-1 по структуре, различия определяются строением S_4 -сайта, который у каспазы-3 существенно меньше по размеру и имеет внутренний карман, связывающий боковую цепь остатка Asp в положении P_4 . Эта особенность объясняет требование к наличию Asp в позиции P_4 субстрата и ингибиторов. Субстратная специфичность определяется последовательностью DEVD, что позволяет каспазе-3 расщеплять ключевые клеточные белки.

При инициации апоптоза каспаза-3 блокирует передачу сигналов ростовых факторов. Этот эффект определяется протеолизом G4-Gd1-белка семейства Rho GTP-аз, который быстро укорачивается до фрагмента с M 23 кДа. Каспаза-3 расщепляет протеинкиназы PKC- δ (сайт $\text{DMQD}^{330}\downarrow\text{N}$ [40]), PKC- ξ (сайт $\text{DEVD}^{354}\downarrow\text{K}$) и PKC- ϵ . Протеолиз той или иной изоформы PKC зависит от сигнала, инициирующего апоптоз, и типа клеток [60]. Этот эффект блокируется в клетках, гиперэкспрессирующих белок $\text{Bcl-x}_{(L)}$ или белок p35 бакуловируса.

Субстратами каспазы-3 при рецепторзависимом апоптозе являются факторы транскрипции. Ингибиторная субъединица I κ B α фактора транскрипции NF- κ B расщепляется каспазой-3 по связи $\text{Asp}^{31}\downarrow\text{Ser}^{32}$, что прерывает сигналы выживания клетки, связанные с активацией NF- κ B при распознавании рецепторов TNF [61]. Каспаза-3 расщепляет фактор eIF4G, регулирующий связывание мРНК с рибосомой, что приводит к ингибированию трансляции при рецепторзависимом апоптозе [62].

Активация каспазы-3 сопровождается повышением активности белков – ингибиторов клеточного цикла – p21^{WAF1} и p27^{KIP1} и дефосфорилированием Rb-протеина, что приводит к остановке клеточного цикла [63].

Фрагментация ДНК связана с субстратами каспазы-3 – PARP и комплексом DFF45/ICAD (DNA Fragmenting Factor/Inhibitor of Caspase Activated DNase), протеолиз которого приводит к образованию активной формы каспазозависимой эндонуклеазы DFF40/CAD [64].

Опухолевый супрессор p53 активирует каспазу-3, которая гидролизует белок MDM2 (регулятор p53) по остатку Asp^{361} с образованием фрагмента с M 60 кДа. Параллельно с делецией гена каспазы-3 нерасщепленные комплексы p53/p60 найдены во многих опухолевых клетках, что позволяет им избежать апоптоза [65].

Каспаза-6 (MEROPS, ID : C14.005) относится к подсемейству Ced-3 и является эффекторной каспазой апоптоза. Ген каспазы-6 человека обладает высокой гомологией с генами каспаз-3, -2, -1 и геном *ced-3* нематоды. Альтернативный сплайсинг дает два транскрипта: α -изоформу, кодирующую полноразмерный белок с проапоптозной активностью, и укороченную β -изоформу [66].

Прокаспаза-6 – это цитозольный белок с M 33 кДа, который активируется каспазой-3 расщеплением по остаткам Asp^{23} , Asp^{179} или Asp^{193} с образованием активного тетрамера p18/p11. При депривации сыворотки в культуральной среде *in vitro* в цитоплазме клеток обнаруживаются комплексы с M 450 кДа, включающие активную каспазу-6 [57]. В протеолитическом каскаде каспаза-6 может активировать прокаспазу-3 по сайту $\text{IETD}\downarrow\text{S}^{176}$ между большой и малой субъединицами. При замене остатка Asp^{175} на Ala протеолиз не происходит [15]. В некоторых клетках, например энteroцитах, через 15 мин после связывания рецепторов апоптоза активируется каспаза-6, которая гидролизует PARP, и только через 30 мин активируется каспаза-3. Взаимная активация каспаз-6 и -3 создает цикл амплификации протеолитического сигнала, что характерно для апоптоза.

С активностью каспаз-3 и -6 связаны основные морфологические изменения в ядре клетки (рис. 2). Каспаза-3 входит в ядро при повышении лимита диффузии высокомолекулярных белков через ядерные поры при инактивации системы активного транспорта белков каспазой-9. На внутренней поверхности ядерного конверта расположены белки ламин B, LAP2, LBR и другие, связанные с хроматином. Каспаза-6 расщепляет ламин B по сайту $\text{VEID}\downarrow\text{N}$, а также ламины A и C 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 пор на ядерной мембране, что определяет формирование вакуолей, сморщивание ядра и его фрагментацию [59, 67].

Каспаза-6 активирует ядерный белок p84N5, который, благодаря наличию в нем DD-домена, способен сам активировать каспазу-6 [64]. Белок p84N5 связывает N-концевой регион Rb-протеина, что приводит к остановке клеточного цикла в G2/M-фазе. Повышение экспрессии белка p84N5 повышает активацию фактора транскрипции NF- κ B, а также синтез проапоптозных белков Bak, $\text{Bcl-x}_{(S)}$, сцепленных с митохондриальным путем апоптоза. Каспаза-6 создает, как минимум, два амплифицирующих цикла в апоптозном каскаде и связывает рецепторзависимый сигнальный путь с сигналами апоптоза в ядре клетки [68].

Каспаза-7 (MEROPS, ID : C14.004) относится к эффекторным каспазам и активируется в резуль-

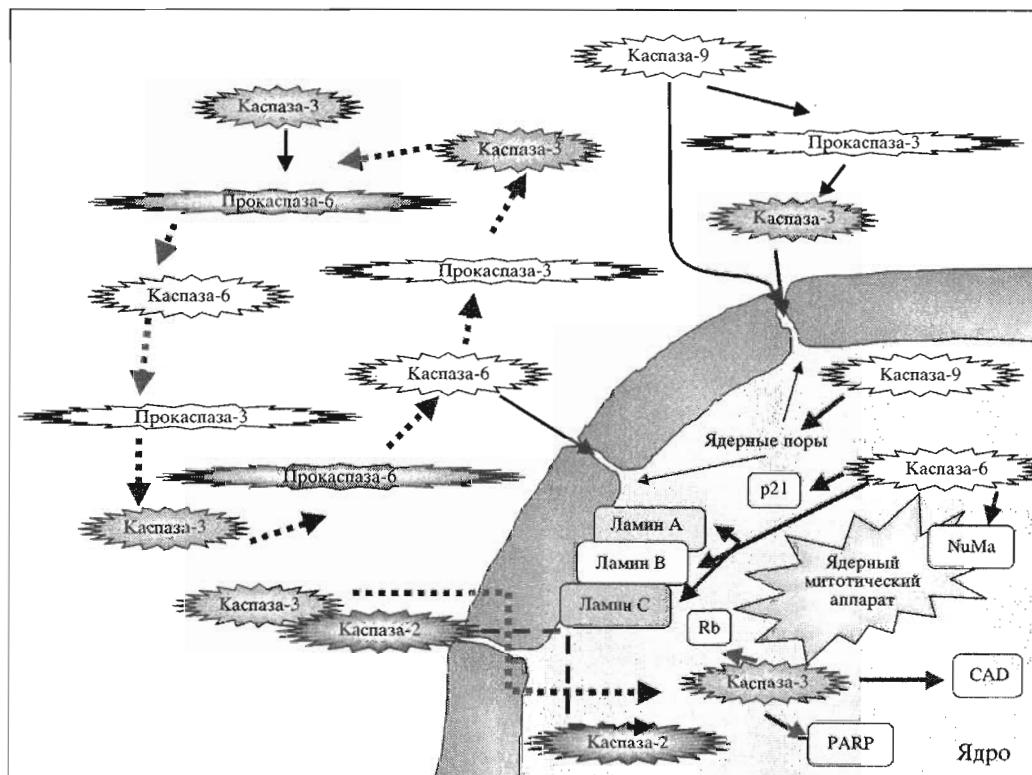


Рис. 2. Ядерные эффекты каспаз. Ядерная изоформа прокаспазы-2 имеет сигнальные последовательности, позволяющие ей проникать через ядерные поры активным транспортом. Взаимодействуя с продоменом прокаспазы-3, каспаза-2 транспортирует ее в ядро. Активная форма каспазы-3 проникает в ядро после нарушения каспазой-9 ядерного транспорта, что приводит к повышению лимита диффузии высокомолекулярных белков через ядерные поры. Каспаза-6 транспортируется в ядро, где синергично с каспазой-3 расщепляет белки ядерного матрикса, ядерного конверта, митотического аппарата и регуляторы клеточного цикла (ламины A, B и C, белок NuMa, Rb-протеин, ингибиторы p21 и p27, PARP и т.д.). Каспаза-3 расщепляет комплекс ДНК-фрагментирующего фактора с ингибитором, в результате активируется каспазозависимая эндонуклеаза CAD. Пары каспаз-3/-6 и -3/-9 взаимно активируют друг друга, что создает циклы амплификации апоптозного сигнала.

тате действия протеолитического каскада с участием каспаз-8, -6, -3 и -9, инициированного связыванием рецепторов апоптоза или гранзимом В [69]. Прокаспаза-7 представляет собой цитоплазматический белок p34, широко экспрессированный в клетках, активация которого приводит к образованию тетрамера p20/p11 [16]. Изоформы прокаспазы-7 с укороченными продоменами способны сами индуцировать апоптоз в опухолевых клетках [70].

Субстратами каспазы-7 являются многие клеточные белки, в том числе кинектин – рецептор молекулярного мотора кинезина, участвующий в везикулярном транспорте по микротрубочкам и в мембранным движении [71]. Каспаза-7 расщепляет эндотелиальный пептид, активирующий моноциты (EMAP II), который является провоспалительным цитокином и хемоатрактантом для лейкоцитов, что делает каспазу-7 связующим звеном между воспалением и апоптозом [72].

Каспаза-8 (MEROPS, ID : C14.009) относится к группе III по субстратной специфичности (табл. 4) и значительно отличается от каспаз-1 и -3 в обла-

сти связывания субстрата. Каталитическая триада каспазы-8 состоит из Cys³⁶⁰, His³¹⁷ и Arg²⁵⁸ [73].

Прокаспаза-8 имеет продомен большой молекулярной массы, включающий два модуля DED в виде тандема, которые работают как регуляторные последовательности [74]. С-Концевой DED потенцирует связывание молекул при апоптозе, N-концевой обладает доминантно-негативным действием в том случае, если связывается с другим DED-модулем на каспазе-8. Каспаза-8 является классической инициирующей каспазой при передаче сигналов от рецепторов апоптоза Fas, TNF-R1, DR1-5 [24] (рис. 3). С помощью DED-модулей каспаза-8 связывается с белком FADD, входит в сигнальный комплекс DISC, олигомеризуется с образованием активного тетramerов p18/p10 и инициирует протеолитический каскад [18].

Каспаза-8 имеет множество изоформ. Изоформы с большим продоменом участвуют в иницииации апоптоза, а изоформы с укороченными продоменами обладают выраженным антиапоптозным эффектом [23]. Это указывает на регуляторную роль

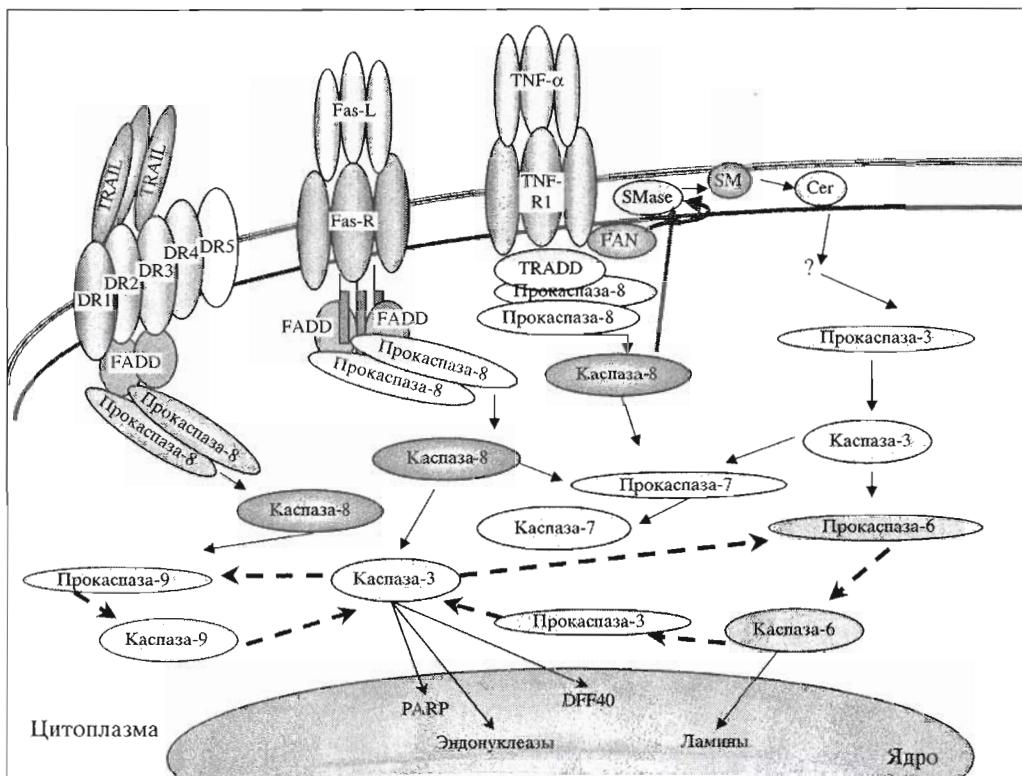


Рис. 3. Схема протеолитического каскада, инициируемого каспазой-8. Активация прокаспазы-8 происходит в результате взаимодействия с белками FADD или TRADD в сигнальном комплексе, связанном с рецепторами апоптоза Fas, TNF-R и DR. В начальной стадии апоптоза активная каспаза-8 сначала перемещается к плазматической мемbrane и активирует нейтральную сфингомиелиназу (SMase), которая гидролизует сфингомиелин (SM) с образованием пула церамида (Cer), необходимого для кэплинга рецепторов. Белки сигнального пути церамида активируют прокаспазу-3. Каспаза-3 активирует прокаспазу-6. Каспаза-8 активирует прокаспазу-7 и, на более поздних стадиях апоптоза, прокаспазу-9. Протеолитическая активность каспаз-3, -6, -7 и т.д. приводит к расщеплению ключевых структурных белков клетки и создает предпосылки для формирования апоптозных телец.

