

УДК 576.32;577.151

КАСПАЗА-2: ЧТО МЫ О НЕЙ ЗНАЕМ СЕГОДНЯ?

© 2013 г. В. И. Аксенова¹, О. В. Былино¹, Б. Д. Животовский^{1,2*}, И. Н. Лаврик^{1,3}¹Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119192²Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden 17177³Otto-von-Guericke University, Magdeburg, Germany 39120

Поступила в редакцию 28.08.2012 г.

Принята к печати 17.09.2012 г.

Апоптоз (программируемая клеточная смерть) — неотъемлемое свойство многоклеточных организмов. Апоптоз играет центральную роль в процессах дифференцировки клеток, удаления поврежденных клеток и гомеостаза иммунной системы. Обзор посвящен различным механизмам передачи сигнала через каспазу-2 — одну из наиболее загадочных протеаз, вовлеченных в апоптоз. Каспаза-2 активируется при воздействии целого ряда факторов: генотоксического стресса, активации рецепторов смерти, стресса эндоплазматического ретикулума, метаболических изменений, и при других воздействиях. Кроме того, каспаза-2 может играть роль опухолевого супрессора, участвовать в регуляции ответа на окислительный стресс и в развитии нейродегенерации при ишемическом повреждении мозга. Многообразие сигнальных путей, в которые вовлечена каспаза-2, несомненно, определяет ее особую роль в апоптозе и отличает от других апоптотических протеаз. В обзоре детально разобраны разнообразные функции каспазы-2, а также возможность применения накопленных знаний об этой уникальной протеазе в современной онкологии и медицине.

Ключевые слова: апоптоз, каспаза-2, активность каспаз, PIDDosome, опухолевый супрессор.

CASPASE-2: WHAT DO WE KNOW TODAY? by V. I. Aksenova¹, O. V. Bylino¹, B. D. Zhivotovsky^{1,2,*}, I. N. Lavrik^{1,3} (¹Department of Fundamental Medicine, Moscow State University, Moscow, Russia 119192, ²Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden 17177, *e-mail: Boris.Zhivotovsky@ki.se; ³Otto-von-Guericke University, Magdeburg, Germany 39120). Apoptosis (programmed cell death) is essential machinery for multicellular organisms. Apoptosis plays an important role in cell differentiation, damaged cell elimination and immune system homeostasis. This review is focused on various mechanisms of signal transduction through caspase-2 which believed to be one of the most enigmatical protease involved in apoptosis. Caspase-2 is activated upon stimulation by such agents as genotoxic stress, death receptors ligation, ER stress, metabolic changes, etc. In addition, caspase-2 may act as a tumor suppressor and has been implicated in cell response to oxidative stress and neurodegenerative progression during ischemic brain damage. Thus, variety of signal pathways triggered by caspase-2 place this protease apart from other members of the family and suggests a prominent role in apoptosis. Here, we analyse different functions of this unique caspase and discuss possible applications of accumulated knowledge in advanced oncology and medicine.

Keywords: apoptosis, caspase-2, caspase activity, PIDDosome, tumor suppressor

DOI: 10.7868/S0026898413010023

Принятые сокращения: МЭФ — мышинные эмбриональные фибробласты; ПВММ — пермеабилзация внешней мембраны митохондрий; ПКС — программированная клеточная смерть; ЭР — эндоплазматический ретикулум; ATM (ataxia telangiectasia mutated) — протеинкиназа, ген которой мутирован при комплексном заболевании с симптомами атаксии и телеангиоэктазии; ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 related) — серин/треонин-специфическая киназа, родственная ATM и Rad3; CARD (caspase-recruitment domain) — домен рекрутирования каспазы, обеспечивающий гомотипическое связывание каспаз между собой и с другими белками; *casp2* (caspase 2 gene) — ген каспазы-2; Cdk1 (cyclin-dependent kinase 1) — циклин-зависимая киназа-1; Chk1 (checkpoint kinase 1) — контрольно-пропускной пункт киназы-1; DD (death domain) — домен смерти; DISC (death-inducing signaling complex) — сигнальный комплекс, индуцирующий клеточную смерть; DR (death receptor) — рецептор смерти; FADD (Fas-associated death domain) — Fas-ассоциированный домен смерти; NHEJ (non-homologous end joining) — нехомологичное соединение концов цепей ДНК; NSL (nuclear localization signal) — сигнал ядерной локализации; PIDD (p53-inducible death domain-containing protein) — p53-активируемый белок, содержащий домен смерти — LRDD (leucine-rich repeat and death domain containing protein); PKCδ (protein kinase Cδ) — протеинкиназа Cδ; PKCK2 (protein kinase CK2) — протеинкиназа CK2; RAIDD (RIP-associated ICH-1 homologous protein with a death domain) — RIP-ассоциированный гомолог ICH-1, содержащий домен смерти; RIP-1 (receptor-interacting protein-1) — белок, взаимодействующий с рецептором 1; ROS (reactive oxygen species) — активные формы кислорода; TNF (tumor-necrosis factor) — фактор некроза опухолей; TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) — лиганд семейства TNF, инициирующий апоптоз; ROS — активные формы кислорода.

