

## МЕХАНИЗМЫ АПОПТОЗА

### Обзор

© 2015 М.А. Савицкая\*, Г.Е. Онищенко

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, 119991 Москва; факс: +7(495)939-43-09,  
электронная почта: nakomis@mail.ru*

Поступила в редакцию 06.07.15  
После доработки 17.07.15

В настоящее время выделяют около 15 вариантов программированной клеточной гибели (ПКГ), среди которых одним из наиболее распространенных и хорошо изученных является апоптоз. В данном обзоре рассматриваются механизмы индукции апоптоза с участием плазматической мембраны и таких мембранных органелл, как митохондрии, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, лизосомы и ядро. Представлены данные о характере каскадов каспаз, включенных в эти механизмы. Проведено сопоставление разных механизмов индукции апоптоза и путей их реализации. Продемонстрировано, что все они тесно взаимосвязаны между собой, и нередко имеет место переключение с одного пути на другой. При этом в большинстве случаев конечным результатом становится нарушение проницаемости митохондриальной мембраны и/или активация эффекторных каспаз. Оба этих события тесно связаны между собой и служат центральным местом интеграции путей апоптотической гибели клетки.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** апоптоз, некроз, каскады каспаз, мембранные органеллы.

Жизнь любого многоклеточного организма сопровождается постоянным делением его клеток и их гибелью. В период эмбрионального развития за счет активного размножения клеток, их движения и дифференцировки формируются ткани и органы нового организма. Но даже в этот отрезок жизни часть клеток закономерно погибает. Так регулируется численность клеток, идет формообразование определенных областей растущего организма, устанавливаются необходимые связи между разными типами клеток.

В настоящее время различают две основные формы клеточной гибели: некроз и программированную гибель клеток. Некроз можно описать как неспецифическое набухание клетки и ее мембранных органелл, которое завершается нарушением их целостности. В результате разрывов в плазматической мембране содержимое клетки оказывается во внеклеточном пространстве. Если некроз клеток происходит в организме многоклеточного животного, развивается воспалительный процесс. Принципиальным от-

личием программированной гибели клеток является то, что в процессе смерти плазматическая мембрана клетки, как правило, сохраняет свою целостность, и остатки клеток могут быть поглощены либо местными макрофагами, либо соседними клетками. Это означает, что в случае программированной гибели клеток отсутствует генерализованный ответ организма в виде воспалительной реакции.

В условиях нормальной жизнедеятельности организма поддерживается тот баланс, который характерен для каждой ткани и органа в данный период существования. Нарушение баланса между размножением и гибелью клеток ведет к развитию многих заболеваний. В случае преобладания клеточного деления по сравнению с гибелью возникают опухоли. Если баланс смещен в сторону гибели клеток, то в тканях и органах начинаются дегенеративные процессы [1].

Исследования механизмов клеточной гибели показали, что существуют разные пути элиминации клеток. Некоторые из них можно назвать клеточным самоубийством. В то же время в определенных ситуациях происходит атака и уничтожение одних клеток другими. В последние годы ведется активный поиск способов управления путями гибели клеток. Это позволит оптимизировать те схемы химических и физических воздействий, которые применяют при

Принятые сокращения: ПКГ – программированная клеточная гибель, а.о. – аминокислотные остатки, РТР – permeability transition pore, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, UPR – unfolded protein response, АГ – аппарат Гольджи, АФК – активные формы кислорода.

\* Адресат для корреспонденции.

лечении онкологических и дегенеративных заболеваний. Однако такие воздействия могут затронуть не только механизмы гибели, но и те процессы, которые включены в программы деления и дифференцировки клеток.

Данный обзор посвящен анализу механизмов инициации апоптоза, в которых участвуют плазматическая мембрана и такие мембранные органеллы клеток, как митохондрии, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, лизосомы и ядро.

### ВАРИАНТЫ ПРОГРАММИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ

Программированной клеточной гибелью (ПКГ) называют такую форму гибели клеток, которая включена в программу развития организма. Под программированностью подразумевается закономерная активация определенных генов, которые кодируют белки, запускающие процесс гибели клетки и осуществляющие

уничтожение клетки как единицы живой материи. В настоящее время известно несколько программ гибели клеток. Эти программы различаются не только набором макромолекул, запускающих и реализующих процесс гибели, но и морфологическими признаками самоуничтожения клетки. Периодически в литературе появляется классификация вариантов ПКГ [2], в которых систематизируются уже устоявшиеся данные и привлекается внимание к новым вариантам гибели, обнаруживающимся в дифференцированных тканях или при определенных патологических процессах. В настоящее время выделяют около 15 типов ПКГ. Наиболее распространенными и изученными являются апоптоз, аутофагическая гибель, программированный некроз (некроптоз) (рис. 1). При описании гибели клеток в составе тканей в ходе определенных заболеваний выделяют также так называемые альтернативные варианты — параптоз, онкоз, пироптоз, которые по многим признакам сходны с программированным некрозом. В последние годы большой интерес вызывает такой тип ПКГ, как клеточный каннибализм и его варианты: эн-

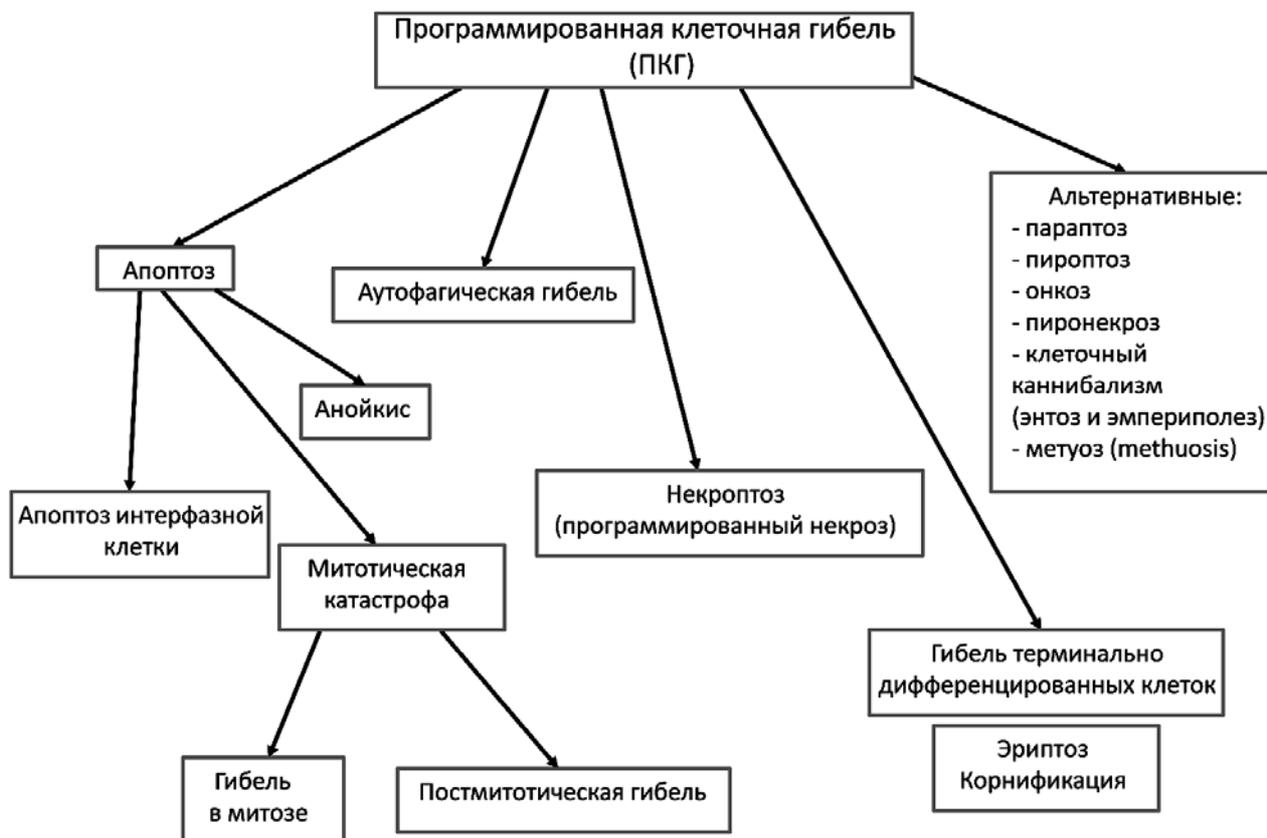


Рис. 1. Типы программированной гибели клеток

тоз и эмпериполез. При гибели терминально дифференцированных клеток может включаться особый тип ПКГ, например, кератиноциты погибают по типу корнификации [3], эритроциты – по типу эриптоза [4]. Недавно описан новый тип ПКГ – метуоз (methuosis, что означает «напиться до интоксикации») [5]. Апоптоз может быть, в свою очередь, подразделен на апоптоз одноядерных клеток и митотическую катастрофу. Митотическая катастрофа при этом подразделяется на апоптоз собственно в митозе [6] и апоптоз интерфазных клеток, образовавшихся в результате патологического митоза [7] (рис. 1).