каспазы-8 в рецепторзависимой передаче сигналов апоптоза, осуществляющейся на уровне трансляции генов. Потеря экспрессии каспазы-8 при злокачественных опухолях приводит к полной резистентности к TRAIL-зависимому апоптозу [75].

Каспаза-8 может активировать фактор транскрипции NF-κB и непосредственно взаимодействовать с киназами RIP, IKK1 и IKK2 в NF-κB-зависимом сигнальном пути [76].

Каспаза-10 (MEROPS, ID : C14.011) экспрессируется в большинстве тканей, максимально подобна каспазе-8, хотя имеет с ней разные субстраты [77]. Альтернативный сплайсинг гена каспазы-10 дает 4 изоформы – *a*, *b*, *c*, *d*; все они участвуют в апоптозе. Укороченная изоформа *c*, способная формировать перинуклеарные фиброзные структуры, играет специфическую роль в TNF-зависимом апоптозе. Изоформа *d* представляет собой гибрид, содержащий малую субъединицу от изоформы *a*, а остальную часть – от *b* и имеющий несколько сниженную апоптозную активность. Все эти изоформы регулируют также процессы эмбрионального развития [78].

Прокаспаза-10 (479 а. о.) содержит такой же активный пентапептид, как и каспаза-8, и активируется расщеплением по остатку Asp³⁷² между большой и малой субъединицами. Два модуля DED в *N*-концевом регионе прокаспазы-10 взаимодействуют с белком FADD; образованная в результате активная каспаза-10 формирует собственный сигнальный путь, иной, чем каспаза-8. Подобно прокаспазе-8, прокаспаза-10 образует фиброзные структуры в перинуклеарном пространстве, локализуясь рядом с белком FADD. Мутанты, утратившие 20 а. о. в продомене в области сигнальной последовательности DD, теряют способность формировать фиброзные структуры и не способны входить в DISC-комплекс. Избыток прокаспаз-8 и -10 действует как доминантно-негативный фактор в регуляции апоптоза [79].

Активность каспазы-10 повышается при ишемии клеток гиппокампа, при этом она локализуется вместе с белком FADD и каспазой-3 [80]. Повышенная экспрессия каспазы-10 характерна для клеток иммунной системы при активационно-

дуцированном апоптозе лимфоцитов, аутопролиферативном синдроме и анемии при миеломе [77].

Участие каспаз в рецепторзависимых сигнальных путях апоптоза

К рецепторам апоптоза относятся четыре рецептора фактора некроза опухолей альфа (Tumor Necrosis Factor, TNF- α) и рецепторы TNF- α , CD40, CD30, CD27, Fas/APO-1/CD95, R75^{low} NTF, TGF- β , рецепторы гибели клетки (Death Receptors) DR1 – DR5, TRAIL-R2 и другие [81]. Эти гликопротеины обладают высокой гомологией в экстраклеточных доменах, распознающих лиганды, а также в цитоплазматических участках. При наличии разных рецепторов апоптоза в одной клетке специфичность сигнала может регулироваться фосфотирозинфосфатазой (PTP) p15, которая ингибирует сигнал от Fas-R и повышает интенсивность сигнала от TNF-R1, что показано для клеток нервной ткани [82].

Общим для рецепторов апоптоза является функционирование в виде активных гомотримеров, что позволяет одновременно использовать несколько цитоплазматических сигнальных последовательностей для связи с многочисленными сопряженными сигнальными белками. Формирование тримерного комплекса рецепторов завершается кэппингом, то есть суперагрегацией тримеров в виде “шапочки”, что является церамидзависимым процессом [83].

В белках, принимающих участие в рецепторзависимых путях апоптоза, можно выделить несколько общих сигнальных последовательностей. Кроме модулей DED и CARD, идентичных модулям каспаз, имеются DD-домены (Death Domain) [84]. DD-домен представляет собой последовательность из 68 а.о. в C-концевом регионе цитозольного участка рецептора, который связывает адапторные молекулы и участвует в проведении апоптозного сигнала. DD-домен имеется на рецепторах TNF-R1, Fas-R, рецепторассоциированных белках и т.д.

TNF- α является многофункциональным регуляторным цитокином. Связывание рецептора TNF-R1 сопряжено с несколькими сигнальными путями, которые могут активироваться одновременно, вторичными мессенджерами являются церамид, каспазы, NO, фактор транскрипции NF- κ B и др. (рис. 4). Взаимодействие сигнальных путей с участием каспаз и NF- κ B-зависимых сигналов происходит по принципу обратной связи. Каспаза-3 гидролизует NF- κ B с потерей C-концевого трансактивационного домена. В результате образуется комплекс p65/RelA, который транслоцируется в ядро и доминантно-негативно ингибирует активность NF- κ B- зависимых генов [85]. Активация каспаз связана с активностью TNF и его рецепторов. Дефицит TNF- α сопровождается за-

медлением или ослаблением синтеза мРНК каспаз, тогда как нокаут рецепторов R1 и R2 TNF- α сопровождается повышением экспрессии каспаз-1, -2, -7, -11 и -14 [86].

Наиболее ранний сигнал при распознавании TNF-R1 определяется фосфорилированием белка FAN, сцепливающего участок цитоплазматического домена рецептора с нейтральной сфингомиелиназой (SMase) плазматической мембранны [87]. В этом сигнальном пути участвуют протеинкиназы (PTK) с M 50 (PK50) и 35 кДа (HR35) [88]. Дальнейшие события связаны с инициацией сфингомиелинового цикла, то есть распадом сфингомиелина и образованием церамида. Последующий апоптозный сигнал проводится через адапторные белки TRADD, FADD/MORT-1, RIP (Receptor Interacting Protein, 74 кДа), FLASH, DEDD, DAXX, CRADD, фактор транскрипции TRAF2 [89]. Мембранный-проксимальная часть цитозольного домена TNF-R1 связана с фосфотирозинкиназой TRAK (p52), которая блокирует передачу сигнала в отсутствие лиганда [90]. Прокаспаза-8 входит в сигнальный комплекс с участием TRADD, затем активируется и сама активирует SMase; образованный в результате активации сфингомиелинового цикла церамид активирует каспазу-3 [91].

Сигнальный комплекс DISC

FADD (Fas Associated Death Domain protein) – это цитозольный белок с M 26 кДа, передающий сигналы от рецепторов Fas-R, TNF-R1, DR3 и т.д. [92]. C-концевой регион FADD ассоциирован с цитозольным доменом Fas через DD-домен. Один модуль DED N-концевого региона белка FADD участвует в олигомеризации, а другой DED-модуль специфически связывает прокаспазу-8 (или -10), имеющую два собственных модуля DED. В результате образуется сигнальный комплекс, получивший название DISC (Death Inducing Signaling Complex) (рис. 5). Только при входлении в этот комплекс прокаспазы-8 олигомеризуются и аутопроцессируются с образованием димеров p10/p20. Сигнальный путь каспазы-8 от DISC-комплекса связан с активацией SMase и сфингомиелинового цикла и формированием церамидзависимого пула каспазы-3 [91]. Прокаспаза-10, после связывания с белком FADD в DISC-комплексе рецепторов Fas, TNF-R1 или DR3, также дает начало протеолитическому каскаду [92].

Одним из компонентов сигнального комплекса DISC является белок FLASH, который своим DED-модулем способен специфически связывать прокаспазу-8 или адапторный протеин FADD. Физиологическая роль FLASH связана с блокированием антиапоптозной функции вирусных белков при инфицировании клетки [93]. DD-домен цитозольного участка Fas-R может быть связан с белком Daxx (120 кДа), который передает сигнал

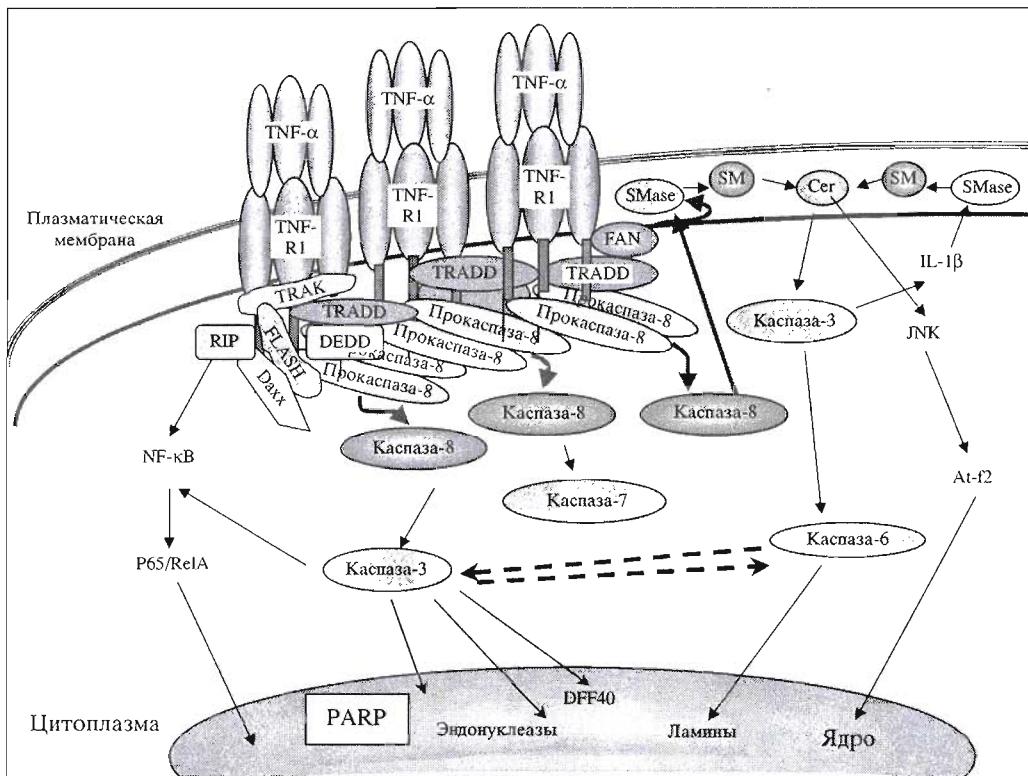


Рис. 4. Активация каспаз при распознавании рецептора-1 фактора некроза опухолей. Рецепторы R1–R4 фактора некроза опухолей (TNF- α) проводят не менее четырех сигнальных путей внутрь клетки в зависимости от состояния клетки и стадии дифференцировки. Для проведения сигнала апоптоза требуется не только тримеризация рецепторов, но и их интенсивный кэплинг. В результате происходит накопление рецепторов и рецепторассоциированных киназ и фосфатаз в ограниченных мембранных компартментах. Активация прокаспазы-8 происходит в результате взаимодействия с димерными белками TRADD в рецепторассоциированном сигнальном комплексе, куда также входят белки FAN, FLASH, DEDD и др. Киназа RIP передает сигнал на ядерный фактор транскрипции NF-кБ, активация которого является ведущим событием в сигнальной цепочке от TNF-R1. Белок FAN активирует сфингомиелиназу (SMase), что приводит к распаду сфингомиелина (SM) и образованию одного из пулов церамида (Cer), участвующего в активации прокаспазы-3 с последующей активацией прокаспазы-6. Другой путь церамида образуется несколько позднее синтезом *de novo*. Фосфотирозинфосфатаза TRAK блокирует сигналы апоптоза в отсутствие лиганда. Каспаза-8 активирует прокаспазы-7 и -3. Каспаза-3 расщепляет фактор транскрипции NF-кБ с образованием фрагмента p65/RelA, который транспортируется в ядро и ингибирует NF-кБ-зависимые гены. Активированные каспазы-3 и -6 расщепляют основные структурные белки клетки.

на JNK-киназу [94]. У человека повышение экспрессии Daxx ускоряет активацию каспазы-8, при этом эффект осуществляется на уровне транскрипции генов [95].

Белки DEDD и DEDD2 включают DED-модули в N-концевых регионах, которые позволяют им взаимодействовать с адаптором FADD и прокаспазой-8. DEDD перемещается в ядро после стимуляции рецептора Fas лигандом. C-Концевой регион DEDD обладает гомологией с гистонами, в ядрышке он взаимодействует с базальным фактором транскрипции РНК полимеразы-1, связывает ДНК и мононуклеосомы и ингибирует транскрипцию. Таким образом, это конечная мишень цепи от Fas-R к ядру клетки [96]. Белки DEDD и DEDD2 также являются транспортерами каспаз-8 и -10 в ядро. DED-ассоциированный фактор DEDAF взаимодействует в цитозоле с прокаспазой-8 (-10), способствует образованию комплекса FADD/про-

каспаза-8 (-10) и повышает интенсивность сигналов. В ядре DEDAF является гомологом ядерного регулятора белка YAF2, взаимодействует с белком DEDD, который в результате перемещается из субнуклеарных структур в нуклеоплазму [97].