* Эл. почта: Boris.Zhivotovsky@ki.se

ВВЕДЕНИЕ

Апоптоз — высоко консервативный и генетически запрограммированный процесс гибели клеток — играет важную роль в поддержании нормального эмбриогенеза и дальнейшего гомеостаза тканей взрослого организма [1]. Основными ферментами, которые участвуют в инициации и дальнейшем течении апоптоза, считаются каспазы [2]. Каспазы (caspases, от англ. *cysteiny* *aspartate specific proteases*) — семейство цистеиновых аспарат-специфичных протеаз, которые экспрессируются в клетке как неактивные предшественники, содержащие три основных участка: N-концевой домен (продомен) варьирующей длины, большую субъединицу (p20) и малую субъединицу (p10). Каспазы активируются в результате протеолитического расщепления сайтов, находящихся между продоменом и малой и большой субъединицами. Образующаяся активная каспаза представляет собой гетеротетрамер, состоящий из двух больших (~20 кДа) и двух малых субъединиц (~10 кДа), p10₂-p20₂. Субстраты каспаз — это, как правило, белки, вовлеченные в апоптоз и воспалительные процессы. Каспазы делятся на инициаторные, содержащие длинный продомен и способные к аутопротеолитической активации, и эффекторные, содержащие короткий продомен и активирующиеся под действием инициаторных каспаз.

Каспаза-2 была открыта первой в семействе каспаз и оказалась самой консервативной в нем и эволюционно наиболее близкой белку CED-3, который обеспечивает процесс запрограммированной клеточной смерти (ПКС) у *Caenorhabditis elegans* [3, 4]. Уникальность каспазы-2 по сравнению с другими членами семейства состоит в том, что ей присущи черты как инициаторных, так и эффекторных каспаз. С одной стороны, по особенностям первичной структуры каспаза-2 относится к инициаторным каспазам [5]. В то же время ее субстратная специфичность ближе к эффекторным каспазам-3 и -7 [6]. Изучение функции каспазы-2 осложнено тем, что мыши с нокаутом по гену *casp2* не обладают летальным или патологическим фенотипом в отличие от многих других каспаз [7, 8], а это значит, что функция каспазы-2 может компенсироваться другими белками. Несмотря на значительные успехи в изучении этого белка, точный механизм активации каспазы-2 неизвестен. Возможно, его активация происходит внутри макромолекулярных комплексов, которые собираются в клетках под действием специфических факторов индукции апоптоза.

Каспаза-2 активируется при воздействии целого ряда факторов: генотоксического стресса, активации рецепторов смерти, стресса эндоплазматического ретикулума (ЭР), метаболических изменений и ряда других воздействий. По количеству разнообразных сигнальных путей, в кото-

рых каспаза-2 играет важнейшую роль, этот белок значительно превосходит других представителей семейства. Более того, каспаза-2 может принимать участие в физиологических и патологических процессах, не связанных с апоптозом. Так, показано участие каспазы-2 в супрессии опухолевого роста [9–11]. Данный обзор посвящен описанию как разнообразных молекулярных механизмов активации каспазы-2 в составе различных комплексов, так и ее роли в жизни и смерти клетки, а также в канцерогенезе.

СТРУКТУРА И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ

В структуре прокаспазы-2, как у всех представителей семейства, выделяют три основных участка: продомен, большую, p19, и малую, p12, каталитические субъединицы, разделенные небольшими спейсерными участками (рис. 1). Продомен каспазы-2 содержит домен CARD (caspase-recruitment domain), характерный для инициаторных каспаз (рис. 1) и играющий важнейшую роль при активации фермента, поскольку именно за счет гомотипических взаимодействий между доменами CARD формируются инициаторные комплексы, в которых и происходит активация инициаторных каспаз. Прокаспаза-2 активируется в результате аутопротеолиза, который сопровождается расщеплением профермента на продомен и субъединицы p19 и p12, последние тут же формируют активный гетеротетрамер p19₂-p12₂, т.е. зрелую каспазу [12] (рис. 1). Для структурной организации каспазы-2 характерна высокая степень гомологии с двумя другими инициаторными каспазами — каспазой-1 и каспазой-9.