Программа клеточной гибели может быть включена не только в связи с определенным этапом развития организма. Она запускается при повреждении клеток, которые не могут быть исправлены с помощью процессов репарации. Это может случиться с клеткой при действии различных химических соединений, которые либо являются продуктами жизнедеятельности организма (цитокины – фактор некроза опухолей, церамид), либо попали в организм извне (рицин, ретиноевая кислота и др.). Физические факторы, такие как облучение, низкие и высокие температуры и т.д., также могут приводить к ПКГ.

## АПОПТОЗ

Программа апоптотической гибели состоит из следующих основных этапов: 1) индукция, или запуск программы апоптоза; 2) активация проапоптотических белков; 3) каскад каспаз (цистеиновых протеаз), расщепляющих в конечном итоге белки-мишени; 4) разрушение внутриклеточных органелл или их перестройка; 5) фрагментация клетки на апоптотические тельца; 6) подготовка клетки и ее фрагментов к фагоцитозу макрофагами или соседними клетками.

В запуске апоптоза участвуют различные органеллы [8, 9], такие как плазматическая мембрана, митохондрии [10, 11], эндоплазматический ретикулум [12–14], аппарат Гольджи [15, 16], лизосомы [17], ядро [18, 19], центросома и центриоли [6].

Индукция апоптоза и активация проапоптотических белков ведет к активации каспаз (цистеиновых протеаз). Каспазы (cysteine-dependent, aspartate-specific peptidases) представляют собой цистеиновые протеазы, способные узнавать в белковых субстратах последовательность из четырех аминокислот и расщеплять их за остатком аспартата. Каспазы играют важную роль в регуляции выживания или гибели клеток, а также

воспалении, пролиферации и дифференцировке. В настоящее время у человека известно 11 каспаз (каспазы-1–10 и каспаза-14), подразделяемых на группы на основании их аминокислотных последовательностей, которые, в свою очередь, обычно связаны с участием данных белков в тех или иных процессах, происходящих в клетке. В целом каспазы можно разделить на воспалительные (каспазы-1, -4 и -5) и апоптотические. Среди последних, в свою очередь, выделяют инициаторные (каспазы-2, -8, -9, -10) и эффекторные (каспазы-3, -6, -7). Для каспаз характерно наличие *N*-концевого продомена, содержащего сайт для (ауто)протеолиза и варьирующего по длине у различных типов каспаз. У эффекторных каспаз продомен короткий (~25 а.о.), в то время как инициаторные каспазы обладают длинным продомом (100–200 а.о.). В продоме инициаторных каспаз содержится последовательность CARD (caspase recruitment domain – inflammatory and initiator caspases) или DED (death effector domain – initiator caspases). При этом каталитические домены у различных типов каспаз практически идентичны. Все известные каспазы формируют антипараллельные гомодимеры; такая димеризация необходима для формирования полностью зрелой каспазы и поддержания ее стабильности. Тем не менее разные типы каспаз димеризуются на разных этапах процесса активации. Как правило, воспалительные и инициаторные каспазы присутствуют в клетках в виде мономеров и активируются при димеризации. Эффекторные каспазы в клетках представлены в виде димерных проферментов, активация которых происходит в результате внутримолекулярного протеолиза (часто осуществляемого инициаторной каспазой). Образующаяся в результате активная форма каспазы состоит из двух больших и двух малых субъединиц [20–22].

Эффекторные каспазы атакуют структурные и регуляторные белки клетки. Так развивается каскад каспаз. Конечным итогом работы каспаз является разрушение множества белков, которые могут участвовать в поддержании гомеостаза и репарации компонентов клетки, белков-регуляторов клеточного цикла, структурных белков и т.д. В результате действия эффекторных каспаз и активированных ими других ферментов (эндонуклеаз, гельзолина и т.д.) разрушаются такие компоненты клетки, как внутриядерная ламина, нарушается целостность ДНК, идет специфическая компактизация хроматина, наблюдается распад элементов цитоскелета, митохондрий, аппарата Гольджи, эндоплазматического ретикулума и т.д. Число известных мишеней действия каспаз постоянно увеличивается [23, 24]. Помимо каспазного механизма различают

некаспазный механизм апоптотической гибели [25], при котором происходит выход из митохондрий и миграция в ядро флавопротеина AIF (apoptosis inducing factor) и эндонуклеазы G, вызывающих распад ядерной ДНК на крупные фрагменты. Наблюдаемые при данном механизме гибели биохимические и морфологические признаки соответствуют признакам апоптоза.

Морфологические преобразования в процессе апоптоза выражаются в разной степени распада внутриклеточных компонентов. Конечными этапами апоптоза являются уплотнение цитоплазмы, фрагментация ядер и самих клеток с образованием апоптотических телец, в которых могут быть фрагменты ядер, элементы аппарата Гольджи, митохондрии и т.д. Апоптотические клетки и тельца экспонируют на своей поверхности сигнальные и адгезивные молекулы, которые узнаются соседними клетками или макрофагами и способствуют фагоцитозу [26]. К таким молекулам относятся, например, фосфатидилсерин, лизофосфолипиды, витронектин, тромбоспондин и др. Процессу фагоцитоза способствует также инактивация на поверхности умирающих клеток молекул типа CD31, которые необходимы для узнавания не подлежащих поглощению жизнеспособных клеток.

В настоящее время различают внешний и внутриклеточный механизмы запуска апоптоза. Внешний механизм опосредован взаимодействием проапоптотических сигнальных молекул с рецепторами на плазматической мембране и последующей активацией в цитозоле каскада каспаз. В случае внутриклеточных механизмов каскад каспаз активируется в цитозоле в результате высвобождения проапоптотических белков из состава различных органелл, таких как митохондрии, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, либо в результате запуска экспрессии генов проапоптотических белков, например, Вах, Noxa, Puma, и последующего участия этих белков в реализации программы апоптоза.

**Рецепторный механизм апоптоза.** Лиганды, запускающие апоптоз, относятся к цитокинам суперсемейства TNF (tumor necrosis factor) и взаимодействуют с рецепторами смерти, принадлежащими к суперсемейству TNF-R. Цитокины суперсемейства TNF представляют собой мембранные или секретлируемые белки. Последние образуются в результате частичного протеолиза мембраносвязанных белков. Эти цитокины могут специфически взаимодействовать с одним или несколькими поверхностными рецепторами. В настоящее время описано около 40 таких пар лиганд–рецептор [27]. К лигандам суперсемейства TNF относятся TNF- $\alpha$ , Fas-L, TRAIL, TWEAK, RANKL, APRIL и Lymphotoxin-a (LTa).

Fas-L избирательно связывается с Fas; TRAIL может связываться с четырьмя различными рецепторами: TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3 и TRAIL-R4; TNF- $\alpha$  взаимодействует с двумя рецепторами: TNF-R1 и TNF-R2. Большинство рецепторов относятся к трансмембранным белкам класса I, которые имеют один  $\alpha$ -спиральный участок обращен во внеклеточное пространство, С-концевой представляет собой так называемый домен смерти (DD – death domain) [28]. Домен смерти взаимодействует с адапторными белками (FADD/MORT1 или TRADD) через узнающие данный участок аналогичные домены. Комплекс адапторных белков обозначают как сигнальный комплекс, индуцирующий смерть (DISC – a death-inducing signaling complex).

Лиганды семейства TNF тримеризуются и взаимодействуют с тримером рецептора [28]. При активации рецептора его внутриклеточный домен рекрутирует адапторные белки.

Рецептор Fas/CD95, активированный Fas-L, взаимодействует с адапторными белками FADD/MORT1 (Fas Associated Death Domain), которые, в свою очередь, непосредственно взаимодействуют с инициаторными прокаспазами-8 или -10 [29, 30]. Олигомеризация этих прокаспаз индуцирует их аутокаталитическое созревание в активные каспазы, которые активируют эффекторные каспазы. Эффекторная каспаза-3, в свою очередь, может активировать эффекторные каспазы-6 и -7. Следует отметить, что каспаза-8 способна расщеплять белок Bid с образованием активной формы tBid. tBid активирует Вах, который встраивается в наружную мембрану митохондрий и запускает апоптоз по митохондриальному пути [31].