С цитозольным доменом рецепторов Fas и TNF-R1 ассоциирован олигомерный белок F1A α , который процессируется и активируется каспазо-3-подобной протеиназой по остатку Asp³⁴² [98]. Проксимальный участок цитозольного домена Fas-R окружает рецепторассоциированная фосфотирозинфосфатаза FAP-1 (Fas Associated Phosphatase) с M 250 кДа, которая блокирует проведение апоптозного сигнала в отсутствие лиганда. С этим участком рецептора Fas также ассоциированы белки p33, p45, MBP (Myelin Basic Protein), FAF-1 (Fas Associated protein Factor-1, 74 кДа) и RIP, адаптором к которому служит белок CRADD [90, 99].

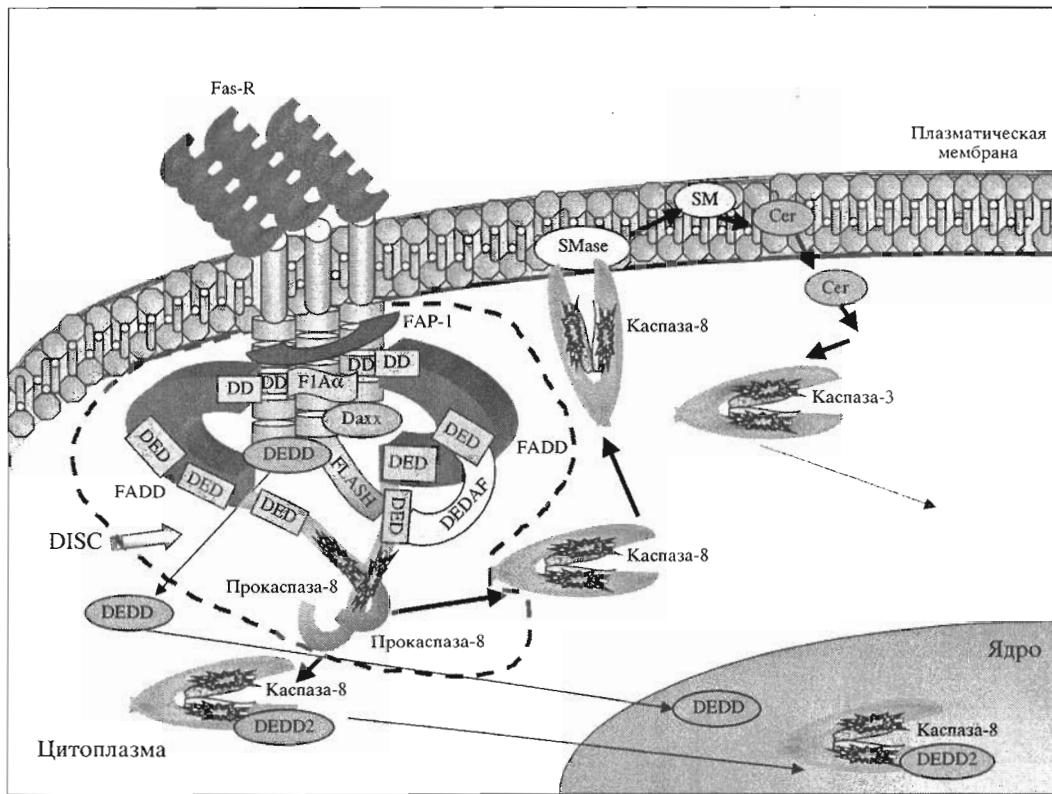


Рис. 5. Строение сигнального комплекса DISC. DISC (Death Inducing Signaling Complex) – это ассоциация рецепторозависимых киназ, фосфатаз, адапторных и других сигнальных белков с цитоплазматическими доменами рецепторов апоптоза. Состав белков в DISC-комплексах определяется типом рецептора. В состав DISC-комплекса рецептора Fas входят белки: FADD, DED, FAP1, RIP, FAF1, FIA α и др. FADD связан через DD-домен с аналогичным доменом цитоплазматического участка Fas-рецептора. Один DED-модуль используется для олигомеризации двух молекул FADD, а другой – связывает каспазу-8 (или -10). Белок FLASH за счет DED-модуля связывается с FADD или каспазой-8. Daxx связан с Fas-R своим DD-доменом, он ускоряет активацию каспазы-8. Белки семейства DEDD проводят сигнал от Fas-R непосредственно в ядро, а также выполняют транспортную функцию переноса каспазы-8 в ядро.

Поддержание рецепторов апоптоза в неактивной форме в отсутствие лигандов осуществляется также Ca^{2+} /кальмодулинзависимой серин/треониновой киназой DAPK [100]. Повышение экспрессии DAPK- β ингибирует активность каспаз-3 и -9 при TNF-индукции апоптозе [101]. Адапторный белок DIP-1 (DAPK Interacting Protein) отменяет антиапоптозный эффект DAPK- α . Экспрессия DIP-1 повышает уровень каспазозависимого апоптоза и осуществляет его связь с ATP-зависимым протеолизом [101]. DIP имеет множество повторов, “RING-finger”-последовательностей, каждая из которых обладает E3-лигазной активностью, что позволяет DIP-1 подвергаться аутоубиквитинилированию. *In vivo* DIP-1 полиубиквитинирован, уровень его экспрессии регулируется системой протеасом.

TRAIL – лиганд рецепторов апоптоза

Apo2L/TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand) – это белок семейства TNF и лиганд рецепторов DR и TRAIL-R2 [102]. Рецепторный

комплекс DR4/DR5 собирается только в ответ на связывание TRAIL. Экспрессия TRAIL имеет значение для апоптоза опухолевых клеток; нормальные клетки обычно резистентны к TRAIL-зависимому апоптозу. Это обеспечивается наличием рецепторов – приманок (Decoy Receptors – DcR1–DcR 3). DcR1 – это GPI-заякоренный мембранный белок, не имеющий цитоплазматического домена. Рецептор DcR2 структурно подобен рецептору DR5, но обладает укороченным цитоплазматическим доменом, в котором отсутствует DD-последовательность, что препятствует передаче апоптозного сигнала [103].

TRAIL инициирует, как минимум, два сигнальных пути, один из которых является каспазозависимым. Агрегированный рецепторный комплекс включает в себя олигомерный FADD, связывающий две прокаспазы-8, что приводит к образованию активной каспазы-8, активации каспазы-3, а затем каспазы-6, которые синергично обусловливают распад мембранных и цитоплазматических белков, фрагментацию ДНК и сморщивание ядра.

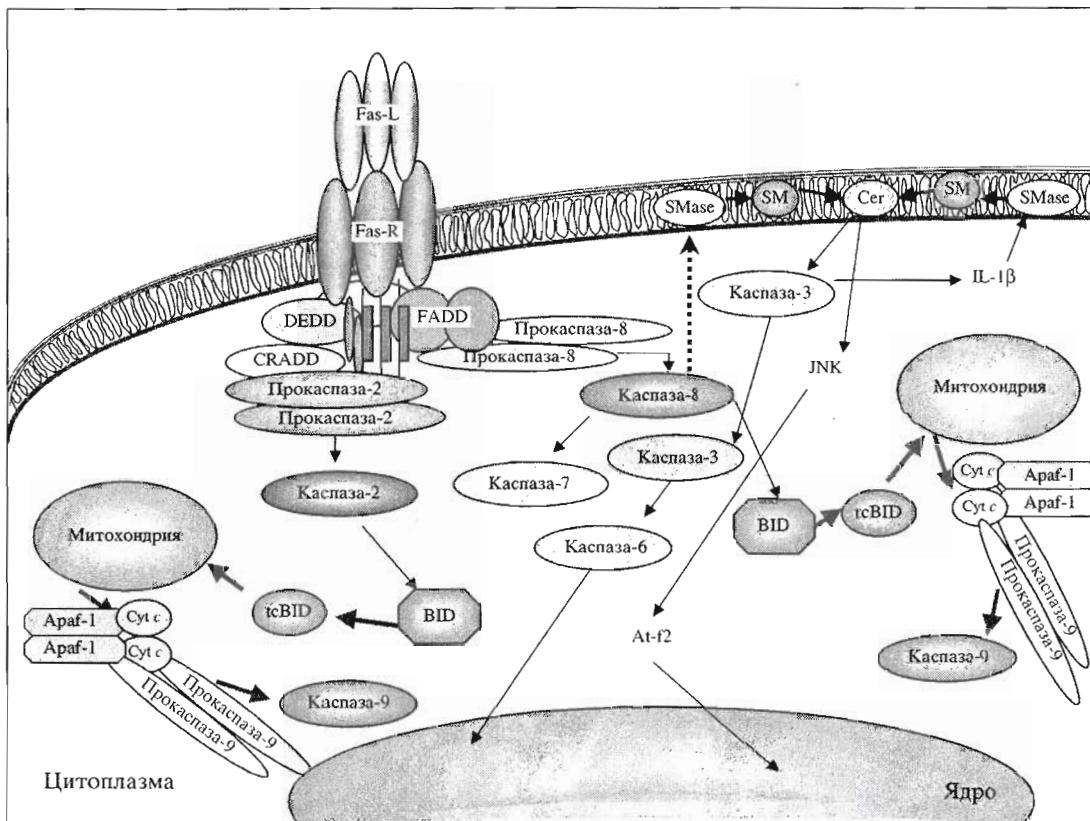


Рис. 6. Взаимодействие каспаз при рецепторзависимом апоптозе. Связывание тримерного лиганда с рецептором апоптоза инициирует передачу сигнала через белки, содержащие DD-домены, в том числе FADD, который олигомеризуется и димеризует две прокаспазы-8 (или -10) с образованием рецепторзависимого сигнального комплекса DISC, с которым ассоциированы другие регуляторные белки (см. рис. 5). В DISC-комплекс может входить цитоплазматическая изоформа каспазы-2, которая активируется и передает сигнал на митохондрии. Аутоактивация прокаспазы-8 приводит к образованию активной формы каспазы-8, инициирующей протеолитический каскад, включающий в себя каспазы-3, -6, -7 и др. В начале проведения апоптозного сигнала каспаза-8 активирует SMase плазматической мембранны, в результате чего гидролизуется сфингомиelin (SM) и образуется церамид (Cer), инициирующий сигнальный путь, приводящий к активации каспазы-3. На поздних стадиях апоптоза каспаза-3 активирует IL-1 β , который активирует SMase с образованием Cer. Далее сигнал передается на JNK-киназу и фактор транскрипции At-f2. Каспаза-8 гидролизует белок BID. Его фрагмент tcBID перемещается в специальные компартменты мембранны митохондрий, при этом меняется взаимоотношение митохондриальных белков, в цитоплазму выходят различные проапоптозные факторы, в том числе цитохром c (Cyt c) и фактор Araf-1, которые образуют комплексы с прокаспазами-9. Активная каспаза-9 дает начало собственному протеолитическому каскаду.

Каспазонезависимый сигнальный путь обусловлен активностью церамида [104].

Взаимодействие различных сигнальных путей рецепторов апоптоза

В настоящее время показано наличие двух сигнальных путей апоптоза, инициируемых Fas-рецептором и включающих белок FADD и каспазу-8, но различающихся сигналом, передаваемым на митохондрии [105]. В первом случае интенсивная агрегация Fas-R/CD95 необратимо запускает апоптоз. В передачу сигнала вовлекается большое число DISC-комплексов, активируются каспазы-8, -3, -6 и -7, что показано на примере Fas-зависимого апоптоза лимфоцитов и гепатоцитов [106]. При этом экспрессия Bcl-2 или Bcl-x_(L) не оказы-

вает влияния на проведение апоптозного сигнала [107]. Во втором сигнальном пути образуется мало DISC-комплексов, но в их формировании, помимо каспазы-8, участвует изоформа каспазы-2_L. Ряд стимулов, например активация РКС, оказывает влияние только на второй тип Fas-зависимого апоптоза. Ингибиторы, непосредственно взаимодействующие с DISC-комплексом, такие, как цитозольный FLIP, блокируют апоптоз в обоих случаях [105]. Взаимодействие сигнальных путей апоптоза показано на рис. 6.

Для передачи сигнала от Fas-R на митохондрии необходимо наличие белка BID. Каспаза-8 процессирует BID с образованием активного фактора tcBID с M 15 кДа. Именно tcBID является эффективатором апоптоза в митохондриях: он перемещается из цитоплазмы к мембране митохондрий в специ-

альные места контактов, обогащенных митохондриальноспецифичным кардиолипином, где формирует гомотример с M 45 кДа, вызывающий перемещение митохондриальных белков [108–110]. Одновременно с t_cBID высвобождается ингибирующая молекула t_nBID с M 6.5 кДа, способная снова вступать в ассоциацию с t_cBID и ингибировать апоптозный сигнал при избытке субстрата [111].

Каспаза-2 (MEROPS, ID:C14.006) представляет третье подсемейство каспаз (табл. 4). Это, вероятно, одна из самых интересных и еще далеко не познанных регуляторных молекул апоптоза. Каспаза-2 была идентифицирована как продукт мышевого гена *Nedd2*, подобный ICE человека и Ced-3 *C. elegans* [112, 113]. Альтернативный сплайсинг дает, как минимум, две изоформы каспазы-2, одна из них, каспаза-2_L (435 а. о.), обладает гомологией с субъединицами каспазы-1 и Ced-3 [114]. Каспазы-2_S и -2_L человека, мыши и крысы имеют высокую гомологию.

В сигнальном комплексе DISC каспаза-2 играет регуляторную роль, переключая сигнал от рецепторов на митохондрии. Изоформа каспазы-2_L также активирует BID; она ассоциирована с белком CRADD и ее активность блокируется действием Bcl-2. Именно каспаза-2_L амплифицирует апоптозный сигнал, в то время как каспаза-2_S супрессирует его [114].

При инициации апоптоза каспаза-2 сначала расщепляется на три интермедиата с M 30, 33 и 14 кДа, которые быстро процессируются до субъединиц p18 и p12 [115].