В отличие от большинства инициаторных каспаз, которые, в основном, расщепляют белки, содержащие тетрапептид XXXD, сайт расщепления каспазы-2 представляет собой пентапептид VDVAQ (в низкомолекулярных субстратах) и XDVXD (в белках). Таким образом, каспаза-2 проявляет уникальные черты среди каспаз, обладая свойствами как инициаторных (наличие CARD и способность к аутопротеолизу), так и эффекторных (субстратная специфичность) каспаз [5].

В процессе альтернативного сплайсинга образуются два вида мРНК, кодирующие две изоформы белка: каспаза-2L (435 аминокислотных остатков) и каспаза-2S (312 аминокислотных остатков). Повышенная экспрессия каспазы-2L может вызывать индукцию ПКС, в то время как повышенная экспрессия каспазы-2S может подавлять этот процесс [13]. Экспрессия каспазы-2S сильно варьирует в разных типах клеток и тканей, а также на разных этапах эмбрионального развития. Наиболее высокий уровень экспрессии каспазы-2S в эмбриональной ткани мозга, а каспаза-2L преобладает в тимусе взрослого организма [13]. Некоторые

ДНК-повреждающие агенты могут вызывать повышенную экспрессию короткой формы каспазы-2, сдвигая, таким образом, равновесие между про- и анти-апоптотическими формами фермента [14]. Скорее всего, различные изоформы каспазы-2 могут принимать участие как в негативной, так и позитивной регуляции гибели клеток [5].

Данные о локализации каспазы-2 в клетке и, тем более, о влиянии ее местонахождения на индукцию ПКС противоречивы. Каспазу-2 обнаружили в аппарате Гольджи, митохондриях, ядре и цитоплазме [15], хотя исследования, проведенные с использованием антител к различным структурным участкам каспазы-2, не подтвердили присутствия этого белка в митохондриях [16]. Причиной несогласующихся между собой данных может быть использование для детекции каспазы-2 как различных клеточных линий, так и различных антител. Важно отметить, что прокаспаза-2 – единственная прокаспаза, конститутивно присутствующая в ядре. Импорт прокаспазы-2 в ядро регулируют две последовательности NSL (nuclear localization signals), расположенные в CARD с 22 по 44 аминокислотный остаток, – это последовательности RRSR и KKNR, разделенные 15 аминокислотными остатками [17]. Также показано, что ядерная локализация каспазы-2 зависит и от присутствия полноразмерного CARD, а повышенная экспрессия каспазы-2, меченной GFP, приводит к накоплению белка в ядре, что в свою очередь вызывает апоптоз [18, 19]. Таким образом, пока не представляется возможным в деталях понять, какую роль играет место локализации каспазы-2 в клетке в процессе гибели клетки. Ответ на этот вопрос предстоит найти.

ПЛАТФОРМЫ АКТИВАЦИИ КАСПАЗЫ-2

Несмотря на способность каспазы-2 к самоактивации *in vitro* путем димеризации или олигомеризации через домен CARD без каких-либо дополнительных адапторных белков [12], к настоящему времени описаны несколько молекулярных платформ ее активации, [20–23]. На основании этих данных каспазу-2 можно отнести к семейству инициаторных, и эффекторных каспаз, так как в зависимости от комплекса активации, тканевой специфичности и действующего стимула каспаза-2 может проявлять разнообразные свойства. Ниже мы детально рассмотрим основные молекулярные механизмы активации этой каспазы.