TNFR1-рецептор способен образовать два комплекса адапторных белков: комплекс I, который подавляет активность каспазы-8, и комплекс II, который активирует каспазу-8 [32]. Комплекс I включает адапторные молекулы TRADD (TNFR1-Associated Death Domain), RIPK1 (Receptor Interacting Protein Kinase I), TRAFs (TNF Receptor Associated Factor proteins), cIAP1 или 2 (cellular inhibitor of apoptosis protein) и cFLIP [33]. Комплекс I подавляет активность каспазы-8, рекрутируя cFLIP (FADDlike Interleukin-1 $\beta$  Converting Enzyme (FLICE) Inhibitory Protein). cFLIP является гомологом каспазы-8, содержащим домен DED и неактивный каталитический домен. cFLIP может ингибировать апоптоз, связываясь с FADD и каспазой-8 [34–36]. При полиубиквитинировании RIPK1 создается платформа для активации сигнальных путей NF- $\kappa$ B и MAPK, таких как LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex), TAB2/3-TAK1, NEMO и IKK

[37–39]. Эти пути ведут к транслокации транскрипционных факторов в ядро и экспрессии белков, способствующих выживанию клетки и участвующих в воспалении, таких как TNF, cFLIP и cIAP2 [40]. Для образования полиубиквитиновой платформы необходима активность E3-лигаз cIAP1 и 2, которые привлекаются в состав DISC с помощью TRAF2 [41, 42].

В комплексе II адапторные белки TRADD взаимодействуют с адапторными белками FADD, которые в дальнейшем могут передавать сигнал к апоптозу (активация инициаторных каспаз) [43]. TRADD вовлечены в передачу сигнала от TNF-R, но не от Fas и TRAIL-R [44]. Так реализуется рецепторный, или внешний, путь апоптоза.

Следует отметить, что некоторые из рецепторов суперсемейства TNF имеют редуцированный цитоплазматический домен. Такой домен не способен взаимодействовать с адапторными белками и участвовать в передаче сигнала. Примером таких рецепторов являются DcR1 и DcR2 (также известные как TRAIL-R3 и TRAIL-R4). Однако их внеклеточный домен может связываться с лигандами TRAIL, конкурируя таким образом с рецепторами TRAIL-R1 или TRAIL-R2 соответственно. Аналогично устроен DcR3 (s), который конкурирует с рецептором Fas за связывание Fas-L [30]. В литературе высказывается предположение, что такие aberrантные рецепторы могут защищать некоторые нормальные клетки от цитотоксического действия лигандов смерти [45].

Таким образом, индукция апоптоза при связывании лигандов смерти с рецепторами является одним из ответов клетки. Другие реакции могут состоять в активации транскрипционного фактора NF-κB, выживании клетки и пролиферации. Однако если при активации TNF-R1 в сигнальном пути, связанном с вовлечением RIPK1, вызвать деградацию cIAPs и ингибировать активность каспаз, происходит рекрутирование RIPK3 и включается механизм еще одного варианта смерти – программированного некроза, или некроптоза [46].

Некроптоз может быть вызван не только цитокином TNFα, но и другими лигандами смерти (Fas и TRAIL/Apo2L), интерферонами, Toll-подобными рецепторами, вирусной инфекцией через сенсор ДНК DAI (DNA-dependent activator of interferon regulatory factor) [47]. Подробности сигнальных путей при некроптозе изложены в обзоре де Альмагро и Вучич [48].

**Митохондриальный механизм апоптоза.** Митохондриям принадлежит важная роль в апоптотической гибели, вызванной различными стимулами [49–53].

Ключевым событием митохондриального механизма апоптоза служит выход цитохрома *c* и ряда других белков в цитозоль в результате нарушения проницаемости митохондриальных мембран. Цитохром *c* необходим в качестве платформы для формирования апоптосомы, в состав которой также входят олигомерные белки Araf-1 и несколько молекул прокаспазы-9, а также dATP [54, 55]. После активации каспазы-9 она покидает апоптосому, рекрутирует новые молекулы прокаспазы-9 и активирует эффекторные каспазы, такие как каспаза-3, -6 и -7.

Наряду с цитохромом *c* из межмембранного пространства митохондрий высвобождаются также вспомогательные белки Smac/DIABLO и сериновая протеиназа Omi/HtrA2, связывающие и инактивирующие белки-ингибиторы апоптоза (IAPs) и способствующие активации каспаз, а также AIF и эндонуклеаза G, вызывающие каспазонезависимую фрагментацию ДНК [25, 56–58]. Активность этих белков и различных активированных каспаз также приводит к протеолитическому расщеплению целого ряда белковых субстратов, вследствие чего происходят характерные для процесса апоптоза морфологические и биохимические изменения. Интересно, что у мышей, нокаутных по *XIAP*, *Smac* и *Omi*, не наблюдается повышение чувствительности к индукции апоптоза, что свидетельствует, по-видимому, о дополнительном характере данных путей либо о специфических механизмах их активации при определенных условиях [59].

Участие митохондрий в регуляции и амплификации апоптотического каскада осуществляется с помощью белков семейства Bcl-2. Протоонкоген Bcl-2 был описан в 1980-е гг. как продукт гена, возникшего в результате транслокации t(14;18), которая часто обнаруживается при В-центрофоликулярной лимфоме. Гиперэкспрессия Bcl-2, обеспечиваемая промотором гена легкой цепи иммуноглобулина, способствует приобретению трансформированными В-клетками повышенной устойчивости к апоптозу. Белок Bcl-2 может быть ассоциирован с ядерной мембраной, эндоплазматическим ретикуломом и наружной митохондриальной мембраной [60]. В состав семейства белков Bcl-2 входят также другие антиапоптотические белки, такие как Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-W, Mcl-1, A1, проапоптотические белки BH3-only, а также белки Bax и Bak, способные нарушать проницаемость митохондриальной мембраны, формируя в ней поры. Антиапоптотические белки семейства Bcl-2 содержат четыре BH-домена и способны связываться с проапоптотическими белками, инактивируя их. Белки BH3-only (Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bmf, Hrk и Bik) яв-

ляются проапоптозными и выполняют роли сенсоров при различных стрессах. Вах, Ваk и, в ряде случаев, Воk, содержащие три ВН-домена, представляют собой эффекторные молекулы, способны изменять конформацию, олигомеризоваться и формировать во внешней мембране митохондрий поры, что вызывает нарушение ее проницаемости [61, 62]. Образование пор во внешней мембране сопровождается изменениями структуры внутренней мембраны и ремоделированием крист, что способствует поступлению белков межмембранного пространства в цитозоль [63]. Показано, что в норме Вах, в отличие от ассоциированного с митохондриями Ваk, содержится преимущественно в цитозоле; при поступлении проапоптозного сигнала он транслоцируется из цитозоля в митохондрии [59]. При активации Вах претерпевает значительные конформационные изменения.

Альтернативная гипотеза образования пор в митохондриальных мембранах предполагает, что белки семейства Vcl-2 могут участвовать в регуляции предсуществующего сложного мультибелкового комплекса, получившего название Permeability Transition Pore (PTP). В состав PTP входят как растворимые, так и интегральные белки митохондриальных мембран: потенциал-зависимый анионный канал (VDAC), транслоказа адениновых нуклеотидов (ANT), периферический безодиазепиновый рецептор (PBR), креатинкиназа, гексокиназа и/или циклофилин D. Точный состав комплекса на сегодняшний день остается неизвестным. Наиболее дискуссионным представляется вклад ANT и циклофилина D [64, 65]. В последнее время появились данные, что канал поры формируют *c*-субъединицы F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-АТФ-синтазы [66]. Интересно отметить, что практически все белки, входящие в состав PTP, существуют в нескольких изоформах, картина экспрессии которых может заметно различаться в нормальных и трансформированных клетках [65]. Известно, что поровый комплекс располагается в области контактов внешней и внутренней митохондриальных мембран. Переход такой поры в открытое состояние влечет за собой набухание матрикса митохондрий и разрыв мембран [59]. Возможно, что PTP также может участвовать в протекании постапоптотического некроза [67].

Интересно отметить, что Вах способен взаимодействовать с молекулами липидов, вызывая их реорганизацию и способствуя формированию липидных пор в мембране митохондрий. Также способностью к формированию пор обладает церамид; показано, что олигомеры Вах могут стабилизировать крупные каналы, образованные церамидом, диаметр которых достато-

чен для прохождения таких крупных молекул, как цитохром *c* [59].

Нарушение проницаемости митохондриальной мембраны и формирование поры (РТР) может быть вызвано, как оказалось, участием р53, который в данном случае запускает апоптоз, не связанный с транскрипционной активностью этого белка. Существуют данные о том, что в ответ на ультрафиолетовое облучение и другие стимулы цитозольный р53 перемещается к внешней мембране митохондрий и напрямую взаимодействует с членами семейства белков Vcl-2. При этом р53 способен связываться как с антиапоптотическим белком Vcl-X<sub>L</sub>, так и с проапоптотическими белками Вах и Ваk, стимулируя формирование пор во внешней мембране митохондрий и последующую активацию каскада каспаз [29].