Профермент и активная форма каспазы-2 мыши локализуются как в цитоплазме, так и в ядре [116]. Локализация каспазы-2 в ядре регулируется двумя NLS (Nuclear Localization Signals)-последовательностями, которые формируют транспортерный комплекс, активно перемещающий белок в ядро через ядерные поры [117]. Каспаза-2 сама работает как транспортер, осуществляя активный транспорт каспазы-3 из цитозоля в ядро благодаря взаимодействию их продоменов [116]. Каспаза-2 постоянно присутствует в цитоплазме и ядре нейронов головного мозга; ее активность повышается при апоптозе [118].

Каспаза-2 вовлечена в сигнальный путь апоптоза, приводящий к выходу из митохондрий цитохрома *c*, Smac (Second mitochondria-derived activator of caspases) и других митохондриальных факторов [119].

Митохондриальные изменения при апоптозе

Внутриклеточные окислительные процессы являются универсальными событиями эффекторной фазы апоптоза, в которых митохондрии играют ключевую роль [120]. Изменение проницаемости мембран митохондрий, открытие пор и

падение трансмембранного потенциала $\Delta\Psi_{\mu}$, а также образование реактивных метаболитов кислорода являются критическими событиями в развитии апоптоза. Митохондриальные изменения под влиянием белка BID идут в нескольких направлениях. Активируется митохондриальная SMase и сфингомиелиновый цикл, что изменяет физические свойства мембран митохондрий и влияет на подвижность мембранных белков. Происходит олигомеризация белка Bak, транслокация белка Bax (который определяет выход белков Smac и Omi/HtrA из митохондрий), а также выход из митохондрий цитохрома *c* и активация эндонуклеазы G. Smac и Omi/HtrA необходимы для высвобождения X-сцепленного ингибиторного апоптозного белка XIAP, который блокирует активацию каспазы-3. Активируется цитозольный фактор Cif (Cytochrome C-efflux inducing factor), который также стимулирует выход цитохрома *c* из митохондрий. Активация каспаз-3 и -7 при Fas-зависимом апоптозе повышает активность Cif [121].

Повышение экспрессии белка Bcl-2 препятствует встраиванию Bax в мембрану митохондрий, блокирует активность Cif и выход цитохрома *c* и фактора AIF (Apoptosis Inducing Factor) [122, 123]. AIF проводит дополнительный сигнал для выхода цитохрома *c* [124]. Далее AIF транслоцируется в ядро, вызывает конденсацию хроматина и распад ДНК на фрагменты длиной около 50 т.п.о., причем этот сигнальный путь не зависит от активности каспаз [125].

Выход Smac из митохондрий вызывает его ассоциацию с ингибиторным белком IAP. Последовательность Ala-Val-Pro-Ile в *N*-концевом домене белка Smac распознает и связывает BIR-3-домен белка IAP, который в норме связывает и инактивирует прокаспазу-9. Выход прокаспазы-9 из этого комплекса позволяет ей активироваться, после чего IAP подвергается убиквитинилированию. Это один из уровней взаимодействия каспаз с протеасомами при апоптозе [126, 127].

Активация каспазы-9 в комплексе с Araf-1

Мембранные перемещения белка Bak нарушают ассоциацию фактора Araf-1 (Apoptotic protease-activating factor) с белками семейства Bcl-2 [68] (рис. 7). Araf-1 осуществляет связь апоптоза с ATP- зависимым протеолизом. Выход функционально активного цитохрома *c* из митохондрий, соединение его с Araf-1 и вовлечение в этот комплекс прокаспазы-9 происходит только в присутствии ATP [128]. Кристаллическая структура комплекса показывает, что каждая молекула Araf-1 взаимодействует с одной молекулой прокаспазы-9 двумя сайтами, что обусловлено притяжением двух пар модулей CARD каспазы-9 и фактора Araf-1. В комплексе с Araf-1 прокаспаза-9 функционирует как каталитическая субъединица при

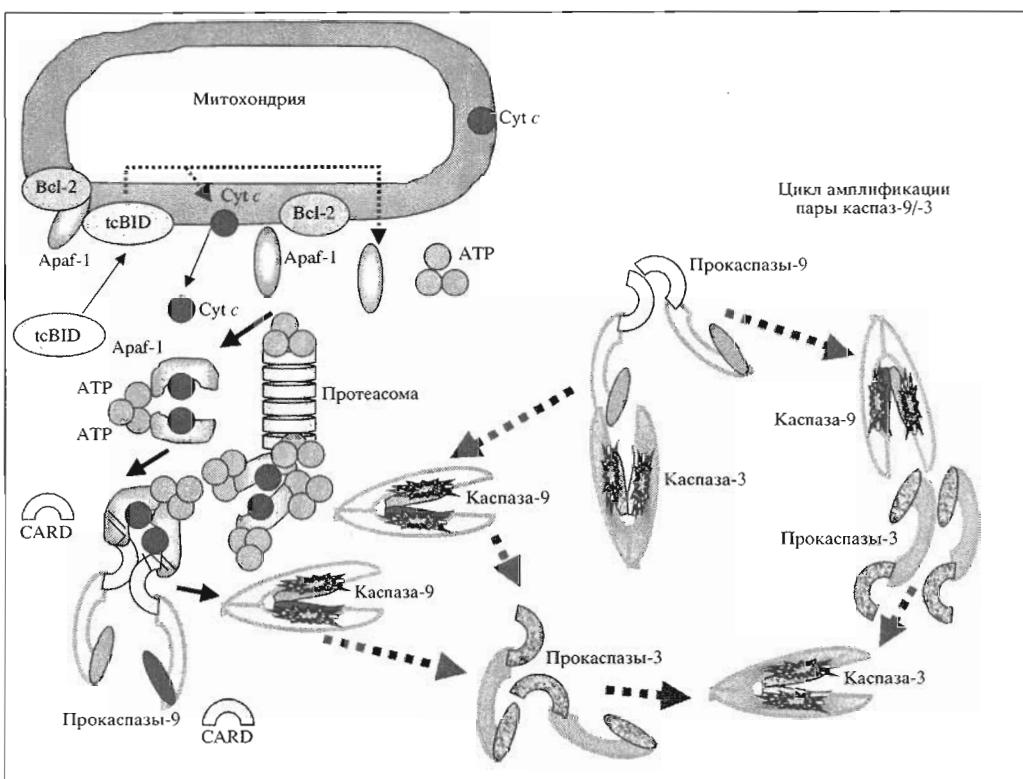


Рис. 7. Схема образования сигнального комплекса Сyt c/Apaf-1/прокаспазы-9 и амплификация апоптозного сигнала. При втором типе Fas-зависимого апоптоза каспаза-8 быстро гидролизует белок BID, активная каталитическая единица которого транслюцируется в митохондрии, нарушает взаимодействие мембранных белков и в конечном счете приводит к выходу Сyt c в цитозоль (см. рис. 6). Далее образуется ATP-зависимый каталитический комплекс из Сyt c и протеасоморегулируемого апоптозного фактора Apaf-1, связывающего прокаспазы-9. Образование активной каспазы-9 дает начало протеолитическому каскаду с участием каспазы-3, которая в свою очередь может активировать прокаспазу-9 и образовать, таким образом, амплифицирующий протеолитический цикл.

аллостерическом регуляторе, что характерно для большинства инициирующих каспаз [129].

Модуль CARD в молекуле Apaf-1 имеет 20% гомологии с продоменом каспазы-9 [128]. CARD состоит из шести плотно упакованных α -спиралей; взаимодействие между двумя модулями CARD осуществляется в районе 2-й и 3-й α -спиралей. Помимо электростатического притяжения имеют место гидрофобные взаимодействия [130]. Apaf-1 функционирует только в олигомерной форме, что позволяет двум прокаспазам-9 максимально приблизиться друг к другу. За олигомеризацию фактора Apaf-1 отвечает последовательность из двенадцати так называемых фрагментов WD40 C-концевого региона, которая также отвечает за связывание с ATP. Мутации в этом регионе препятствуют олигомеризации и активации каспазы-9 [131].

Каспаза-9 (MEROPS, ID : C14.010) относится к подсемейству Ced-3 (табл. 4). В отличие от других каспаз содержит в активном сайте пентапептид QACGG, в котором предпоследний глицин занимает место обычного Arg (табл. 1). Продомен каспазы-9 имеет большую молекулярную массу, гомологичен продоменам каспазы-2 и Ced-3 и

включает в себя модуль CARD [15, 16, 59]. Альтернативный сплайсинг дает несколько изоформ каспазы-9, некоторые из них, например каспаза-9 β , обладают антиапоптозным эффектом [132].

Протеолиз прокаспазы-9 (M_r 46 кДа, 416 а. о.) начинается по остатку Asp³¹⁵, что изменяет ее конформацию и способствует олигомеризации с образованием активного тетрамера p37/p10. Высвобожденная из протеолитического комплекса каспаза-9 активирует каспазу-3, которая в свою очередь расщепляет прокаспазу-9 по остатку Asp³³⁰ [133]. Как и в случае с парой каспаз-3/6, пара каспаз-9/3 создает цикл амплификации апоптозного сигнала, схема которого представлена на рис. 7. Активация прокаспазы-9 по фрагменту R³¹²EPD \downarrow A³¹⁶ между большой и малой субъединицами характерна для действия гранзима B. *In vitro* гранзим B может расщеплять прокаспазу-9, но существует значительное предпочтение для расщепления прокаспазы-9 каспазой-3 по остатку Asp³³⁰ [15, 16, 59]. Каспаза-9 также может быть активирована каспазой-8, однако этот процесс является функционально значимым для раз-

вития апоптоза только при уже начавшейся активации каспазы-3 или каспазы-7.

В процессе активации каспазы-9 высвобождается модуль CARD, который в свободном состоянии повышает экспрессию фактора транскрипции NF-кБ и генов, кодирующих антиапоптозные белки. Продомены, высвобождаемые при активации каспазы, также обладают антиапоптозным эффектом, ингибируя каталитическую активацию каспазы-9. Таким образом, имеется регуляторная система, функционирующая по принципу обратной связи и определяющая баланс событий в клетке [134]. Ингибирование протеолиза каспазы-9 может осуществляться протеинкиназой B/Akt, фосфорилирующей каспазу-9 по остатку Ser¹⁹⁶.

В сигнальный путь с участием каспаз-2 и -9 вовлечено несколько регуляторных белков, в том числе адапторный белок PACAP (Pro-Apoptotic Caspase Adaptor Protein), связывающий прокаспазы-2 и -9. PACAP экспрессируется в цитоплазме большинства клеток человека, имеет сайты связывания ATP и Cyt c, что указывает на его регуляторную роль в проведении апоптозного сигнала, связанного с митохондриями.

В процессе реализации сигналов апоптоза каспаза-9 перемещается в ядро, где инактивирует ядерный транспорт и повышает лимит диффузии для высокомолекулярных белков через ядерные поры. Благодаря этому каспаза-3 получает возможность проникнуть в ядро и активировать каспазависимую эндонуклеазу [135].

Между Сег-зависимыми сигнальными путями, каспазами и митохондриальными событиями апоптоза существует тесная взаимосвязь. Сег, синтезированный *de novo*, индуцирует фосфорилирование SR-белка, регулирующего альтернативный сплайсинг генов каспазы-9 β и *bcl-x_L*, и антиапоптозную функцию их белков. Ингибирование синтеза Сег фумонизином B1 блокирует этот процесс [132]. Каспаза-9 в свою очередь повышает активность SMase плазматической мембраны и уровень Сег. Таким образом, формируется еще один амплифицирующий сигнал апоптоза [136].

Каспазы и ATP-зависимый протеолиз

Протеасомы (убиквитин- и ATP-зависимые мультикаталитические протеиназные комплексы) расщепляют многочисленные сигнальные белки, которые должны быть быстро нейтрализованы, поэтому активность ATP-зависимого протеолиза повышена при всех типах апоптоза по сравнению с нормальным состоянием клетки [133]. В начальной стадии апоптоза протеасомы обнаруживаются в ядре и цитоплазме. По мере конденсации хроматина ядерные протеасомы преимущественно концентрируются вокруг него вплоть до момента его распада. Активность протеасом показана и в

апоптозных тельцах, и в цитоплазматических вакуолях [137]. При апоптозе наблюдается накопление убиквитинилированных белков с высокой молекулярной массой, а также потеря внутриклеточного пула неконъюгированного убиквитина [138].

Взаимодействие ATP-зависимого протеолиза с каскадами каспаз при апоптозе носит многогранный характер, осуществляется на нескольких уровнях и определяется собственными регуляторными механизмами в клетке. Эффективность действия ингибиторов протеасом по отношению к протеолитическим каскадам при апоптозе определяется состоянием клетки и напряженностью сигнальных путей. Ингибитор протеасом СЕР1612 повышает активность каспазы-3 и усиливает апоптоз в опухолевых клетках, что сопровождается накоплением регуляторов клеточного цикла – ингибиторов циклинзависимых киназ p21^{WAF1} и p27^{KIP1} [139]. Ингибиторы каспаз блокируют синергичное апоптозное действие анти-Fas-антител и протеасомных ингибиторов [140].

Апоптоз, вызванный протеасомными ингибиторами, может быть ослаблен или отменен укороченным сплайсинговым вариантом каспазы-3_S, которая не имеет консервативной последовательности QACRG в каталитическом центре. Повышение экспрессии каспазы-3_S в опухолевых клетках обусловливает их устойчивость к этому типу апоптоза [141].

Протеасомные ингибиторы лактацистин и MG132 индуцируют апоптоз в лейкозных В-клетках, сопровождающийся выходом Сyt c из митохондрий и активацией каспаз-2, -3, -7, -8 и -9. При этом в клетках обнаруживаются каспазоактивирующие комплексы с *M* 700 кДа, включающие в себя Apaf-1 [142].