PIDDосома и PIDD-зависимые сигнальные пути

CARD-домен прокаспазы-2 участвует в формировании комплекса PIDDосомы, который состоит из продукта автопротеолиза белка PIDD (p53-inducible death domain-containing protein), PIDD-CC, белка RAIDD (RIP-associated ICH-1

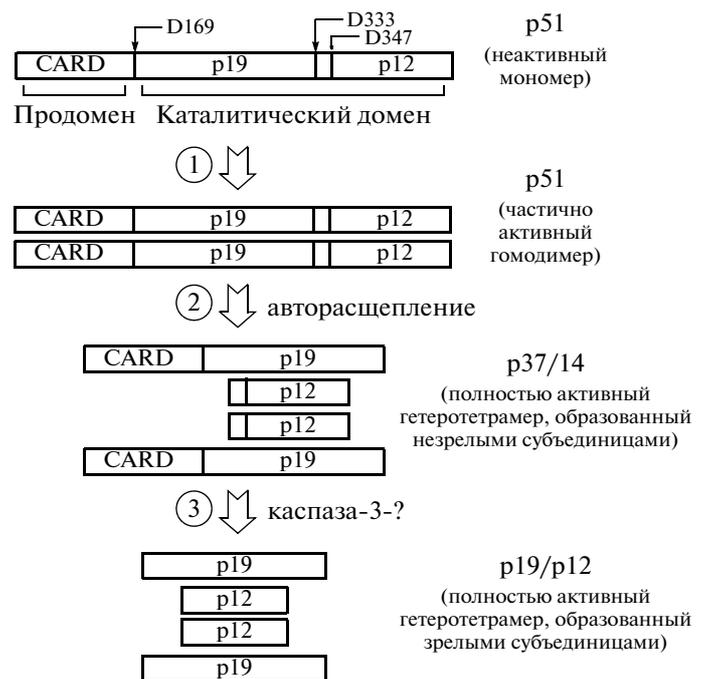


Рис. 1. Три этапа процессинга каспазы-2 при апоптозе. На первом этапе при действии апоптотического сигнала происходит образование гомодимеров прокаспазы-2. Второй этап связан с авторасщеплением каждой полипептидной цепи в составе p51-гомомера по сайту D333 с образованием предшественников малой и большой каталитических субъединиц с молекулярной массой соответственно 14 и 37 кДа. На третьем этапе, в результате расщепления по сайтам D169 и D347, формируются большая (p19) и малая (p10) каталитические субъединицы.

homologous protein with a death domain) и прокаспазы-2 [20]. Это так называемая каспаза-2-PIDDосома. Вскоре был открыт второй тип мультимерного комплекса, в состав которого входят продукт ограниченного автопротеолиза белка PIDD, PIDD-C, Ser-Thr киназа RIP-1 (receptor-interacting protein-1) и ИКК-γ (NEMO) – регуляторная субъединица ИκB киназы, которая участвует в активации NF-κB при воздействии на клетку ДНК-повреждающих агентов (рис. 2) [24]. Взаимодействие между RAIDD и PIDD в составе каспазы-2-PIDDосомы происходит благодаря гомотипическому связыванию их DD доменов, а связывание RAIDD с каспазой-2 осуществляется через домены CARD (рис. 2). В кристаллической структуре PIDD и RAIDD в составе комплекса каспазы-2-PIDDосома выявлено пять С-концевых PIDD-фрагментов (PIDD-CC), семь RAIDD и семь молекул каспазы-2 – все вместе они формируют высокомолекулярный комплекс порядка 700 кДа [25] (рис. 2).

Как же происходит формирование PIDD-содержащих комплексов? PIDD содержит 910 аминокислотных остатков, среди которых семь лей-

Судьба клетки также зависит от экспрессии различных изоформ PIDD [28]. К настоящему моменту описано четыре изоформы этого белка. Три изоформы способны активировать NF-κB в ответ на действие доксорубина, но только изоформа 1 связывается с RAIDD и активирует каспазу-2. Изоформа 2 (leucine reach repeat and death domain containing protein, LRDD) – антагонист проапоптотической изоформы 1, а изоформа 3, напротив, усиливает проапоптотическую активность изоформы 1. Таким образом, различные формы PIDD, образующиеся в процессе альтернативного сплайсинга мРНК, приводят к формированию белков с антагонистическими/агонистическими функциями, работа которых определяет судьбу клетки после воздействия ДНК-повреждающих агентов [28].

Конформация белка RAIDD может непосредственно влиять на формирование комплекса каспаза-2-PIDDосома. В цитозоле клетки RAIDD присутствует как в открытой, так и в закрытой конформациях, которые находятся в равновесии [26] (рис. 2). Под действием генотоксического стресса происходит сдвиг равновесия в сторону открытого конформационного состояния белка RAIDD, что способствует образованию комплекса PIDDосома [26] (рис. 2).