**Стресс ЭПР как механизм апоптоза.** Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) содержит аппарат контроля качества белков, который обеспечивается работой белков-шаперонов. Шапероны и фолдазы узнают неправильно уложенные белки и способствуют принятию ими правильной конформации. При нарушении процесса сворачивания и укладки белков происходит их накопление в люмене, называемое стрессом ЭПР. В понятие стресса ЭПР включают также нарушение гликозилирования, восстановление дисульфидных связей, падение концентрации кальция в люмене, нарушение транспорта белков к аппарату Гольджи [68]. Это приводит к активации сигнальной сети, названной реакцией на несвернутые белки (unfolded protein response — UPR). Она служит для устранения или исправления неправильно уложенных белков и восстановления гомеостаза ЭПР. UPR способен вызывать как адаптивный ответ, так и реакцию, ведущую к запуску апоптотической гибели клетки. В ответ на стресс ЭПР в клетке могут активироваться следующие механизмы: 1) аттенуация трансляции, позволяющая предотвратить дальнейшее накопление белков; 2) активация транскрипции генов белков-шаперонов, таких как BiP/GRP78 и GRP94; 3) ассоциированная с ЭПР дегградация (ER-associated degradation, ERAD) белков, которые не могут принять нативную конформацию. Дегградация может происходить в 26S-протеасомах или путем аутофагии. В норме в клетках млекопитающих три трансмембранных белка — IRE-1 $\alpha$  (inositol-requiring enzyme-1 $\alpha$ ), PERK (pancreatic ER eIF2 $\alpha$  kinase) и ATF-6 $\alpha$  (activating transcription factor-6 $\alpha$ ) — могут связываться с GRP78 (78-kDa glucose-regulated protein, также известный как ER chaperone binding immunoglobulin protein, BiP). GRP78 представляет собой шаперон, который

способствует усилению укладки белков и предотвращает их агрегацию. PERK, ATF-6 $\alpha$  и IRE-1 выступают в качестве сенсоров состояния ЭПР, а связывание с GRP78 поддерживает их в неактивной форме. В случае умеренного или транзитного стресса ЭПР GRP78 диссоциирует от PERK, ATF-6 $\alpha$  и IRE-1, в результате чего происходит активация UPR с целью ослабить стресс ЭПР и поддержать функционирование данной органеллы [69, 70].

В том случае, когда адаптивный ответ клетки на стресс ЭПР оказывается недостаточным, происходит запуск ПКГ. Проапоптотические сигналы при этом могут генерироваться при участии нескольких механизмов: IRE1-опосредованной активации ASK1/JNK; PERK/eIF2-зависимой активации транскрипции проапоптотического транскрипционного фактора CHOP; выхода Ca<sup>2+</sup> из ЭПР в цитоплазму, происходящего при участии Вах/Вак; протеолитической активации прокаспазы-12. IRE1 является наиболее эволюционно консервативным сенсором стресса ЭПР. IRE1 $\alpha$  и IRE1 $\beta$  кодируются двумя различными генами. IRE1 $\alpha$  представляет собой трансмембранный белок I типа, цитозольные домены которого обладают эндорибонуклеазной и серин-треонинкиназной активностью. При диссоциации GRP78 от IRE1 $\alpha$  люминальный домен последнего подвергается гомоолигомеризации и трансавтофосфорилированию, что приводит к активации эндорибонуклеазного и киназного доменов. Активированный IRE1 $\alpha$  осуществляет сплайсинг интрона мРНК, кодирующей транскрипционный фактор ХВР1 (X-box-binding protein 1). В результате образуется функционально активная изоформа ХВР1, индуцирующая экспрессию генов, продукты которых обеспечивают правильную укладку белков в люмене ЭПР, биосинтез фосфолипидов и деградацию неправильно свернутых белков (ERAD). IRE1 $\alpha$  также взаимодействует с рядом сигнальных путей, способных запускать апоптотическую гибель клеток. Так, киназный домен IRE1 $\alpha$  может взаимодействовать в цитозоле с TRAF2 (TNF $\alpha$  receptor-associated factor 2). Фосфорилирование TRAF2 приводит к последующей активации NF- $\kappa$ B и киназ ASK и JNK (c-Jun N-terminal kinase), участвующих в запуске воспалительных реакций и апоптоза. Кроме того, IRE1 $\alpha$  может связываться с проапоптотическими белками Вах и Вак. Они претерпевают изменения конформации и/или олигомеризацию в мембране ЭПР, формируя пору, через которую из люмена в цитозоль поступают ионы Ca<sup>2+</sup>. Повышение концентрации Ca<sup>2+</sup> приводит к активации m-кальпаина, который, в свою очередь, активирует прокаспазу-12 [71]. Прокаспаз-12 представляет собой резидентный белок

ЭПР, ассоциированный с его мембраной со стороны цитозоля [12]. Активная каспаза-12 отделяется от мембраны, поступает в цитозоль и вызывает протеолиз и активацию прокаспазы-9, а каспаза-9 активирует эффекторную каспазу-3; причем этот путь осуществляется без участия Араф-1 и не требует выхода цитохрома c из митохондрий. Ca<sup>2+</sup>, поступивший в цитозоль из ЭПР, быстро захватывается митохондриями и накапливается в них, что может приводить к деполяризации внутренней митохондриальной мембраны и индукции апоптоза по митохондриальному пути [68]. Каспаза-12 также вызывает расщепление трансмембранного белка ЭПР ВАР31, участвующего в осуществлении транспорта от ЭПР к *цис*-Гольджи и образующего комплексы с прокаспазой-8, Вcl-2 и Вcl-X<sub>L</sub>. При этом образуется фрагмент p20, который вызывает выход Ca<sup>2+</sup> из ЭПР в цитозоль, накопление его в митохондриях и индукцию митохондриального пути апоптоза [72]. Также было показано, что при стрессе ЭПР ВАР31 связывается с CDIP1, являющимся одной из мишеней транскрипционного фактора p53. Формирование комплекса ВАР31—CDIP1 способствует взаимодействию ВАР31 с Вcl-2 как на мембране ЭПР, так и на митохондриальной мембране, активации и олигомеризации Вах и индукции апоптоза по митохондриальному пути [73]. Каспаза-12 может подвергаться протеолитическому расщеплению и активации также в результате взаимодействия с TRAF2 [74].

Мишенями эндорибонуклеазной активности IRE1 $\alpha$  также могут быть ассоциированные с ЭПР мРНК; данное явление получило название RIDD (regulated IRE1-dependent decay of mRNA). Показано, что RIDD играет важную роль при гибели клетки в условиях сильного и продолжительного стресса ЭПР, т.к. при этом деградации подвергаются мРНК, кодирующие белки, которые способствуют выживанию клетки [75, 76].

PERK также представляет собой трансмембранный белок-сенсор, его цитоплазматический домен обладает серин-треонинкиназной активностью. В условиях стресса ЭПР активация PERK происходит способом, сходным с таковым для IRE1 — путем диссоциации от GRP78, гомоолигомеризации и аутофосфорилирования. Активная PERK фосфорилирует Ser51  $\alpha$ -субъединицы фактора инициации трансляции eIF2 $\alpha$  (eukaryotic translation initiation factor 2). Фосфорилирование eIF2 $\alpha$  приводит к снижению общего уровня синтеза белка, но селективно усиливает трансляцию ряда мРНК, в т.ч. мРНК, кодирующей транскрипционный фактор ATF4, который играет важную роль в ответе клетки на стресс ЭПР. ATF4 индуцирует экспрессию других транс-

крипционных факторов, ассоциированных с UPR, шаперонов, белков-регуляторов аутофагии и ответа на окислительный стресс. Важными мишенями ATF4 являются гены проапоптотических белков CHOP (ССАТ/enhancer-binding protein homologous protein) и GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible 34). GADD34 представляет собой регуляторную субъединицу фосфатазы PP1C, которая противодействует активности PERK, дефосфорилируя eIF2 в условиях продолжительного стресса ЭПР. При этом GADD34 способен усилить продукцию АФК в клетке, которая, по-видимому, связана с перегруженностью полости ЭПР белками и протеотоксичностью [77]. CHOP активирует усиление транскрипции оксидазы ERO1 $\alpha$  (ER oxidase 1 $\alpha$ ), генерирующей АФК в ЭПР и, активируя рецептор инозитол-1,4,5-трифосфата в мембране ЭПР, индуцирует выход содержащегося в нем Ca<sup>2+</sup> в цитоплазму. Повышение концентрации Ca<sup>2+</sup> активирует Ca<sup>2+</sup>-кальмодулинзависимую протеинкиназу II и приводит к запуску апоптоза. Кроме того, CHOP ингибирует антиапоптотический белок Bcl-2 и активирует проапоптотические факторы Vim, TRB3 (telomere repeat binding factor 3) и рецептор DR5 (death receptor 5). CHOP также способствует накоплению в клетке DR5, который подвергается лиганднезависимой активации и при пролонгированном стрессе ЭПР запускает апоптоз с помощью активации каспазы-8. CHOP взаимодействует с ATF4, индуцируя экспрессию генов, отвечающих за аппарат синтеза белка, окислительный стресс и апоптоз [77].