Все составляющие функционального протеасомного комплекса, а также деубиквитинилирующие ферменты (в том числе USP7/HAUSP), являются субстратами каспаз при апоптозе; убиквитин-протеин-лигаза Nedd4 расщепляется по сайту DQPD²³⁷↓ [143, 144]. Наличие каспазоподобной активности, наряду с традиционными трипсино- и химотрипсиноподобными активностями, показано в 20S-протеасоме эукариот [145].

Протеасомы регулируют экспрессию субстратов каспаз. Субстрат каспазы-3, белок MDM2 – регулятор p53, аутоубиквитинилируется и, таким образом, теряет активность, благодаря наличию “RING-finger”-последовательности, обладающей свойствами E3-лигазы убиквитинзависимого протеолиза. Экзогенный убиквитин способен проникать внутрь клеток и индуцировать апоптоз путем протеасомависимой деградации некоторых регуляторных клеточных белков, в частности STAT3. Этот процесс сопровождается активацией каспазы-3 [146].

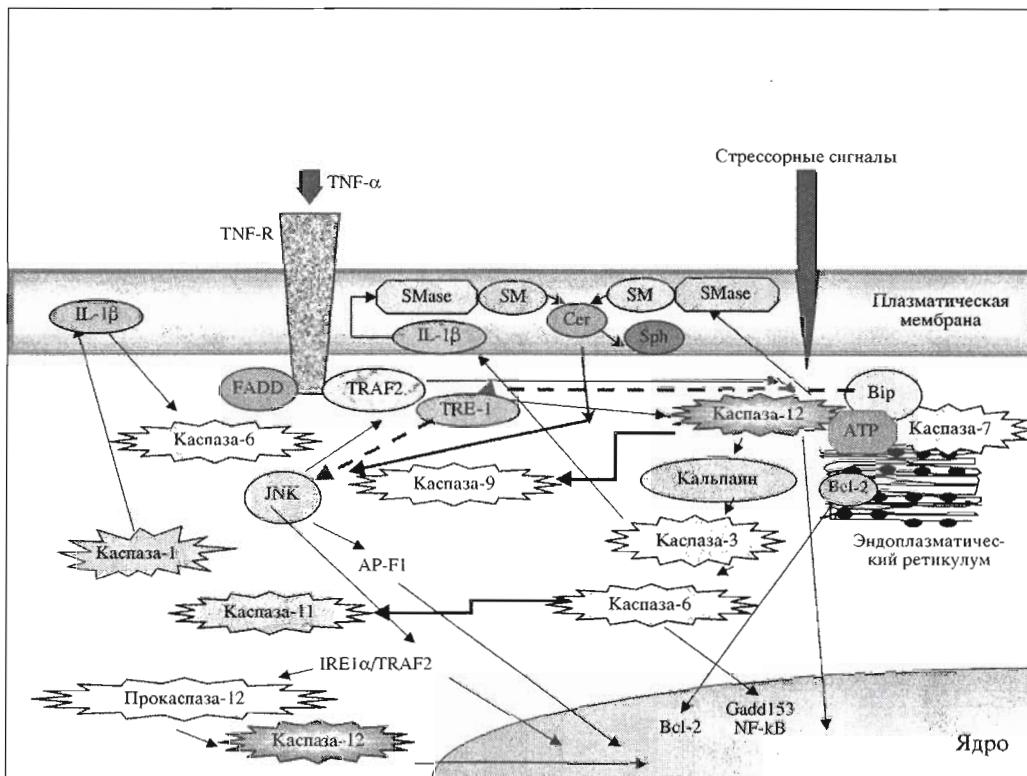


Рис. 8. Схема сигнальных путей апоптоза, инициируемых в эндоплазматическом ретикулуме и связанных с активацией каспазы-12. При стрессе повышается транскрипция генов, кодирующих молекулярные шапероны (Bip) в ER. Фактор IRE1 передает сигнал на JNK-киназу, образуется комплекс IRE1 α /TRAF2. TRAF2 способствует ускорению протеолитической активации прокаспазы-12. Вследствие транслокации цитозольной каспазы-7 к поверхности ER образуется ее комплекс с прокаспазой-12, регулируемый белком Grp78/Bip. При повышении внутриклеточной концентрации ATP комплекс диссоциирует, и активная каспаза-12 перемещается в цитоплазму, где процеширует каспазу-3, затем каспазу-6. В этом сигнальном пути участвуют белок Gadd153 и фактор транскрипции NF-кБ, которые транслюцируются в ядро, после чего повышается уровень экспрессии белка Bcl-2 в ядре и в ER. Представленный сигнальный путь регулируется пулом белка Bcl-2, связанным с ER, и не зависит от Apaf-1 и митохондрий.

Каспаза-12 и сигналы апоптоза, связанные с эндоплазматическим ретикулумом

Локализация каспазы-12 (MEROPS, ID : C14.013) в ER обуславливает инициацию собственного сигнального каскада, сцепленного с ATP-зависимым протеолизом и регулирующего ответ клетки на стресс [147]. Этот тип апоптоза характерен для клеток нервной системы, в частности, для нейронов гиппокампа, и инициируется при гипоксии, гипогликемии, нарушении гомеостаза кальция, нарушении фолдинга белков и их накоплении в ER.

В ответ на стресс в клетках нервной системы активируются протеолитические каскады, два из которых связаны с каспазой-12 [148]. Один сигнальный путь начинается с транслокации цитозольной прокаспазы-7 к поверхности ER, где она образует комплекс с прокаспазой-12 и катализирует образование активной каспазы-12 (рис. 8). Глюкозорегулируемый белок и молекулярный шаперон Grp78/Bip образует комплекс с прокаспазами-12 и -7, что препятствует их свободному выходу из ER. Этот комплекс диссоциирует только при повышении внутриклеточной концентрации ATP.

Активированная каспаза-12 перемещается в цитоплазму и активирует кальпанин [149]. М-кальпанин способен сам активировать прокаспазу-12 и инактивировать эндоплазматический пул белка Bcl-2. Далее активируются каспазы-3 и -6, белок Gadd153, фактор транскрипции NF-кБ, которые транслюцируются в ядро [150]. Этот сигнальный путь регулируется специфическим пулом белка Bcl-2, связанным с ER, но не зависит от Apaf-1 и высвобождения Сyt c из митохондрий [151, 152].

При стрессе повышается транскрипция генов, кодирующих молекулярные шапероны ER. Это является сигналом для фактора IRE1, который передает сигнал на с-Jun-NH₂-терминалную ингибиторную киназу, регулирующую образование комплекса IRE1 α /TRAF2 (TNF-R1 – Associated Factor), взаимодействующего с прокаспазой-12 и ускоряющего ее протеолитическую активацию [153]. Другой сигнальный путь апоптоза в нейронах гиппокампа также включает в себя каспазу-12, но инициируется каспазами-1 и -11.

Повышение активности каспазы-2 характерно для апоптоза в клетках мозга. Расщепление прокас-

пазы-2 до фрагмента с M 12 кДа наблюдается немедленно после ишемии гиппокампа. Введение специфического ингибитора каспазы-2 предотвращает апоптоз и гибель нейронов [118]. Через 8, 24 и 72 ч реперфузии после глобальной ишемии мозга крыс повышается экспрессия двух транскриптов каспазы-2_S и -2_L. Уровень прокаспазы-2 (M 51 кДа) повышается через 4 ч после ишемии мозга и держится в течение 72 ч. Продукт расщепления прокаспазы-2 (M 30 кДа) появляется через 8 ч и постоянно повышается в течение всего периода реперфузии. Внутривентрикулярное введение специфического ингибитора каспазы-2 за 30 мин до ишемии снижает уровень гибели нейронов [154].

В ответ на инфекцию в нервной системе процессы активации сигнальных путей апоптоза идут с меньшей скоростью и включают в себя вторичные мессенджеры, отличные от сигнальных путей в других органах. Так, через 6 ч после экспериментальной инфекции в нейронах гиппокампа и неокортекса обнаружены мРНК каспаз-6, -7 и -11; через 12 ч активируются каспазы-1, -2, -8 и -12; через 18 ч – каспаза-14 и только через 24 ч – каспаза-3. Эта последовательность событий указывает на то, что существует тонкая сетевая регуляция активности каспаз на уровне транскрипции генов в дополнение к известному каскаду на уровне белка [86]. При развитии инфекции в центральной нервной системе, параллельно активируются каспазы в лимфоцитах селезенки.

Автоактивация прокаспазы-12 начинается по остатку Asp³¹⁸, тогда как стрессиндуцированный апоптоз вызывает ее активацию по двум сайтам Asp³¹⁸ и Asp³⁴¹. Только после полного удаления *N*-концевого домена возможна транслокация активной каспазы-12 в ядро клетки [155].

При стрессиндуцированном апоптозе в клетках нервной системы негативным регулятором активности каспазы-12 является cAMP. Активированная им протеинкиназа AMPK ингибирует индукцию серин-пальмитоилтрансферазы и соответственно синтез Cer de novo, что негативно влияет на выход каспазы-12 в цитозоль [156].

Роль каспаз в патогенезе нейродегенеративных заболеваний

Изучение сигнальных каскадов каспаз важно для понимания патогенеза и поиска новых подходов к лечению нейродегенеративных заболеваний, в частности болезней Альцгеймера, Хантингтона, Паркинсона, рассеянного склероза и др.

В патогенезе болезни Альцгеймера существенная роль принадлежит накоплению в пирамидальных нейронах, нейронах гиппокампа и т.д. агрегатов β -амилоидного пептида, который инициирует апоптоз перекрестным связыванием TNF-R1 рецептора и активацией сигнального пути с

участием каспазы-8 [157] и каспазы-2 [158]. Нейроны, не экспрессирующие каспазу-2, резистентны к апоптозу, индуцированному β -амилоидным пептидом [158]. Показано также, что стрессиндуцированный апоптоз в кортикальных нейронах реализуется каспазо-12-зависимым механизмом.

При болезни Альцгеймера гены *PS1* (14q24.3) и *PS2* (1q31-q42) кодируют интегральные мембранные белки презенилины (*PS1* и *PS2*) (~450 а. о. каждый), изоформы которых имеют по семь и более трансмембранных доменов. Повышение экспрессии *PS2* связано с повышением апоптоза в нервных клетках.

Презенилины гидролизуются каспазами по связям Asp³⁴¹↓Ser³⁴² или Asp³²⁹↓Ser³³⁰, при этом образуются два фрагмента – *N*-концевой (27/35 кДа, *PS1/PS2*) и *C*-концевой (15/24 кДа, *PS1/PS2*). Максимальную активность проявляют каспазы-8 и -3, которые гидролизуют оба презенилина. Каспазы-8, -6 и -11 расщепляют *PS1* по сайту ENDD³²⁹ и, частично, по сайту AQRD³⁴¹. Каспазы-3, -7 и -1 расщепляют *PS1* исключительно по сайту AQRD³⁴¹. Расщепление *PS2* осуществляется каспазами-8, -3, -1, -6 и -7 (по убывающей активности) по сайту D³²⁶SYD³²⁹ [159]. Каспаза-2 не гидролизует ни *PS1*, ни *PS2*, а каспаза-11 – только *PS2*.

Расщепление *PS2* каспазой-3 приводит к образованию *C*-концевого полипептида с антиапоптозными свойствами, блокирующего действие интактного *PS2*. Образование альтернативных вариантов активированных *PS1* и *PS2* под действием различных каспаз регулирует проведение сигналов апоптоза. Ингибиторы каспаз блокируют гидролиз презенилинов.

В патогенезе болезни Хантингтона играет роль экспрессия так называемого укороченного белка хантингтин (truncated *N*-terminal huntingtin, tNhtt), содержащего повторы полиглутамина и образующего ядерные агрегаты в комплексе с белком эпидермального ростового фактора. Каспазы-8 и -10 вовлекаются в агрегаты полиглутамина и активируются. Это является стрессорным сигналом и приводит к активации шаперона Grp78/Bip в ER, вы свобождению каспазы-12 из комплекса с каспазой-7 и запуску протеолитического каскада [160]. Одним из субстратов каспаз является ламин В, расщепление которого дезорганизует клеточное ядро [161].

Механизмом болезни Паркинсона считается появление мутаций в белке α -синуклеине, что обуславливает гибель допаминергических нейронов в черной субстанции мозга. Апоптоз нейронов включает митохондриальные нарушения, активацию каскадов каспаз, изменение активности протеасом [162]. Семейная форма болезни Паркинсона связана с наличием двух мутантных генов – *parkin* и *UCH-L1*, которые регулируют убиквитин зависимый протеолиз. Нейроны, экспрессирующие мутантные белки,

Таблица 5. Некоторые известные ингибиторы каспаз

Физиологические	Вирусные	Ингибиторы каскадов каспаз			
		Синтетические пептидные			
Специфические ингибиторные белки (FLIP, IAP, XIAP и др.)	Специфические ингибиторы белков сигнальных путей апоптоза	обратимые		необратимые	
		ингибитор	каспазы-мишени	ингибитор	каспазы-мишени
Вторичные мессенджеры сигнальных путей ростовых факторов	Ac-YVAD-CHO Ac-DEVD-CHO	1, 4	Z-VAD-fmk* универсальный	Все каспазы	
		3, 7	Z-VDVAD-fmk Z-DDVD-fmk	2 3	
Вторичные мессенджеры сигнального пути сфингозинфосфата	Ac-LETD-CHO Ac-IETD-CHO	8	Z-VEID-fmk Z-IETD-fmk	6 8	
		9	Z-LEHD-fmk	9	
Активаторы антиапоптозных генов	Ac-DEVD-CHO	10	Z-AEVD-fmk IDN 1529	10 1, 2, 3, 6, 8, 9	

* fmk – фторметилкетон.

обладают повышенной чувствительностью к действию экзогенных ингибиторов протеасом, при этом показана активация каспаз-3 и -9.