В последнее время в литературе также появились сообщения о том, что PIDD может вызывать индукцию апоптоза независимо от каспазы-2. Так, исследования, выполненные на клетках линии мышинных эмбриональных фибробластов (МЭФ) с нокаутом гена каспазы-2, показали, что эти МЭФ более устойчивы к повышенной экспрессии PIDD по сравнению с клетками, нокаутными по гену RAIDD [29]. Таким образом, апоптоз, индуцированный повышенной экспрессией PIDD, зависит от присутствия RAIDD, но не каспазы-2. Это наблюдение допускает возможность индукции апоптоза независимо от каспазы-2 и предполагает, что данная линия клеток имеет дополнительные, еще не изученные, пути индукции ПКС.

Необходимо упомянуть, что в 2009 г. появились сведения о новом комплексе, обнаруженном в клеточном ядре, в состав которого входит PIDD, Ser/Thr киназа DNA-PKs (DNA-dependent protein kinase), а также каспаза-2 [30]. Авторы обнаружили все три компонента комплекса DNA-PKcs-PIDDосома и в ядрах нестимулированных клеток. Однако в 2011 году работа была снята с публикации, так что существование и возможную роль комплекса DNA-PKcs-PIDDосома еще предстоит выяснить.

Активация каспазы-2 в нейрональной ткани через PIDDосома-зависимые и независимые платформы

Вопрос относительно физиологической роли каспазы-2 долгое время оставался открытым. Результаты Вестерн-блот-анализа, коиммунопреципитации и иммунофлуоресцентного окрашивания нейронов выявили колокализацию и прямую связь между PIDD-CC, RAIDD и прокаспазой-2, а также присутствие PIDDосома в изучаемых нейронах [22]. Введение siРНК против PIDD за 48 ч до вызова ишемии у крыс приводило не только к снижению экспрессии PIDD-CC, но и к пониженной активации прокаспазы-2 и Bid, в результате чего наблюдалось уменьшение повреждений нейрональной ткани и фрагментации ДНК в CA1 зоне гиппокампа после общей церебральной ишемии [22]. Эти эксперименты подтвердили роль PIDD в активации прокаспазы-2 и предполагают участие каспазы-2 в нейрональной гибели гиппокампальной зоны головного мозга после перенесенной ишемии у крыс.

На модели новорожденных мышей в условиях гипоксии-ишемии инактивирование каспазы-2 путем инъекции siРНК проводило к значительно менее выраженным повреждениям в кортикальной зоне и в зоне белого вещества неонатального головного мозга [31]. Эти результаты получены на *casp2^{-/-}* мышах, которых подвергали гипотермии (при 33°C) в течение 5 ч сразу после гипоксии-ишемии [31]. После такой обработки наименее поврежденными оказались зоны гиппокампа и таламуса, в то время как в других зонах серого и белого вещества степень повреждений была сравнима с нейрональной тканью мышей, которых содержали в нормальных условиях [31]. Полученные результаты позволяют говорить о вкладе опосредованной каспазой-2 ПКС в патофизиологию перинатального головного мозга мышей. Хотя точный механизм активации каспазы-2 и индуцируемые ею эффекторы в мозгу новорожденных мышей еще не изучены, каспазу-2 можно рассматривать как потенциальную мишень для терапевтической защиты нейронных клеток от гибели у новорожденных.

Совсем иные выводы можно сделать из результатов других исследований [32], в которых показано, что активация каспазы-2 в нейронах может быть только RAIDD-зависимой. Так, в клетках феохромацитомы крыс PC12 активация каспазы-2 наблюдается уже через 2 ч после их обработки β-амилоидом или при недостатке нейронального фактора роста, а комплекс, активирующий каспазу-2, собирается в отсутствие белка PIDD и приводит к гибели нейронов.

Еще одна интересная функция каспазы-2 открыта на линии клеток тератокарциномы человека NT2, обработанных ретиноевой кислотой [33]. Это универсальная модель терминальной дифферен-