При продолжительном стрессе ЭПР происходит повышение уровня экспрессии таких проапоптотических BНЗ-only белков, как Vim, Bid, Puma и Noxa [77]. Такое усиление экспрессии может приводить к индукции апоптоза по митохондриальному пути вследствие взаимодействия этих белков с членами семейства Bcl-2, в частности Bax и Bak. Другой BНЗ-белок, Bik, локализуется в ЭПР и при активации способен индуцировать выход в цитоплазму ионов Ca<sup>2+</sup>, вызывая олигомеризацию Bak/Bax, что, в конечном счете, также приводит к индукции митохондриального пути апоптоза. BНЗ-only белок Vim в норме входит в состав динеинового моторного комплекса, ассоциированного с микротрубочками, однако при стрессе транслоцируется в ЭПР, где может способствовать активации каспазы-12 [78, 79].

Следует отметить, что в отличие от мыши, у которой стресс ЭПР связан с активацией каспазы-12, у человека в гене каспазы-12 присутствует делеция, в результате чего данный белок не экспрессируется либо образуется в укороченной

форме и не обладает ферментативной активностью, и его функцию выполняет каспаза-4. Показано, что прокаспаза-4 колокализуется с трансмембранным белком ЭПР TMEM214, который, по-видимому, заякоривает ее на мембране и располагается со стороны цитозоля. TMEM214 способен запускать апоптоз, ассоциированный со стрессом ЭПР, без участия CHOP и JNK, при этом нокдаун TMEM214 приводит к неполному подавлению апоптоза, что говорит о существовании альтернативных сигнальных путей в данном процессе [80]. Каспаза-4 может активироваться при участии TMEM214, кальпаина, а также каспазы-3 [80, 81]. Активная каспаза-4, в свою очередь, может активировать как инициаторные, так и эффекторные каспазы: -9, -8 и -3 [13, 14]. Точные мишени каспазы-4 и механизмы регуляции ее активности требуют дальнейших исследований.

**Стресс аппарата Гольджи и лизосом как механизм апоптоза.** В мембранах аппарата Гольджи (АГ) содержится ряд белков, играющих важную роль в апоптозе: каспаза-2, ряд рецепторов клеточной гибели, характерных для плазмалеммы: TNF-R1, CD95, TRAIL-R1, PI(3)K, Beclin, GD3-синтаза ( $\alpha$ -2,8-сиалилтрансфераза). GD3-синтаза участвует в превращении церамида в GD3, способный индуцировать нарушение проницаемости митохондриальных мембран и запуск апоптоза по митохондриальному пути, а также транспорт CD95 от АГ к плазмалемме. Роль АГ в качестве сенсора при запуске апоптотической гибели изучена недостаточно. Так, показано, что ингибирование гликозилирования белков малой молекулой свайсоцином, подавляющим активность маннозидазы II, приводит к индукции апоптоза [16].

АГ претерпевает значительные изменения в ходе апоптотической гибели, вызванной различными стимулами. В ходе распада АГ нарушается окооядерная локализация цистерн, они распадаются на везикулы и мембранные трубочки. Ряд белков, характерных для АГ, служит субстратами для каспаз. Среди них можно назвать golgin-160, GRASP65 (Golgi reassembly and stacking protein 65), giantin, p115 и GM-130, t-SNARE (target membrane soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor), syntaxin-5 и два компонента динеин-динактинового моторного комплекса, в частности промежуточная цепь динеина и субъединица динактина p150<sup>Glued</sup> [82]. Golgin-160 является субстратом для каспазы-2, которая расщепляет его по характерным для нее сайтам, отличающимся от сайтов расщепления для других каспаз, причем протеолиз с участием каспазы-2 предшествует расщеплению данного белка каспазой-3 [15, 83]. Протео-

лиз белков АГ может играть важную роль в нарушении потока мембран и способствовать появлению на поверхности клетки сигналов к фагоцитозу. Расщепление структурных белков АГ необходимо для эффективного распада данной органеллы в ходе апоптоза: экспрессия не подающихся протеолизу мутантов GRASP65, p115 или golgin-160 приводит к задержке дезорганизации АГ. Клетки, экспрессирующие нерасщепляемую форму golgin-160, демонстрируют задержку апоптоза, индуцированного по секреторному пути, что позволяет предположить роль протеолиза golgin-160 в передаче сигнала при апоптотической гибели [15, 82].

Активное участие лизосом в процессе индукции гибели клеток предположили еще де Дюв и Уаттиаукс в 1966 г. [84]. В то время ПКГ не была охарактеризована, но некоторые признаки апоптоза уже были описаны морфологами. Роль лизосом в апоптозе долгое время оставалась невыясненной и активно исследуется в настоящее время. Причинами, затруднявшими изучение вклада данных органелл в процесс клеточной гибели, служат: 1) возможность нарушения проницаемости лизосомных мембран в отсутствие видимых ультраструктурных изменений, что создает впечатление о сохранении их целостности до поздних стадий гибели клетки; 2) ингибирование лизосомных катепсинов ингибиторами каспаз, используемыми для исследования апоптоза.

Ключевым событием клеточной гибели, индуцируемой лизосомами, служит нарушение проницаемости лизосомной мембраны. В последнее время обнаруживается все большее количество лекарственных препаратов, способных специфически дестабилизировать лизосомы и таким образом вызывать апоптоз. Примерами таких соединений служат MSDH (о-метилсериндодециламидгидрохлорид), сфингозин, сирамезин, 3-аминопропаналь и Leu-Leu-Ome. Предположение о возможности запуска апоптоза при умеренном уровне повреждения лизосом подтверждается тем фактом, что проапоптотические эффекты данных препаратов не проявляются, если клетки предварительно обработать лизосомотропными соединениями, повышающими рН, такими как аммиак или хлорохин. Повышение величины рН в лизосомном компартменте приводит к предотвращению накопления проапоптотических лизосомотропных агентов. В результате происходит сохранение целостности и стабильности лизосом и подавляется индукция апоптоза, что указывает на непосредственное участие повреждения лизосом в запуске апоптотической гибели, но не объясняет механизмы данного процесса [17].

Нарушение проницаемости лизосомных мембран нередко наблюдается при окислительном стрессе, источниками которого могут быть лекарственные препараты, тяжелые металлы, ионизирующее излучение, воспаление, нейродегенеративные заболевания. Образующийся при этом пероксид водорода диффундирует в лизосомы, где вступает в реакцию с ионами железа, что приводит к образованию гидроксильных радикалов, продуктов реакции Фентона. В свою очередь гидроксильные радикалы обладают высокой реакционной способностью и повреждают мембраны лизосом, вызывая перекисное окисление липидов и окисляя мембранные белки. АФК могут способствовать открыванию  $Ca^{2+}$ -каналов лизосом, а также влиять на активность ферментов, таких как фосфолипаза А<sub>2</sub>, которая вызывает деграцию фосфолипидов в составе мембранных органелл клетки. Кроме того, лизосомные ферменты способны воздействовать на митохондрии, вызывая в них усиление генерации АФК и создавая петлю положительной обратной связи, что, в свою очередь, приводит к усугублению повреждения лизосом [85, 86].

В то время как умеренное повреждение лизосомных мембран приводит к индукции апоптоза, значительная дестабилизация данных органелл вызывает некроз. Возможно, отсутствие апоптотического ответа в этом случае объясняется деграцией прокаспаз, вызванной атакой высвободившихся гидролитических ферментов. Кроме того, показано, что значительное повреждение лизосом приводит к выбросу железа в цитоплазму, что подавляет активацию прокаспазы-9 в составе апоптосомы [87]. По-видимому, инактивация обусловлена связыванием ионов железа с тиоловыми группами в активном центре прокаспазы.