При клиническом течении рассеянного склероза или его моделировании с помощью экспериментального аутоиммунного энцефалита у животных имеются области демиелинизации нервного волокна. В основе патогенеза заболевания лежит гибель олигодендроцитов, образующих миелин, которая обусловлена TNF- α -зависимым апоптозом и сопровождается активацией каспаз-11, -1, -3.

Негативная регуляция протеолитических каскадов при апоптозе

Все известные ингибиторы каспаз можно условно разделить на три группы (табл. 5): I) физиологические ингибиторы, синтезируемые в клетках для предотвращения распада функционально активных молекул, II) пептиды, синтезируемые вирусами, и III) синтетические пептиды, связывающие активные центры каспаз.

В клетке синтезируется несколько белков – физиологических ингибиторов сигналов, проводимых через Fas-R, в том числе FLIP (FLICE Inhibitory Protein) – специфический ингибитор FADD. Различают FLIP короткий и длинный, каждый содержит по два модуля DED и один неактивный каспазный домен, что позволяет связывать белок FADD и проакаспазу-8 и, таким образом, прерывать сигнал от DISC-комплекса [163]. При TRAIL-зависимом апоптозе каспазы-8 и -10 входят в DISC-комплекс, но в клетках, резистентных к TRAIL, их активация прерывается двумя ингиби-

торными белками – FLIP и PED/PEA-15 [164]. Апоптоз, индуцированный TRAIL, может быть прерван ингибиторами XIAP, CrmA и белком бакуловируса p35 [165]. Активация MAPK-киназы MKK1 обуславливает экспрессию FLIP [166].

Ингибиторы апоптозных белков IAP (Inhibitors of Apoptotic Proteins) – это физиологические регуляторные молекулы, последовательности которых обнаруживаются также во многих вирусах. Некоторые IAP подавляют активность каспаз в виде полноразмерной молекулы, для других необходимо образование активных фрагментов. При Fas-зависимом апоптозе IAP человека расщепляется на фрагменты BIP-1, BIP-2 и BIP-3-RING, последний является специфическим ингибитором каспазы-9 [167]. Белки семейства IAP ингибируют, как правило, эффекторные каспазы-3 и -7. Белок семейства IAP, Survivin, экспрессируется в опухолевых клетках и блокирует активность каспаз при апоптозе [168].

Одним из механизмов прерывания сигналов апоптоза является фосфорилирование простых сфинголипидов, образующихся при распаде SM плазматической мембранны. Церамид-1-фосфат и сфингозин-1-фосфат (Sph-1-P) появляются при активации соответственно церамидкиназы и сфингозинкиназы. Sph-1-P формирует собственный сигнальный путь, реципрокный сигналам церамида, активирует PKC, прерывает активацию каспазы-3. Этот эффект показан для клеток HL-60 и Jurkat при TNF- и Fas-зависимом апоптозе [169]. Сфингозинкиназа ингибирует апоптозный каскад, связанный с митохондриальными белками и транслокацией Cyt c и Smac из митохондрий. Диметилсфингозин,

специфический ингибитор сфингозинкиназы, повышает выход Cyt c в цитозоль [169]. Сег, синтезированный *de novo*, индуцирует фосфорилирование SR-белка, регулирующего альтернативный сплайсинг и уровень мРНК генов каспазы-9 β и белка Bcl-x_(L), обладающих антиапоптозным эффектом, что можно заблокировать ингибитором церамидсинтазы фумонизином B1 [132].

В клетке существует несколько сигнальных путей, которые способны конкурентно прервать активацию каспаз. Активированная PKC блокирует церамидзависимую активацию каспазы-3 при Fas-зависимом апоптозе [170]. PKC удлиняет время протеолитического расщепления белка BID, что препятствует изменениям в мембране митохондрий.

Активация сигнальных путей ростовых факторов ингибирует апоптоз даже в тех клетках, где высок уровень экспрессии Fas-рецептора. Ингибирование фосфотирозинфосфатаз, ассоциированных с Fas-R, подавляет фосфорилирование Fas-ассоциированных белков p61 и p89/92 и активацию каспазы-8, что препятствует активации каспазы-3. Этот эффект показан только в ограниченный период времени, пока сигнал не передан на митохондрии [171].

Сигнальные пути теплового шока и Fas-зависимого апоптоза находятся в конкурентном взаимоотношении. Активация ДНК-связывающего фактора теплового шока-1 (heat shock factor 1-DNA binding) и индуцильного белка теплового шока Hsp72 помогает клетке устоять перед различными формами стресса. Активация Fas обуславливает быстрое снижение экспрессии тепловых белков и отсутствие их гиперфосфорилирования. Этот эффект блокируется ингибиторами каспазы-1. Ингибирование сигнального пути теплового шока приводит к существенному возрастанию числа клеток, вышедших в апоптоз в ответ на стресс [172].

Субстратом каспаз при апоптозе является PLC- γ -1, фосфорилирование которой при интенсификации сигналов ростовых факторов делает ее устойчивой к каспазам, что является еще одним регуляторным механизмом выживания клетки [30]. Активация PLA2 также инициирует конкурентный апоптоз сигнальный путь. При развитии апоптоза PLA2 является субстратом каспазы-3 и -7 (Asp⁵²²↓) и каспазы-1 (Asp⁴⁵⁹↓).

Негативная регуляция экспрессии молекул апоптоза обнаружена на уровне факторов транскрипции. MAPK-киназа MEKK1 ингибирует активацию NF-кБ, что препятствует синтезу мРНК рецепторов апоптоза DR4 и DR5 [173].

Вирусы блокируют сигнальные пути апоптоза в клетке-хозяине. Белок бакуловируса p35 ингибирует активированные каспазы [56]. Сериновая протеиназа CtmA вируса коровьей оспы (Cell

response mediated gene A) является селективным ингибитором каспаз I и III групп [174].

Синтетические ингибиторы каспаз

Первыми специфическими ингибиторами каспаз подсемейства ICE были фрагменты природных субстратов, соответствующие их сайтам узнавания. Это тетрапептиды Түг-Val-Ala-Asp, фрагмент про-IL-1 β – субстрата каспазы-1, и Asp-Glu-Val-Asp, фрагмент PARP – субстрата каспазы-3 [175]. Альдегидные производные этих ингибиторов обратимо формируют тиохемиацетали с цистеином активного центра. Альдегид Ac-YVAD-CHO, селективный ингибитор каспаз-1 и -4, блокирует образование IL-1 β и IFN- γ мононуклеарами, альдегид Ac-DEVD-CHO выборочно ингибирует каспазы-3 и -7 [176].

Кетоны (хлорметил-, фторметил-, ацил-оксиметил-, диазометил-, α -пиразол-оксиметил- и фосфинил-оксиметил-кетон), ковалентно формирующие тиометилкетоны с атомом серы цистеина активного центра большой субъединицы каспаз, являются их необратимыми ингибиторами. Специфическими ингибиторами каспаз-2, -6 и -3 являются производные пептидов соответственно Z-VDVAD-fmk, Z-VEID-fmk и Z-DEVD-fmk. Необратимый универсальный ингибитор каспаз, Z-VAD-fmk, инактивирует каспазу-1 со скоростью $2.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, а каспазу-2 – со скоростью $2.9 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [175, 176].

Специфическими ингибиторами каспазы-8 являются Z-IETD-fmk и Ac-LETD-CHO, каспазы-9 – Z-LEHD-fmk и Ac-IETD-CHO и каспазы-10 – Z-AEVD-fmk [177, 178].

Ингибитор IDN 1529 ((2-indolyl)-carbonyl-Ala-Asp-fmk) блокирует активность каспаз-1, -2, -3, -6, -8 и -9, при этом повышается липополисахаридстимулированная активность цитокинов, связанная с активностью каспазы-1 [179].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активность протеолитических ферментов при апоптозе представляет собой многоуровневую сеть, в которой задействованы протеиназы всех известных каталитических классов и все звенья которой взаимосвязаны и дублируют друг друга. Время, требуемое для активации каспаз, варьирует в зависимости от концентрации проапоптозных агентов в клетке. Однако, если сигнал активации апоптоза передан на протеолитический каскад, реализация программы апоптоза уже не зависит от состояния клетки. Активация каспаз при апоптозе действует по принципу “все или ничего” [180].

Система протеолитических каскадов функционирует по принципу обратной связи. Сплайсинговые варианты большинства каспаз дают укороченные формы ферментов, обладающие антиапоп-

тозной активностью, что позволяет остановить развитие программы гибели клетки на этом уровне передачи сигналов.

Наличие циклов амплификации между группами каспаз позволяет многократно усиливать первоначальный сигнал апоптоза и делать развитие программы гибели клетки необратимой. Это также позволяет ускорить разборку клеточного материала, что особенно важно при вирусном поражении клеток. Активация каспазы-3 требуется для быстрой кинетики расщепления белков, когда сигнал апоптоза в клетке замедлен в силу тех или иных причин. Именно каспаза-3 участвует практически во всех известных на данный момент циклах амплификации [178].

Очень важным моментом в вопросе активации каспаз является их транслокация в ядро. В самое последнее время появились публикации, анализ которых позволяет сделать вывод, что практически все известные каспазы транслоцируются в ядро после активации и передачи сигнала на следующий вторичный мессенджер. Каспаза-9 принимает наиболее активное участие в разборке ядра: она инактивирует ядерный транспорт и повышает лимит диффузии ядерных пор, что позволяет каспазе-3 войти в ядро. Обычно локализованная в цитозоле, каспаза-3 транспортируется в ядро через ядерные поры путем диффузии [135]. Белки DEDD и DEDD2 также являются транспортерами каспаз-8 и -10 в ядро [181].

Помимо протеолитической функции, каспазы в ядре могут выполнять и регуляторные функции, в частности, взаимодействуя с ядерными рецепторами или сфингомиelinовым циклом в ядре. Это направление биохимии каспаз совершенно не изучено, но представляется весьма интересным, так как возможны открытия, связанные с регулированием трансляции генов и белков клеточного цикла.

Конечной целью таких сложных перемещений в клетке служит полноценная и энергосберегающая разборка клетки на апоптозные тельца. Каспазы расщепляют только ключевые белки, которые составляют мизерную часть от общего пула белков в клетке, что, тем не менее, эффективно разделяет клеточный материал на части, окруженные мембранный и готовые для утилизации фагоцитами, окружающими клетки, выходящие в апоптоз.

Сцепление каскадов каспаз с убиквитинзависимым протеолизом представляет собой, наверное, наиболее перспективное направление изучения сигнальных систем апоптоза. Протеасомные ингибиторы в сочетании с регуляторами активности каспаз позволяют необратимо активировать апоптоз в опухолевых клетках или предотвратить апоптоз в нейронах при нейродегенеративных заболеваниях.

В изучении сигнальных путей каспаз при апоптозе сделаны только первые шаги. Открытие физиологических ингибиторов апоптоза, таких, как

FLIP или IAPs, регулирующих активность каспаз в апоптозе, показывает неисчерпаемые возможности клетки для поддержания гомеостаза и естественного завершения жизненного цикла.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор искренне признателен Т.В. Ротановой (ИБХ РАН) за помощь и критические замечания в процессе подготовки рукописи к печати.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Мартынова Е.А. // Росс. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. 1999. Т. IX (4). С. 75–83.
- Nicotera P., Leist M., Ferrando-May E. // Toxicol. Lett. 1998. V. 102/103. P. 139–142.
- White B., Sullivan J. // Acad. Emerg. Med. 1998. V. 5. P. 1019–1029.
- Saraste A. // Herz. 1999. V. 24. P. 189–195.
- Yuan J., Shalam S., Ledoux S., Ellis H.M., Horvitz H.R. // Cell. 1993. V. 75. P. 641–652.
- Cerretti D.P., Kozlosky C.J., Mosley B., Nelson N., van Ness K., Greenstreet T.A., March C.J., Kronheim S.R., Druck T., Cannizzaro L.A. // Science. 1992. V. 256. P. 97–100.
- Thornberry N.A., Bull H.G., Calaycay J.R., Chapman K.T., Howard A.D., Kostura M.J., Miller D.K., Molineaux S.M., Weidner J.R., Aunins J. // Nature. 1992. V. 356. P. 768–774.
- Stennicke H., Salvesen G. // Biochem. Biophys. Acta. 1998. V. 1387. P. 17–31.
- van Criekinge W., van Gurp M., Decoster E., Schotte P., van de Craen M., Fiers W., Vandenebeele P., Beyaert R. // Anal. Biochem. 1998. V. 263. P. 62–66.
- van de Craen M., Vandenebeele P., Declercq W., van den Brande I., van Loo G., Molemans F., Schotte P., van Criekinge W., Beyaert R., Fiers W. // FEBS Lett. 1997. V. 403. P. 61–69.
- Wang S., Miura M., Jung Y., Zhu H., Gagliardini V., Shi L., Greenberg A.H., Yuan J. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 20 580–20 587.
- Fernandes-Alnemri T., Litwack G., Alnemri E.S. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 30 761–30 764.
- Tewari M., Quan L., O'Rourke K., Desnoyers S., Zeng Z., Beidler D.R., Poirier G.G., Salvesen G.S., Dixit V.M. // Cell. 1995. V. 81. P. 801–809.
- Nicholson D.W., Ali A., Thornberry N.A., Vaillancourt J.P., Ding C.K., Gallant M., Gareau Y., Griffin P.R., Labelle M., Lazebnik Y.A. // Nature. 1995. V. 376. P. 37–43.
- Srinivasula S.M., Fernandes-Alnemri T., Zangrilli J., Robertson N., Armstrong R.C., Wang L., Trapani J.A., Tomaselli K.J., Litwack G., Alnemri E.S. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 27 099–27 106.
- Duan H., Orth K., Chinnaiyan A. M., Poirier G.G., Froelich C.J., He W.W., Dixit V.M. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 16 720–16 724.
- van de Craen M., van Loo G., Declercq W., Schotte P., van den Brande I., Mandruzzato S., van der Bruggen P., Fiers W., Vandenebeele P. // J. Mol. Biol. 1998. V. 284. P. 1017–1026.