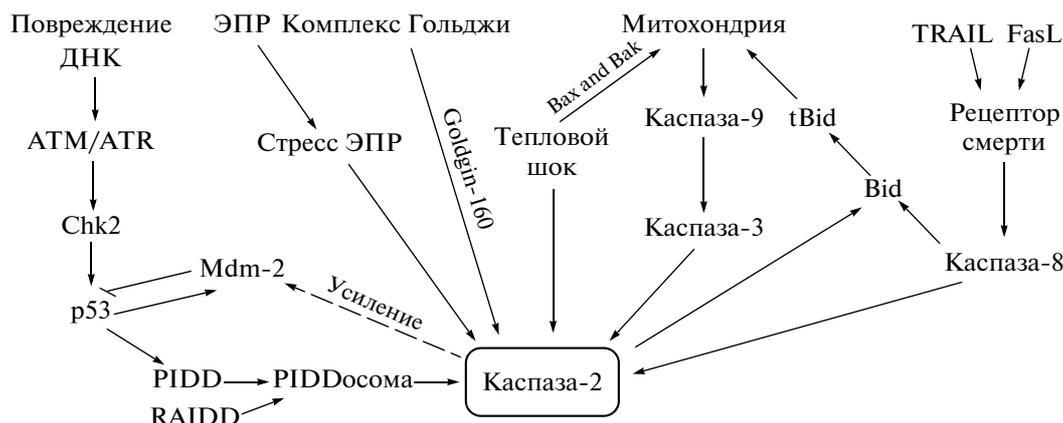


Рис. 3. Основные пути активации каспазы-2 в клетке. Сплошными стрелками обозначены основные пути передачи сигнала при активации каспазы-2. Пунктирной стрелкой обозначено усиление сигнала, индуцируемое активной каспазой-2, расщепляющей ингибитор Mdm2 [34]. Знаком вопроса обозначен возможный механизм прямой активации каспазы-2 тепловым шоком. Расшифровка всех аббревиатур приведена в списке принятых сокращений в начале статьи.

цировки низкодифференцированных клеток-предшественников в клетки с нейрональным фенотипом, прошедших митоз и имеющих черты сходства с эмбриональными нейронами человека. Анализ уровня активации каспазы-2, -3 и -9 в процессе дифференцировки клеток под действием ретиноевой кислоты показал, что их активность избирательно сменяет одна другую в клетках, не претерпевающих апоптоз [33]. В клетках с пониженной с помощью siРНК экспрессией каспазы-9 уровень мРНК и белка таких нейрональных маркеров, как молекула адгезии NCAM (neural cell adhesion molecule), белок-2, ассоциированный с микротрубочками (MAP-2), и тирозин-гидроксилаза, значительно снижен [33]. В то время как в клетках с siРНК против *casp2* экспрессия перечисленных выше белков, напротив, сильно увеличена [33]. Таким образом, каспаза-9 и каспаза-2 выполняют противоположные функции в процессе дифференцировки клеток по нейрональному пути: каспаза-9 ускоряет, в то время как каспаза-2, скорее, тормозит созревание нейрональных клеток [33].

Хотя информация относительно активации каспазы-2 в нейрональной ткани представлена весьма узким спектром работ, на данном этапе можно с уверенностью говорить о существовании комплекса, активирующего каспазу-2, — этот комплекс специфичен для нейрональной ткани и индуцирует гибель нейронов головного мозга в неонатальном периоде и/или после перенесенного стресса, — а также о вкладе каспазы-2 в дифференцировку клеток по нейрональному пути.

Активация каспазы-2 в составе комплексов, ассоциированных с рецепторами смерти

В ряде работ описана активация каспазы-2 непосредственно в рецепторных комплексах, которые образуются при стимуляции рецепторов смерти (рис. 3). Всего к настоящему моменту охарактеризовано 6 рецепторов смерти (DR): рецептор фактора некроза опухоли TNF-R1, Fas/CD95/APO-1, TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR3 и DR6. В случае DR3 и DR6 участие каспазы-2 не выявлено.

Предположили, что каспаза-2 входит в состав рецепторного комплекса TNF-R1 [35]. Так, в клетках рака молочной железы человека активация каспазы-2 предшествует активации каспазы-8 при запуске TNF-индуцированного апоптоза, что может свидетельствовать об инициаторной роли каспазы-2 в этом пути ПКС [36]. Однако последние работы по изучению структуры и функции рецепторного комплекса TNF-R1 не подтвердили присутствия в нем каспазы-2 [37].

Показано, что в TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand)-индуцированном апоптозе каспаза-2 может играть инициаторную роль и активировать каспазу-8 [38]. Авторы предположили, что в данном случае регуляция происходит через ингибирующее фосфорилирование каспазы-2 по сайту Ser157, которое осуществляется протеинкиназой PKCK2. При пониженном уровне внутриклеточной PKCK2 фосфорилирование прокаспазы-2 по сайту Ser157 не происходило; напротив, шло дефосфорилирование, димеризация и последующая активация фермента по PIDDосома-независимому пути. Активированная каспаза-2 процессировала мономерную молекулу прокаспазы-8 и приводила к инициации апоптоза, индуцированного через TRAIL [38]. Следует отметить,

что аналогичных работ в этом направлении не последовало.