Высвободившиеся в цитозоль катепсины, за исключением катепсина S, достаточно быстро инактивируются при цитозольных значениях рН вследствие необратимого изменения конформации или депротонирования остатков аспарагиновой кислоты в активных сайтах. Тем не менее даже за непродолжительное время существования они осуществляют расщепление субстратов [86]. Лизосомные ферменты способны нарушать проницаемость митохондриальных мембран путем протеолитической активации фосфолипаз или проапоптотических белков семейства Bcl-2 – Bid, Bax и Bak. Так, показано, что кальпаиноподобные цистеиновые протеазы, входящие в состав лизосом, вызывают расщепление Bid до tBid, а катепсин D модифицирует и активирует Bax, в результате чего последний формирует поры в мембране митохондрий. В

ряде типов клеток лизосомные катепсины могут напрямую активировать каспазы-2, -8 или -12 [12]. Кроме того, катепсины могут активировать каскады каспаз, расщепляя их ингибитор — XIAP. Субстратами катепсинов являются многие белки, что позволяет им выполнять функцию разрушения клеточных структур в процессе гибели наряду с эффекторными каспазами. Как и каспазы, катепсины расщепляют PARP, а также молекулы клеточной адгезии (MAGUKs — membrane-associated guanylate kinases), что способствует откреплению клеток от субстрата [17, 85].

Дестабилизация лизосом может также участвовать в запуске апоптоза по рецепторному пути. Так, при связывании Fas-лиганда с рецептором может происходить ранняя пермеабиллизация мембран лизосом, однако механизм этого процесса и участие в нем каспазы-8 до сих пор остаются невыясненными. Для ряда типов клеток показано, что при связывании рецепторов TRAIL с лигандами происходит активация белка Вах с участием каспазы-8. Вах нарушает проницаемость не только мембран митохондрий, но и лизосом, по-видимому, также формируя в них поры.

Таким образом, нарушение целостности мембран лизосом может участвовать как в рецепторном, так и в митохондриальном путях апоптоза. При этом реализация программы клеточной гибели осуществляется при совместном участии лизосомных гидролаз и каспаз [17, 85].

**Ядерный механизм апоптоза.** Инициация ядерного механизма апоптоза включает два основных пути. Первый путь — это активация транскрипционного фактора p53, который участвует в экспрессии проапоптотических белков, таких как Вах, Puma, Noxa. Эти белки в свою очередь включают митохондриальный механизм апоптоза и соответствующий ему каскад каспаз. Активацию p53 могут вызывать различные факторы, такие как ультрафиолетовая и ионизирующая радиация, оксидативный стресс, температурный шок, гипоксия, воздействие низких температур и т.д. [18, 19]. В пролиферирующих клетках активация p53 может происходить при нарушениях целостности ДНК или ошибках в работе репликативной машины. Первой реакцией клетки на такие повреждения является остановка прохождения соответствующей фазы клеточного цикла за счет экспрессии гена белка p21 под управлением p53. Такой ответ включен в работу пунктов контроля клеточного цикла [88] и запускает механизмы репарации нарушений в структуре ДНК или ее репликации. В том случае, если репарационный механизм оказывается неэффективным, клетка уходит в апоптоз [19]. В целом данный вариант

инициации апоптоза включает ядерные процессы и вовлечение митохондриального механизма активации каспаз. Митохондриальный механизм инициации апоптоза может являться не только продолжением событий, связанных с активацией p53, но и сам способен служить толчком для стимуляции ядерных процессов, ведущих к апоптозу без участия каскада каспаз. Как уже упоминалось, при изменении проницаемости митохондриальной мембраны из межмембранного пространства в цитозоль и далее в ядро поступают такие факторы, как эндонуклеаза G и AIF, вызывающие каспазозависимую фрагментацию ДНК.

Второй ядерный путь запуска апоптоза связан с активацией каспазы-2. Каспаза-2 представляет собой наиболее эволюционно консервативную среди всех каспаз. Несмотря на большое количество литературы, посвященной роли данного белка в апоптозе, описанные авторами факты достаточно противоречивы, в связи с чем роль каспазы-2 в процессе апоптоза до сих пор во многом остается неясной.

Несмотря на то, что по субстратной специфичности каспаза-2 сходна с эффекторными каспазами, по ряду признаков она является инициаторной. В частности, она обладает доменной организацией, сходной с таковой у инициаторных каспаз-8 и -9, при димеризации она активируется и подвергается аутопроцессингу, в результате которого становится полностью активной. Другой важной характеристикой служит наличие высокомолекулярной белковой платформы для активации каспазы.

Молекула каспазы-2 содержит крупный продомен, а также большую и малую каталитические субъединицы. В продоме содержится последовательность CARD, участвующая в белок-белковых взаимодействиях. CARD в составе каспазы-2 связывается с CARD в составе белка RAIDD; таким образом, RAIDD выступает в роли адапторного белка, рекрутирующего каспазу-2 в активаторный комплекс.

PIDD (p53-induced protein with a death domain) был описан как белок, индуцируемый p53 и участвующий в p53-зависимом апоптозе. Он также известен как LRDD (leucine-rich repeat and death domain-containing protein), содержит DD (death domain) на C-конце, два домена ZU5 и семь тандемных лейциновых повторов (LRRs) на N-конце. Сборка PIDDосомы происходит при связывании PIDD с RAIDD посредством имеющихся у них DD. Всего в коровой части данного комплекса содержится пять DD, принадлежащих PIDD, и семь DD, принадлежащих RAIDD. По-видимому, PIDDосома способна рекрутировать семь молекул каспазы-2. Рекру-

тирование каспазы-2 в состав PIDDосомы приводит к аутопроцессингу комплекса, расщеплению на фрагменты PIDD-C, PIDD-CC и PIDD-N и его активации. PIDD-CC, в свою очередь, опосредует активацию каспазы-2.

Показано, что при повреждении ДНК PIDD формирует отдельный комплекс, в котором отсутствуют RAIDD и каспаза-2, но содержатся RIPK1 и NEMO (NF $\kappa$ B essential modulator)/IKK $\gamma$ , представляющий собой регуляторную субъединицу белкового комплекса I $\kappa$ B, который, связываясь с NF $\kappa$ B, инактивирует его. Рекрутирование NEMO приводит к его сумоилированию, которое, в свою очередь, усиливает убиквитинирование и фосфорилирование. В результате модификаций NEMO из ядра поступает в цитоплазму, где вызывает высвобождение NF $\kappa$ B из комплекса с I $\kappa$ B и его активацию.

Рекрутирование RAIDD и RIPK1 в PIDDосому происходит последовательно. Сначала с PIDD взаимодействуют RIPK1 и NEMO, далее — RAIDD и каспаза-2. В клетках, дефицитных по RIPK1, при повреждении ДНК процессинг каспазы-2 усиливается. Напротив, нокаун RAIDD приводит к значительному сумоилированию NEMO в условиях генотоксического стресса и повышению активности NF $\kappa$ B. Таким образом, по-видимому, RAIDD и RIPK1 конкурируют за связывание с PIDD и таким образом блокируют функции PIDD, направленные на выживание или апоптоз соответственно. Показано, что участие PIDD в выживании или гибели клетки регулируется фосфорилированием, осуществляемым киназой ATM (ataxia telangiectasia mutated). Фосфорилирование вызывает изменение конформации PIDD, позволяющее ему связываться с RAIDD [89].

Интересно, что, согласно ряду данных существуют альтернативные высокомолекулярные платформы для активации каспазы-2, не содержащие PIDD и RAIDD. Такие комплексы формируются в эмбриональных фибробластах мышей, нокаутных по *pidd* и *raidd*, а также в клетках HeLa, дефицитных по PIDD и RAIDD, при действии бактериальных порообразующих токсинов.

Показано, что каспаза-2 способна расщеплять белок Bid и таким образом активировать его, что приводит к выходу цитохрома *c* из митохондрий в цитозоль и запуску апоптоза по митохондриальному пути. При этом способность к протеолизу Bid у каспазы-2 значительно слабее, чем у каспазы-8. По-видимому, при низких уровнях активности каспазы-2 в отсутствие активации других проапоптотических сигнальных путей она неспособна произвести достаточное для индукции апоптоза количество активного Bid.

Субстратом каспазы-2 является каспаза-3, активация которой и направлена на реализацию программы апоптоза. Интересно, что одним из субстратов для каспазы-3 служит ICAD (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease). Расщепление этого белка приводит к индукции ферментативной активности CAD (caspase-activated deoxyribonuclease), которая фрагментирует ДНК ядра на крупные фрагменты. Каспаза-2 напрямую может расщеплять ICAD, участвуя таким образом в активации CAD.

Субстратами каспазы-2 также могут являться golgin-160, CUX1 и ряд других белков, но большинство таких данных получено *in vitro* и не было подтверждено *in vivo*, и функциональная роль такого протеолиза не всегда ясна [89, 90].