18. Muzio M., Chinnaiyan A.M., Kischkel F.C., O'Rourke K., Shevchenko A., Ni J., Scaffidi C., Bretz J.D., Zhang M., Gentz R., Mann M., Krammer P.H., Peter M.E., Dixit V.M. // Cell. 1996. V. 85. P. 817–827.
19. Eckhart L., Ban J., Fischer H., Tschachler E. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000. V. 277. P. 655–659.
20. Lippens S., Kockx M., Knaapen M., Mortier L., Polakowska R., Verheyen A., Garmyn M., Zwijsen A., Formstecher P., Huylebroeck D., Vandenabeele P., Declercq W. // Cell Death Differ. 2000. V. 7. P. 1218–1224.
21. Walker N.P., Talanian R.V., Brady K.D., Dang L.C., Bump N.J., Ferenz C.R., Franklin S., Ghayur T., Hackett M.C., Hammill L.D. // Cell. 1994. V. 78. P. 343–352.
22. Wilson K.P., Black J.A., Thomson J.A., Kim E.E., Griffith J.P., Navia M.A., Murcko M.A., Chambers S.P., Al-dape R.A., Raybuck S.A. // Nature. 1994. V. 370. P. 270–275.
23. Boldin M., Goncharov T., Goltsev Y., Wallach D. // Cell. 1996. V. 85. P. 803–815.
24. Hofmann K., Bucher P., Tschoopp J. // Trends Biochem. Sci. 1997. V. 22. P. 155–156.
25. Inohara N., Nunez G. // Oncogene. 2001. V. 20. P. 6473–6481.
26. Thornberry N., Rano T., Peterson E., Rasper D., Timkey T., Garcia-Calvo M., Houtzager V., Nordstrom P., Roy S., Vaillancourt J., Chapman K., Nicholson D. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 17907–17911.
27. Hans M., Muller M., Meyer-Ficca M., Burkle A., Kupper J. // Oncogene. 1999. V. 18. P. 7010–7015.
28. Ha H., Snyder S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 13 978–13 982.
29. Hirota J., Furuichi T., Mikoshiba K. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 34 433–34 437.
30. Bae S.S., Perry D.K., Oh Y.S., Choi J.H., Galadari S.H., Ghayur T., Ryu S.H., Hannun Y.A., Suh P.G. // FASEB J. 2000. V. 14. P. 1083–1089.
31. Nunez G., Benedict M., Hu Y., Inohara N. // Oncogene. 1998. V. 17. P. 3237–3245.
32. Taylor S., Hanlon L., McGillivray C., Gault E.A., Argyle D.J., Onions D.E., Nicolson L. // DNA Seq. 2000. V. 10. P. 387–394.
33. Munday N.A., Vaillancourt J.P., Ali A., Casano F.J., Miller D.K., Molineaux S.M., Yamin T.T., Yu V.L., Nicholson D.W. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 15870–15876.
34. Kamens J., Paskind M., Hugunin M., Talanian R.V., Allen H., Banach D., Bump N., Hackett M., Johnston C.G., Li P. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 15250–15256.
35. Faucheu C., Diu A., Chan A.W., Blanchet A.M., Miossec C., Herve F., Collard-Dutilleul V., Gu Y., Al-dape R.A., Lippke J.A. // EMBO J. 1995. V. 14. P. 1914–1922.
36. van de Craen M., van de Brande I., Declercq W., Irmel M., Beyaert R., Tschoopp J., Fiers W., Vandenabeele P. // Eur. J. Immunol. 1997. V. 27. P. 1296–1299.
37. Yamanaka K., Tanaka M., Tsutsui H., Kupper T.S., Asahi K., Okamura H., Nakanishi K., Suzuki M., Kayagaki N., Black R.A., Miller D.K., Nakashima K., Shimizu M., Mizutani H. // J. Immunol. 2000. V. 165. P. 997–1003.
38. Alnemri E., Livingston D., Nicolson D., Salvesen G., Thornberry N., Wohlg W., Yuan J. // Cell. 1996. V. 87. P. 171–175.
39. Wardlow S., Penha-Goncalves M.N., Argyle D.J., Onions D.E., Nicolson L. // DNA Seq. 1999. V. 10. P. 133–137.
40. Ghayur T., Banerjee S., Hugunin M., Butler D., Herzog L., Carter A., Quintal L., Sekut L., Talanian R., Paskind M., Wong W., Kamen R., Tracey D., Allen H. // Nature. 1997. V. 386. P. 619–621.
41. Ramage P., Cheneval D., Chevi M., Graff P., Hemmig R., Heng R., Kocher H.P., Mackenzie A., Memmert K., Revesz L. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 9378–9382.
42. Yamin T., Ayala J., Miller D. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 13273–13278.
43. van Criekinge W., Beyaert R., van de Craen M., Vandenabeele P., Schotte P., De Valck D., Fiers W. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 27245–27248.
44. Razmara M., Srinivasula S.M., Wang L., Poyet J.L., Geddes B.J., DiStefano P.S., Bertin J., Alnemri E.S. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 13952–13958.
45. Asahi K., Mizutani H., Tanaka M., Miura M., Yamanka K., Matsushima K., Nakashima K., Shimizu M. // J. Dermatol. Sci. 1999. V. 21. P. 49–58.
46. Siegmund B., Lehr H., Fantuzzi G., Dinarello C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 13249–13254.
47. Suzuki A., Iwasaki M., Kato M., Wagai N. // Exp. Cell. Res. 1997. V. 233. P. 41–47.
48. Hilbi H., Moss J.E., Hersh D., Chen Y., Arondel J., Banerjee S., Flavell R.A., Yuan J., Sansonetti P.J., Zychlinsky A. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 32895–32900.
49. Kaszkin M., Huwiler A., Scholz K., van den Bosch H., Pfeilschifter J. // FEBS Lett. 1998. V. 440. P. 163–166.
50. Kamada S., Washida M., Hasegawa J., Kusano H., Funahashi Y., Tsujimoto Y. // Oncogene. 1997. V. 15. P. 285–290.
51. Hisahara S., Yuan J., Momoi T., Okano H., Miura M. // J. Exp. Med. 2001. V. 193. P. 111–122.
52. Kang S.J., Wang S., Hara H., Peterson E.P., Namura S., Amin-Hanjani S., Huang Z., Srinivasan A., Tomaselli K.J., Thornberry N.A., Moskowitz M.A., Yuan J. // J. Cell. Biol. 2000. V. 149. P. 613–622.
53. Suk K., Kim S.Y., Kim H. // J. Neurochem. 2002. V. 80. P. 230–238.
54. Schotte P., van Criekinge W., van de Craen M., van Loo G., Desmedt M., Grootenhuis J., Cornelissen M., De Ridder L., Vandekerckhove J., Fiers W., Vandenabeele P., Beyaert R. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998. V. 251. P. 379–387.
55. Koenig U., Eckhart L., Tschachler E. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. V. 285. P. 1150–1154.
56. Humke E.W., Ni J., Dixit V.M. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 15702–15707.
57. Kilic M., Schafer R., Hoppe J., Kagerhuber U. // Cell Death Differ. 2002. V. 9. P. 125–137.
58. Fernandes-Alnemri T., Armstrong R.C., Krebs J., Srinivasula S.M., Wang L., Bullrich F., Fritz L.C., Trapani J.A., Tomaselli K.J., Litwack G., Alnemri E.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 7464–7469.

59. Srinivasula S.M., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T., Litwack G., Alnemri E.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 14486–14491.
60. Koriyama H., Kouchi Z., Umeda T., Saido T., Momoi T., Ishiura S., Suzuki K. // Cell Signal. 1999. V. 11. P. 831–838.
61. Kim K.W., Kim B.J., Chung C.W., Jo D.G., Kim I.K., Song Y.H., Kwon Y.K., Woo H.N., Jung Y.K. // J. Cell Biochem. 2002. V. 85. P. 334–345.
62. Marissen W.E., Lloyd R.E. // Mol. Cell. Biol. 1998. V. 18. P. 7565–7574.
63. Spinedi A., Amendola A., Di Bartolomeo S., Piacentini M. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998. V. 243. P. 852–857.
64. Wolf B., Schuler M., Echeverri F., Green J. // Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 30651–30656.
65. Pochampally R., Fodera B., Chen L., Shao W., Levine E.A., Chen J. // Oncogene. 1998. V. 17. P. 2629–2636.
66. Fernandes-Alnemri T., Litwack G., Alnemri E.S. // Cancer Res. 1995. V. 55. P. 2737–2742.
67. Buendia B., Santa-Maria A., Courvalin J.C. // J. Cell Sci. 1999. V. 112. P. 1743–1753.
68. Doostzadeh-Cizeron J., Yin S., Goodrich D.W. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 25336–25341.
69. Bowen C., Voeller H., Kikly K., Gelmann E. // Cell Death Differ. 1999. V. 6. P. 394–401.
70. Lippke J.A., Gu Y., Sarnecki C., Caron P.R., Su M.S. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 1825–1828.
71. Machleidt T., Geller P., Schwandner R., Scherer G., Kronke M. // FEBS Lett. 1998. V. 436. P. 51–54.
72. Behrensdorf H.A., van de Craen M., Knies U.E., Vandebaele P., Clauss M. // FEBS Lett. 2000. V. 466. P. 143–147.
73. Watt W., Koeplinger K.A., Mildner A.M., Heinrikson R.L., Tomasselli A.G., Watenpaugh K.D. // Structure Fold Des. 1999. V. 7. P. 1135–1143.
74. Tsukumo S.I., Yonehara S. // Genes Cells. 1999. V. 4. P. 541–549.
75. Eggert A., Grotzer M.A., Zuzak T.J., Wiewrodt B.R., Ho R., Ikegaki N., Brodeur G.M. // Cancer Res. 2001. V. 61. P. 1314–1319.
76. Chaudhary P.M., Eby M.T., Jasmin A., Kumar A., Liu L., Hood L. // Oncogene. 2000. V. 19. P. 4451–4460.
77. Wang J., Chun H.J., Wong W., Spencer D.M., Lenardo M.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 13884–13888.
78. Ng P.W., Porter A.G., Janicke R.U. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 10301–10318.
79. Shikama Y., Shen L., Yonetani M., Miyauchi J., Miyashita T., Yamada M. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. V. 291. P. 484–493.
80. Jin K., Graham S.H., Mao X., Nagayama T., Simon R.P., Greenberg D.A. // J. Cereb. Blood Flow Metab. 2001. V. 21. P. 1411–1421.
81. Baker S., Reddy E. // Oncogene. 1998. V. 17. P. 3261–3270.
82. Cremesti A., Paris F., Grassme H., Holler N., Tschopp J., Fuks Z., Gulbins E., Kolesnick R. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 23954–23961.
83. Estelles A., Charlton C.A., Blau H.M. // Dev. Biol. 1999. V. 216. P. 16–28.
84. Hofmann K. // Cell. Mol. Life Sci. 1999. V. 55. P. 1113–1128.
85. Levkau B., Scatena M., Giachelli C., Ross R., Raines E. // Nat. Cell Biol. 1999. V. 1. P. 227–233.
86. von Mering M., Wellmer A., Michel U., Bunkowski S., Tlustochowska A., Bruck W., Kuhnt U., Nau R. // Brain Pathol. 2001. V. 11. P. 282–295.
87. Adam-Klages S., Adam D., Weigmann K., Struve S., Kolanus W., Schneider-Mergener J., Kronke M. // Cell. 1996. V. 86. P. 937–947.
88. Ido M., Hayashi K., Kato S., Ogawa H., Komada Y., Zhou Y.W., Zhang X.L., Sakurai M., Suzuki K. // Br. J. Cancer. 1996. V. 73. P. 360–365.
89. Higuchi M., Singh S., Jaffrezou J., Aggarwal B. // J. Immunol. 1996. V. 157. P. 297–304.
90. Kennedy N.J., Budd R.C. // J. Immunol. 1998. V. 160. P. 4881–4888.
91. Gosmann R., Kilkus J., Scurlock B., Dawson G. // Neurochem. Res. 2002. V. 27. P. 735–741.
92. Yeh W., de la Pompa J., McCurrach M., Shu H.B., Elia A.J., Shahinian A., Ng M., Wakeham A., Khoo W., Mitchell K., El-Deiry W.S., Lowe S.W., Goeddel D.V., Mak T.W. // Science. 1998. V. 279. P. 1954–1957.
93. Imai Y., Kimura T., Murakami A., Yajima N., Sakamaki K., Yonehara S. // Nature. 1999. V. 398. P. 777–784.
94. Kataoka T., Schroter M., Hahne M., Schneider P., Irminger M., Thome M., Froelich C.J., Tschopp J. // J. Immunol. 1998. V. 161. P. 3936–3942.
95. Stegh A., Schickling O., Ehret A., Scaffidi C., Peterhansel C., Hofmann T., Grummt I., Krammer P., Peter M. // EMBO J. 1998. V. 17. P. 5974–5986.
96. Torii S., Egan D., Evans R., Reed J. // EMBO J. 1999. V. 18. P. 6037–6049.
97. Zheng L., Schickling O., Peter M., Lenardo P. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 31945–31952.
98. Chan S., Tan K., Zhang L., Yee K., Ronca F., Chan M., Yu V. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 32461–32468.
99. Irie S., Hachiya T., Rabizadeh S., Maruyama W., Mukai J., Li Y., Reed J., Bredesen D., Sato T. // FEBS Lett. 1999. V. 460. P. 191–198.
100. Shohat G., Spivak-Kroizman T., Cohen O., Bialik S., Shani G., Berrisi H., Eisenstein M., Kimchi A. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 47460–47467.
101. Jin Y., Blue E.K., Dixon S., Hou L., Wysolmerski R.B., Gallagher P.J. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 39667–39678.
102. Lee S., Shin M., Kim H., Lee H., Park W., Kim S., Lee J., Han S., Park Y., Oh R., Jang J., Han J., Lee J., Yoo N. // Cancer Res. 1999. V. 59. P. 5683–5686.
103. Marsters S., Pitti R., Sheridan J., Ashkenazi A. // Recent Prog. Horm. Res. 1999. V. 54. P. 225–234.
104. Hymowitz S., Christinger H., Fuh G., Ultsch M., O'Connell M., Kelley R., Ashkenazi A., de Vos A. // Mol. Cell. 1999. V. 4. P. 563–571.
105. Scaffidi C., Schmitz I., Zha J., Korsmeyer S., Krammer P., Peter M. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 22532–22538.