Активацию каспазы-2 в комплексе DISC (death-inducing signaling complex) наблюдали при запуске апоптоза путем лигирования рецептора смерти Fas (CD95/APO1) в Т- и В-лимфоцитах человека [21]. Однако авторы не обнаружили RAIDD в составе комплекса DISC и пришли к выводу, что в исследуемой модели адапторную функцию, возможно, выполняет иной, еще не идентифицированный в данном комплексе белок, который должен с одного конца нести домен CARD – для взаимодействия с каспазой-2, а с другого домен DD – для связывания со второй адапторной молекулой FADD. Не исключено, что для связывания каспазы-2 с комплексом DISC не требуется каких-либо дополнительных адапторных белков, а связывание белка может быть обеспечено за счет гетеротипического взаимодействия домена CARD каспазы-2 с DD доменом Fas. Важно, что, находясь внутри комплекса DISC, каспаза-2 не могла самостоятельно индуцировать клеточную гибель, и ингибирование экспрессии каспазы-2 с помощью siPHK не оказывало влияния на активацию каспазы-8. Возможно, что роль инициаторной каспазы в индукции апоптоза, запущенного путем лигирования Fas, играет каспаза-8 [21]. Но тогда как быть с результатами, согласно которым процессинг каспазы-8 зависит от каспазы-2 и каспаза-2 проявляет инициаторные свойства в DR-опосредованном апоптозе [38]? Столь противоречивые результаты могут быть объяснены с позиции разной природы Fas, TRAIL и TNF рецепторов смерти, а также использованием в экспериментах разных клеточных линий.

Показано, что при обработке 5-фторурацилом (5-FU) клеток рака прямой кишки HCT116 p53^{+/+} собирается комплекс DISC, и для активации каспазы-2 внутри этого комплекса требуется присутствие каспазы-8 [23], что согласуется с данными И. Лаврик (Lavrik) и соавт. [21]. Образование комплекса DISC и активация каспазы-8 – это необходимые условия расщепления прокаспазы-2 в клетках HCT116 после обработки 5-FU. Затем активированные каспаза-8 и каспаза-2 вызывают расщепление Bid с последующим выходом цитохрома *c* и процессингом эффекторных каспаз-3 и -7.

Вопрос об активации каспазы-2 внутри комплексов, ассоциированных с рецепторами смерти, пока находится в стадии обсуждения и достоверного ответа на него еще не получено. И тут особое внимание приковано к механизмам связывания каспазы-2 с этими комплексами – не понятно, требуются ли для этого дополнительные адапторные белки или достаточно гетеротипического связывания домена CARD каспазы-2?

Эффекторная функция каспазы-2

Активация каспазы-2 в таких платформах как PIDDосома и DISC демонстрирует ее роль как инициаторной протеазы. В тоже время в целом ряде работ показано, что каспаза-2 работает как эффекторная каспаза. Как в бесклеточной системе, так и на подвергнутых генотоксическому стрессу клеточных линиях каспаза-2 может активироваться под действием каспазы-3. В поддержку этой точки зрения свидетельствуют эксперименты, проведенные с нокаутными мышами. Так, первичные тимоциты и SV40-трансформированные МЭФ, полученные из *casp2*^{-/-} и *pidd*^{-/-} мышшей, погибали в ответ на повреждение ДНК, недостаток питательных веществ, стресс ЭР, повреждение цитоскелета, применение ингибитора киназ, а также активации Fas и TNF- α рецепторов смерти [39]. Кроме того, каспаза-2 подвергалась расщеплению в *raidd*^{-/-} и *pidd*^{-/-} тимоцитах после воздействия генотоксического стресса и, что важно, процессинг каспазы-2 был зарегистрирован после активации каспазы-3 [39]. Это согласуется с данными, полученными на клетках HCT116, в которых экспрессия PIDD и RAIDD была снижена с помощью siPHK, однако эта манипуляция не оказывала влияния на процессинг каспазы-2 [40].