Сопоставление разных механизмов индукции апоптоза и путей их реализации показывает, что все они тесно взаимосвязаны между собой, и нередко имеет место переключение с одного пути на другой (рис. 2). Так, сенсоры, реагирующие на различные проапоптотические сигналы, располагаются на плазматической мембране и во многих органеллах клетки, среди которых можно назвать ядро, митохондрии, лизосомы, аппарат Гольджи, ЭПР. При активации рецепторного пути апоптоза активная форма каспазы-8 вызывает расщепление и активацию белка Bid, участвующего в нарушении проницаемости митохондриальных мембран и запуске апоптоза по митохондриальному пути. Стресс ЭПР вызывает открывание кальциевых каналов, высвобождение Ca<sup>2+</sup> из люмена приводит к нарушению проницаемости митохондриальной мембраны. Кроме того, у грызунов выход Ca<sup>2+</sup> из ЭПР активирует каспазу-12, которая, в свою очередь, осуществляет протеолиз прокаспазы-9, ассоциированной с митохондриальным механизмом апоптоза. У человека мишенями каспазы-4, связанной со стрессом ЭПР, могут быть как каспаза-9, так и каспаза-8. Активирующийся при стрессе ЭПР белок CHOP способен, в свою очередь, активировать как белки, принимающие участие в запуске апоптоза по митохондриальному пути, так и рецепторы смерти. Повреждение лизосом может приводить к усилению продукции кислородных радикалов в митохондриях; образующиеся при этом АФК повреждают как митохондрии, так и сами лизосомы. Ферменты, содержащиеся в лизосомах, при выходе в цитозоль нарушают проницаемость митохондриальных мембран и способны активировать ассоциированные с митохондриями проапоптотические белки. Помимо этого лизосомные ферменты косвенно или напрямую активируют каспазы, в т.ч. каспазу-8, связанную с рецепторным механизмом апоптоза. С другой стороны, есть



12. Nakagawa, T., and Yuan, J. (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis, *J. Cell Biol.*, **150**, 887–894.
13. Rosati, E., Sabatini, R., Rampino, G., De Falco, F., Di Ianni, M., Falzetti, F., Fettucciari, K., Bartoli, A., Screpanti, I., and Marconi, P. (2010) Novel targets for endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in B-CLL, *Blood*, **116**, 2713–2723.
14. Yamamuro, A., Kishino, T., Ohshima, Y., Yoshioka, Y., Kimura, T., Kasai, A., and Maeda, S. (2011) Caspase-4 directly activates caspase-9 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in SH-SY5Y cells, *J. Pharmacol. Sci.*, **115**, 239–243.
15. Mancini, M., Machamer, C.E., Roy, S., Nicholson, D.W., Thornberry, N.A., Casciola-Rosen, L.A., and Rosen, A. (2000) Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis, *J. Cell Biol.*, **149**, 603–612.
16. Ferri, K.F., and Kroemer, G. (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways, *Nat. Cell Biol.*, **3**, 255–263.
17. Kurz, T., Terman, A., Gustafsson, B., and Brunk, U.T. (2008) Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis, *Histochem. Cell Biol.*, **129**, 389–406.
18. Loughery, J., and Meek, D. (2013) Switching on p53: an essential role for protein phosphorylation? *BioDiscovery*, **8**, 1.
19. Valente, L., and Strasser, A. (2013) Distinct target genes and effector processes appear to be critical for p53-activated responses to acute DNA damage versus p53-mediated tumour suppression, *BioDiscovery*, **8**, 3.
20. Sakamaki, K., and Satou, Y. (2009) Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates, *J. Fish Biol.*, **74**, 727–753.
21. McLuskey, K., and Mottram, J.C. (2015) Comparative structural analysis of the caspase family with other clan CD cysteine peptidases, *Biochem. J.*, **466**, 219–232.
22. Boehm, D., Mazurier, C., Giarratana, M.C., Darghouth, D., Faussat, A.M., Harmand, L., and Douay, L. (2013) Caspase-3 is involved in the signalling in erythroid differentiation by targeting late progenitors, *PLoS One*, **8**, e62303.
23. Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., and Kumar, S. (2015) Old, new and emerging functions of caspases, *Cell Death Differ.*, **22**, 526–539.
24. Creagh, E.M. (2014) Caspase crosstalk: integration of apoptotic and innate immune signalling pathways, *Trends Immunol.*, **35**, 631–640.
25. Galluzzi, L., Joza, N., Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Hengartner, M., Abrams, J.M., Tavernarakis, N., Penninger, J., Madeo, F., and Kroemer, G. (2008) No death without life: vital functions of apoptotic effectors, *Cell Death Differ.*, **15**, 1113–1123.
26. Poon, I.K., Lucas, C.D., Rossi, A.G., and Ravichandran, K.S. (2014) Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential, *Nat. Rev. Immunol.*, **14**, 166–180.
27. Ware, C.F. (2003) The TNF superfamily, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **14**, 181–184.
28. Bhardway, A., and Aggarwal, B.B. (2003) Receptor-mediated choreography of life and death, *J. Clin. Immunol.*, **23**, 317–332.
29. Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., and Ashkenazi, A. (2001) Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8, *J. Biol. Chem.*, **276**, 46639–46646.
30. Ashkenazi, A. (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily, *Nat. Cancer Rev.*, **2**, 420–430.
31. Ott, M., Norberg, E., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2009) Mitochondrial targeting of tBid/Bax: a role for the TOM complex? *Cell Death Differ.*, **16**, 1075–1082.
32. Micheau, O., and Tschopp, J. (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes, *Cell*, **114**, 181–190.
33. Silke, J. (2011) The regulation of TNF signalling: what a tangled web we weave, *Curr. Opin. Immunol.*, **23**, 620–626.
34. Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Kramer, P.H., and Peter, M.E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor, *EMBO J.*, **14**, 5579–5588.
35. 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., Kramer, P.H., Peter, M.E., and Dixit, V.M. (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex, *Cell*, **85**, 817–827.
36. Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Kramer, P.H., and Peter, M.E. (1997) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC), *EMBO J.*, **16**, 2794–2804.
37. Chen, Z.J. (2012) Ubiquitination in signaling to and activation of IKK, *Immunol. Rev.*, **246**, 95–106.
38. Shim, J.H., Xiao, C., Paschal, A.E., Bailey, S.T., Rao, P., Hayden, M.S., Lee, K.Y., Bussey, C., Steckel, M., Tanaka, N., Yamada, G., Akira, S., Matsumoto, K., and Ghosh, S. (2005) TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways *in vivo*, *Genes Dev.*, **19**, 2668–2681.
39. Haas, T.L., Emmerich, C.H., Gerlach, B., Schmukle, A.C., Cordier, S.M., Rieser, E., Feltham, R., Vince, J., Warnken, U., Weniger, T., Koschny, R., Komander, D., Silke, J., and Walczak, H. (2009) Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction, *Mol. Cell*, **36**, 831–844.
40. Scheidereit, C. (2006) IκB kinase complexes: gateways to NF-κB activation and transcription, *Oncogene*, **25**, 6685–6705.
41. Bertrand, M.J.M., Milutinovic, S., Dickson, K.M., Ho, W.C., Boudreau, A., Durkin, J., Gillard, J.W., Jaquith, J.B., Morris, S.J., and Barker, P.A. (2008) cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination, *Mol. Cell*, **30**, 689–700.
42. Silke, J., and Brink, R. (2010) Regulation of TNFRSF and innate immune signalling complexes by TRAFs and cIAPs, *Cell Death Differ.*, **17**, 35–45.
43. Wang, L., Du, F., and Wang, X. (2008) TNF-α induces two distinct caspase-8 activation pathways, *Cell*, **133**, 693–703.
44. Dempsey, P.W., Doyle, S.E., He, J.Q., and Cheng, G. (2003) The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **14**, 193–209.
45. Testa, U. (2004) Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis, *Leukemia*, **18**, 1176–1199.
46. Lalaoui, N., Lindqvist, L.M., Sandow, J.J., and Ekert, P.G. (2015) The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **39**, 63–69.
47. Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhout, S., Walczak, H., and Vandennebe, P. (2014) Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 135–147.
48. de Almagro, M.C., and Vucic, D. (2015) Necroptosis: pathway diversity and characteristics, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **39**, 56–62.
49. Szewczyk, A., and Wojtcak, L. (2002) Mitochondria as a pharmacological target, *Pharm Rev.*, **54**, 101–127.