106. Huang D., Hahne M., Schroter M., Frei K., Fontana A., Villunger A., Newton K., Tschopp J., Strasser A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 14871–14876.
107. Boesen-de-Cock J., Tepper A., de-Vries E., van Blitterswijk W., Borst J. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 14255–14261.
108. Lutter M., Perkins G.A., Wang X. // BMC Cell Biol. 2001. V. 2. P. 22–29.
109. Yamada H., Tada-Oikawa S., Uchida A., Kawaniishi S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999. V. 265. P. 130–133.
110. Grinberg M., Sarig R., Zaltsman Y., Frumkin D., Grammatikakis N., Reuveny E., Gross A. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 12237–12245.
111. Tan K.O., Tan K.M., Yu V.C. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 23687–23690.
112. Wang L., Miura M., Bergeron L., Zhu H., Yuan J. // Cell. 1994. V. 78. P. 739–750.
113. Kumar S., Kinoshita M., Noda M., Copeland N.G., Jenkins N.A. // Genes Dev. 1994. V. 8. P. 1613–1626.
114. Droin N., Bichat F., Rebe C., Wotawa A., Sordet O., Hammann A., Bertrand R., Solary E. // Blood. 2001. V. 97. P. 1835–1844.
115. Li H., Bergeron L., Cryns V., Pasternack M., Zhu H., Shi L., Greenberg A., Yaun J. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 21010–21017.
116. Colussi P.A., Harvey N.L., Kumar S. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 24535–24542.
117. Paroni G., Henderson C., Schneider C., Brancolini C. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 15147–15161.
118. Henshall D., Skradski S., Bonislawski D., Lan J., Simon R. // J. Neurochem. 2001. V. 77. P. 886–895.
119. Guo Y., Srinivasula S.M., Drulhe A., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E.S. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 13430–13437.
120. Hampton M.B., Fadeel B., Orrenius S. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1998. V. 854. P. 328–335.
121. Han Z., Bhalla K., Pantazis P., Hendrickson E., Wyche J. // Mol. Cell. Biol. 1999. V. 19. P. 1381–1389.
122. Murphy K.M., Streips U.N., Lock R.B. // Oncogene. 1999. V. 18. P. 5991–5999.
123. Finucane D., Bossy-Wetzel E., Waterhouse N., Cotter T., Green D. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 2225–2233.
124. Susin S., Lorenzo H., Zamzami N., Marzo I., Brenner C., Larochette N., Prevost M., Alzari P., Kroemer G. // J. Exp. Med. 1999. V. 189. P. 381–394.
125. Lorenzo H., Susin S., Penninger J., Kroemer G. // Cell Death Differ. 1999. V. 6. P. 516–524.
126. Wu G., Chai J., Suber T.L., Wu J.W., Du C., Wang X., Shi Y. // Nature. 2000. V. 408. P. 1008–1012.
127. MacFarlane M., Merrison W., Bratton S., Cohen G. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 36611–36616.
128. Qin H., Srinivasula S.M., Wu G., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E.S., Shi Y. // Nature. 1999. V. 399. P. 549–557.
129. Rodriguez J., Lazebnik Y. // Genes Dev. 1999. V. 13. P. 3179–3184.
130. Zhou P., Chou J., Olea R.S., Yuan J., Wagner G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 11265–11270.
131. Hu Y., Ding L., Spencer D., Nunez G. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 33489–33498.
132. Chalfant C.E., Rathman K., Pinkerman R.L., Wood R.E., Obeid L.M., Ogretmen B., Hannun Y.A. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 12587–12595.
133. Wu L.W., Reid S., Ritchie A., Broxmeyer H.E., Donner D.B. // Blood Cells Mol. Dis. 1999. V. 25. P. 20–29.
134. Stephanou A., Scarabelli T., Knight R., Latchman D. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 13693–13699.
135. Faleiro L., Lazebnik Y. // J. Cell. Biol. 2000. V. 151. P. 951–960.
136. Sumitomo M., Ohba M., Asakuma J., Asano T., Kuroki T., Asano T., Hayakawa M. // J. Clin. Invest. 2002. V. 109. P. 827–836.
137. Machiels B.M., Henfling M.E., Schutte B., van Engelund M., Broers J.L., Ramaekers F.C. // Eur. J. Cell. Biol. 1996. V. 70. P. 250–259.
138. Mimnaugh E.G., Kayastha G., McGovern N.B., Hwang S.G., Marcu M.G., Trepel J., Cai S.Y., Marchesi V.T., Neckers L. // Cell Death Differ. 2001. V. 8. P. 1182–1196.
139. Sun J., Nam S., Lee C.S., Li B., Coppola D., Hamilton A.D., Dou Q.P., Sebti S.M. // Cancer Res. 2001. V. 61. P. 1280–1284.
140. Kim K., Kim B., Chung C. // J. Cell Biochem. 2002. V. 85. P. 334–345.
141. Huang Y., Shin N.H., Sun Y., Wang K.K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. V. 283. P. 762–769.
142. Almond J.B., Snowden R.T., Hunter A., Dinsdale D., Cain K., Cohen G.M. // Leukemia. 2001. V. 15. P. 1388–1397.
143. Harvey K.F., Harvey N.L., Michael J.M., Parasivam G., Waterhouse N., Alnemri E.S., Watters D., Kumar S. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 13524–13530.
144. Vugmeyster Y., Borodovsky A., Maurice M.M., Maehr R., Furman M.H., Ploegh H.L. // Mol. Immunol. 2002. V. 39. P. 431–441.
145. Kisseelev A., Akopian T., Castillo V., Goldberg A. // Mol. Cell. 1999. V. 4. P. 395–402.
146. Daino H., Matsumura I., Takada K., Odajima J., Tanaka H., Ueda S., Shibayama H., Ikeda H., Hibi M., Machii T., Hirano T., Kanakura Y. // Blood. 2000. V. 95. P. 2577–2585.
147. Rao R.V., Hermel E., Castro-Obregon S., del Rio G., Ellerby L.M., Ellerby H.M., Bredesen D.E. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 33869–33870.
148. Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B.A., Yuan J. // Nature. 2000. V. 403. P. 98–103.
149. Kilic M., Schafer R., Hoppe J., Kagerhuber U. // Cell Death Differ. 2002. V. 9. P. 125–137.
150. Rao R.V., Peel A., Logvinova A., del Rio G., Hermel E., Yokota T., Goldsmith P.C., Ellerby L.M., Ellerby H.M., Bredesen D.E. // FEBS Lett. 2002. V. 514. P. 122–128.
151. Rao R.V., Castro-Obregon S., Frankowski H., Schuler M., Stoka V., del Rio G., Bredesen D.E., Ellerby H.M. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 21836–21842.
152. Morishima N., Nakanishi K., Takenouchi H., Shiba T., Yasuhiko Y. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 34287–34294.

153. Yoneda T., Imaizumi K., Oono K., Yui D., Gomi F., Katayama T., Tohyama M. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 13935–13940.
154. Jin K., Nagayama T., Mao X., Kawaguchi K., Hickey R., Greenberg D., Simon R., Graham S. // J. Neurochem. 2002. V. 81. P. 25–35.
155. Fujita E., Kuroku Y., Jimbo A., Isoai A., Maruyama K., Momoi T. // Cell Death Differ. 2002. V. 9. P. 1108–1114.
156. Blazquez C., Geelen M., Velasco G., Guzman M. // FEBS Lett. 2001. V. 489. P. 149–153.
157. Ivins K., Thornton P., Rohn T., Cotman C. // Neurobiol. Dis. 1999. V. 6. P. 440–449.
158. Troy C., Rabacchi S., Friedman W., Frappier T., Brown K., Shelanski M. // J. Neurosci. 2000. V. 20. P. 1386–1392.
159. van de Craen M., de Jonghe C., van den Brande I., Declercq W., van Gassen G., van Criekinge W., Vanderhoeven I., Fiers W., van Broeckhoven C., Hendriks L., Vandenebeele P. // FEBS Lett. 1999. V. 445. P. 149–154.
160. Kuroku Y., Fujita E., Jimbo A., Kikuchi T., Yamagata T., Momoi M.Y., Kominami E., Kuida K., Sakamaki K., Yonehara S., Momoi T. // Hum. Mol. Genet. 2002. V. 11. P. 1505–1515.
161. Wang G.H., Mitsui K., Kotliarova S., Yamashita A., Nagaoka Y., Tokuhiro S., Iwatsubo T., Kanazawa I., Nukina N. // Neuroreport. 1999. V. 10. P. 2435–2438.
162. Tanaka Y., Engelender S., Igarashi S., Rao R.K., Wanner T., Tanzi R.E., Sawa A.L., Dawson V., Dawson T.M., Ross C.A. // Hum. Mol. Genet. 2001. V. 10. P. 919–926.
163. Yeh J., Hsu S., Han S., Lai M. // J. Exp. Med. 1998. V. 188. P. 1795–1802.
164. Kirchoff S., Muller W., Krueger A., Schmitz I., Kramer P. // J. Immunol. 2000. V. 165. P. 6293–6300.
165. Xiao C., Yang B., Asadi N., Beguinot F., Hao C. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 25020–25025.
166. Suliman A., Lam A., Datta R., Srivastava R. // Oncogene. 2001. V. 20. P. 2122–2133.
167. Deveraux Q.L., Leo E., Stennicke H.R., Welsh K., Salvesen G.S., Reed J.C. // EMBO J. 1999. V. 18. P. 5242–5251.
168. Tamm I., Wang Y., Sausville E., Scudiero D.A., Vigna N., Oltersdorf T., Reed J.C. // Cancer Res. 1998. V. 58. P. 5215–5320.
169. Cuillier O., Levade T. // Blood. 2001. V. 98. P. 2828–2836.
170. Buckley C.D., Pilling D., Henriquez N.V., Parsonage G., Threlfall K., Scheel-Toellner D., Simmons D.L., Akbar A.N., Lord J.M., Salmon M. // Nature. 1999. V. 397. P. 534–539.
171. Hehner S., Hofmann T., Ratter F., Droege W., Schmitz M. // Eur. J. Biochem. 1999. V. 264. P. 132–139.
172. Schett G., Steiner C.W., Groger M., Winkler S., Graninger W., Smolen J., Xu Q., Steiner G. // FASEB J. 1999. V. 13. P. 833–842.
173. Gibson S., Oyer R., Spalding A., Anderson S., Johnson G. // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. P. 205–212.
174. Wagenknecht B., Schulz J., Gulbins E., Weller M. // Cell Death Differ. 1998. V. 5. P. 894–900.
175. Garcia-Calvo M., Peterson E.P., Leiting B., Ruel R., Nicholson D.W., Thornberry N.A. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 32608–32613.
176. Kim K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. V. 281. P. 305–310.
177. Li J., Chen P., Sinogeeva N., Gorospe M., Wersto R., Chrest F., Barnes J., Liu Y. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 49504–49510.
178. Seol D., Li J., Seol M., Park S., Talanian R., Billiar T. // Cancer Res. 2001. V. 61. P. 1138–1143.
179. Grobmyer S.R., Armstrong R.C., Nicholson S.C., Gabay C., Arend W.P., Potter S.H., Melchior M., Fritz L.C., Nathan C.F. // Mol. Med. 1999. V. 5. P. 585–594.
180. Rehm M., Dussmann H., Janicke R.U., Tavare J.M., Kogel D., Prehn J.H. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 24506–24514.
181. Alcivar A., Hu S., Tang J., Yang X. // Oncogene. 2003. V. 22. P. 291–297.

Apoptotic Regulation of Caspase Activity

E. A. Martinova

Phone/fax: 7 (095) 298-1850; e-mail: eamartinova@lycos.com

State Research Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Sciences, Ust'inskiy proezd 2/14, Moscow, 109240 Russia

Intracellular cysteine aspartate-specific proteases (caspases) play both signaling and effector roles in realizing the program of cell death. Caspases function as proteolytic cascades unique for each cell type and signal triggering apoptosis. All parts of the proteolytic cascades are duplicated and controlled by feedback signals. Amplification cycles between pairs of caspases (the third and the sixth, the ninth and the third, the twelfth and the sixth, and others) help multiply the initial apoptotic signal. The presence of physiological inhibitors of apoptosis that directly interact with caspases creates a multilevel regulatory network of apoptosis in cell. The caspase proteolytic cascades are also regulated by sphingolipid secondary messengers, among them ceramide, sphingosine, and their phosphates. Moreover, an association of the caspase signaling with ubiquitin-dependent proteolysis is shown in cells. In particular, the use of extracellular activators and inhibitors of caspases allows irreversible activation of apoptosis in tumor cells or the prevention of neuron death in neurodegenerative diseases. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: apoptosis; caspases, signaling, receptors; ceramide; sphingolipids; neurodegenerative diseases