50. Jiang, A.J., Jiang, G., Li, L.T., and Zheng, J.N. (2014) Curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway and caspases activation in human melanoma cells, *Mol. Biol. Rep.*, **42**, 267–275.
51. Jiang, G.B., Zheng, X., Yao, J.H., Han, B.J., Li, W., Wang, J., Huang, H.L., and Liu, Y.J. (2014) Ruthenium(II) polypyridyl complexes induce BEL-7402 cell apoptosis by ROS-mediated mitochondrial pathway, *J. Inorg. Biochem.*, **141**, 170–179.
52. Huang, L., Zhang, T., Li, S., Duan, J., Ye, F., Li, H., She, Z., Gao, G., and Yang, X. (2014) Anthraquinone G503 induces apoptosis in gastric cancer cells through the mitochondrial pathway, *PLoS One*, **9**, e108286.
53. Gogvadze, V., and Zhivotovsky, B. (2014) Mitochondria – a bullseye in cancer therapy, *Mitochondrion*, **19 Pt A**, 1–2.
54. Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. (1999) An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9, *J. Biol. Chem.*, **274**, 11549–11556.
55. Scorrano, L. (2009) Opening the doors to cytochrome c: changes in mitochondrial shape and apoptosis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **41**, 1875–1883.
56. Ferreira, P., Villanueva, R., Cabon, L., Susin, S.A., and Medina, M. (2013) The oxido-reductase activity of the apoptosis inducing factor: a promising pharmacological tool? *Curr. Pharm. Des.*, **19**, 2628–2636.
57. Polster, B.M. (2013) AIF, reactive oxygen species, and neurodegeneration: a “complex” problem, *Neurochem. Int.*, **62**, 695–702.
58. Yadav, N., and Chandra, D. (2014) Mitochondrial and postmitochondrial survival signaling in cancer, *Mitochondrion*, **16**, 18–25.
59. Renault, T.T., and Manon, S. (2011) Bax: addressed to kill, *Biochimie*, **93**, 1379–1391.
60. Lithgow, T., van Driel, R., Bertram, J.F., and Strasser, A. (1994) The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane, *Cell Growth Differ.*, **5**, 411–417.
61. Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P.E., and Kluck, R.M. (2011) Molecular biology of Bax and Bak activation and action, *Biochim. Biophys. Acta*, **1813**, 521–531.
62. Morciano, G., Giorgi, C., Bonora, M., Punzetti, S., Pavesini, R., Wieckowski, M.R., Campo, G., and Pinton, P. (2015) Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **78**, 142–153.
63. Elkholi, R., Renault, T.T., Serasinghe, M.N., and Chipuk, J.E. (2014) Putting the pieces together: how is the mitochondrial pathway of apoptosis regulated in cancer and chemotherapy? *Cancer Metab.*, **2**, 16.
64. Kokoszka, J.E., Waymire, K.G., Levy, S.E., Sligh, J.E., Cai, J., Jones, D.P., MacGregor, G.R., and Wallace, D.C. (2004) The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore, *Nature*, **427**, 461–465.
65. Brenner, C., and Grimm, S. (2006) The permeability transition pore complex in cancer cell death, *Oncogene*, **25**, 4744–4756.
66. Chinopoulos, C., and Szabadkai, G. (2014) What makes you can also break you, part III: mitochondrial permeability transition pore formation by an uncoupling channel within the C-subunit ring of the F1FO ATP synthase? *Front. Oncol.*, **4**, 235.
67. Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., and Tsujimoto, Y. (2005) Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death, *Nature*, **434**, 652–658.
68. Kadowaki, H., Nishitoh, H., and Ichijo, H. (2004) Survival and apoptosis signals in ER stress: the role of protein kinases, *J. Chem. Neuroanat.*, **28**, 93–100.
69. Wang, T., Yang, D., Li, X., Zhang, H., Zhao, P., Fu, J., Yao, B., and Zhou, Z. (2015) ER stress and ER stress-mediated apoptosis are involved in manganese-induced neurotoxicity in the rat striatum *in vivo*, *Neurotoxicology*, **48**, 109–119.
70. Delaunay-Moisan, A., and Appenzeller-Herzog, C. (2015) The antioxidant machinery of the endoplasmic reticulum: protection and signaling, *Free Radic. Biol. Med.*, **83**, 341–351.
71. Zong, W.X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q.C., Yuan, J., and Thompson, C.B. (2003) Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis, *J. Cell Biol.*, **162**, 59–69.
72. Rao, R.V., Ellerby, H.M., and Bredesen, D.E. (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program, *Cell Death Differ.*, **11**, 372–380.
73. Namba, T., Tian, F., Chu, K., Hwang, S.Y., Yoon, K.W., Byun, S., Hiraki, M., Mandinova, A., and Lee, S.W. (2013) CDIP1–BAP31 complex transduces apoptotic signals from endoplasmic reticulum to mitochondria under endoplasmic reticulum stress, *Cell Rep.*, **5**, 331–339.
74. Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., and Tohyama, M. (2001) Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress, *J. Biol. Chem.*, **276**, 13935–13940.
75. Momoi, T. (2004) Caspases involved in ER stress-mediated cell death, *J. Chem. Neuroanat.*, **28**, 101–105.
76. Hetz, C. (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 89–102.
77. Dufey, E., Sepulveda, D., Rojas-Rivera, D., and Hetz, C. (2014) Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 1. An overview, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **307**, 582–594.
78. Morishima, N., Nakanishi, K., Tsuchiya, K., Shibata, T., and Seiya, E. (2004) Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.*, **279**, 50375–50381.
79. Hetz, C.A. (2007) ER stress signaling and the BCL-2 family of proteins: from adaptation to irreversible cellular damage, *Antioxid. Redox Signal.*, **9**, 2345–2355.
80. Li, C., Wei, J., Li, Y., He, X., Zhou, Q., Yan, J., Zhang, J., Liu, Y., Liu, Y., and Shu, H.B. (2013) Transmembrane protein 214 (TMEM214) mediates endoplasmic reticulum stress-induced caspase 4 enzyme activation and apoptosis, *J. Biol. Chem.*, **288**, 17908–17917.
81. Matsuzaki, S., Hiratsuka, T., Kuwahara, R., Katayama, T., and Tohyama, M. (2010) Caspase-4 is partially cleaved by calpain via the impairment of Ca<sup>2+</sup> homeostasis under the ER stress, *Neurochem. Int.*, **56**, 352–356.
82. Maag, R.S., Hicks, S.W., and Machamer, C.E. (2003) Death from within: apoptosis and the secretory pathway, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**, 456–461.
83. Chandran, S., and Machamer, C.E. (2012) Inactivation of ceramide transfer protein during pro-apoptotic stress by Golgi disassembly and caspase cleavage, *Biochem. J.*, **442**, 391–401.
84. De Duve, C., and Wattiaux, R. (1966) Functions of lysosomes, *Annu. Rev. Physiol.*, **28**, 435–492.
85. Aits, S., and Jaattela, M. (2013) Lysosomal cell death at a glance, *J. Cell Sci.*, **126** (Pt 9), 1905–1912.
86. Cesen, M.H., Pegan, K., Spes, A., and Turk, B. (2012) Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications, *Exp. Cell Res.*, **318**, 1245–1251.

87. Galaris, D., Skiada, V., and Barbouti, A. (2008) Redox signaling and cancer: the role of «labile» iron, *Cancer Lett.*, **266**, 21–29.
88. Agarwal, M.L., Taylor, W.R., Chernov, M.V., Chernova, O.B., and Stark, G.R. (1998) The p53 network, *J. Biol. Chem.*, **273**, 1–4.
89. Zamaraev, A.V., Kopeina, G.S., Zhivotovsky, B., and Lavrik, I.N. (2015) Cell death controlling complexes and their potential therapeutic role, *Cell Mol. Life Sci.*, **72**, 505–517.
90. Imre, G., Heering, J., Takeda, A.N., Husmann, M., Thiede, B., zu Heringdorf, D.M., Green, D.R., van der Goot, F.G., Sinha, B., Dotsch, V., and Rajalingam, K. (2012) Caspase-2 is an initiator caspase responsible for pore-forming toxin-mediated apoptosis, *EMBO J.*, **31**, 2615–2628.

## MECHANISMS OF APOPTOSIS

**M. A. Savitskaya\*, G. E. Onishchenko**

*M. V. Lomonosov Moscow State University,  
Biological Faculty, Moscow 119991, Russia;  
fax: +7(495)939-4309, E-mail: nakomis@mail.ru*

Received July 6, 2015

Revision received July 17, 2015

Nearly 15 types of programmed cell death (PCD) have been identified to date. Among them, apoptosis is the most common and well-studied type of PCD. In this review, we discuss different apoptotic pathways in which plasma membrane and membrane organelles, such as mitochondria, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, lysosomes, and nucleus play the pivotal role. Data concerning caspase cascades involved in these mechanisms are described. Various apoptosis induction mechanisms are analyzed and compared. The close relations between them and the possibility of switching from one pathway to another are demonstrated. In most cases, the final result of these pathways is mitochondrial membrane permeabilization and/or caspase activation. These two events are closely linked and serve as the central point of integration of the apoptotic cell death pathways.

*Key words:* apoptosis, necrosis, caspase cascade, membrane organelles