Ряд дополнительных экспериментов показывает, что активация каспазы-2 наступает после пермеабилзации внешней мембраны митохондрий (ПВММ), образования апоптосомы и последующего процессинга каспазы-3. Таким образом, каспаза-2 также проявляет эффекторную функцию. В одном из исследований показано [39], что в клетках с повышенной экспрессией анти-апоптотического белка Bcl-2 не происходит процессинга каспазы-2 и каспазы-3, в то время как в *puma*^{-/-} клетках процессинг каспазы-2 идет, но с задержкой во времени. Это позволяет предположить, что для активации каспазы-2 в клетках с повышенным уровнем Bcl-2 требуется ПВММ и выход цитохрома *c*, а в случае *puma*^{-/-} лимфоцитов дополнительные эффекторные белки, например Noxa и Vim, вносят вклад в апоптоз, индуцированный повреждением ДНК.

Необходимо отметить, что существует ряд работ, результаты которых свидетельствуют о том, что активация каспазы-2 при генотоксическом стрессе наступает до ПВММ и каспаза-2 может выполнять инициаторную роль. Так, в клетках IMR90EA1 (фибробласты человека, трансформированные онкогеном EA1), трансфицированных siPHK против каспазы-2, после обработки цисплатином и этопозидом не происходило высвобождения цитохрома *c* и Smac/DIABLO, и эти клетки не претерпевали ПКС [41]. Похожие результаты получены и на линии Т-клеток Jurkat (трансформированные Т-лимфоциты челове-

Субстраты каспазы-2

Субстрат	Физиологическая роль	Функция после расщепления	Сайт расщепления	Ссылки
Гольджин-160	Везикулярный транспорт	Фрагментация аппарата Гольджи	Asp59	[45]
Bid	Индуктор апоптоза	Образование укороченной формы tBid, пермеабиллизация внешней мембраны митохондрий	Asp59	[46]
α II-спектрин	Компонент плазматической мембраны	Дестабилизация мембранного цитоскелета	Asp1185	[47]
RIP1	Активация NF- κ B в ответ на экспрессию TNF- α	Ингибирование активации NF- κ B	Неизвестен	[48]
Протеинкиназа C δ (PKC δ)	Регуляция клеточного цикла, индукция апоптоза в ответ на повреждение ДНК	Дестабилизация ядерных ламинов, ингибирование экспрессии ДНК-РК	Asp369	[49]
Mdm2	E3 убиквитин-лигаза, основной регулятор уровня экспрессии p53	Отделение RING-структуры от Mdm2, связывание и стабилизация p53	Asp367	[34]
Sirt1	Деацетилаза, защита от апоптоза опухолевых клеток	Ацетилирование 14-3-3 ζ , отщепление 14-3-3 ζ от каспазы-2, активация каспазы-2	Lys49	[50]
Гентинггин	Антиапоптотическая и нейропротекторная функции	Деградация гентинггина с образованием цитотоксических продуктов, дегенерация нервной ткани	Asp552	[51]
ICAD	Ингибитор CAD (caspase-activated DNase)	Фрагментация ДНК	Asp117	[52]
PARP	Репарация ДНК	Инактивация	Asp214	[53]
BAD	Связывание с Bcl-X _L , индукция апоптоза	Образование укороченной формы tBAD, индукция апоптоза	Неизвестен	[54]
CUX1	Транскрипционный фактор, регуляция клеточного цикла	Образование укороченной формы CUX1, ускоренный вход в S-фазу и пролиферация клеток	Asp1320 Asp1336 Asp1339 Asp1351	[55]
Δ Np53 α	Изотип p53, возникший в результате альтернативного сплайсинга, онкоген	Отделение T1-домена, потеря антиапоптотической и онкогенной функций	Asp452 Asp469 Asp489	[56]

ка), обработанных этопозидом [18]. Эти данные, безусловно, свидетельствуют в пользу инициаторной функции каспазы-2 в апоптозе, но противоречат вышеупомянутым наблюдениям о подверженности апоптозу клеток *casp2*^{-/-}, находящихся под действием генотоксического стресса [39]. Однако в *casp2*^{-/-} клетках другие инициаторные каспазы могут компенсировать недостаточную экспрессию каспазы-2. Так, показано, что клетки с двойным нокаутом: по каспазе-2 и каспазе-9 — претерпевают апоптоз, индуцированный этопозидом, дексаметазоном и γ -излучением [42].

По-видимому, путь активации каспазы-2 зависит как от типа клеток, так и от химического агента, который использован для запуска клеточной гибели. Важно отметить, что в экспериментах, где продемонстрирован вклад комплекса RIDDосома в активацию каспазы-2, белок обнаружен в ядре

[43]. В лимфоцитах, МЭФ, клетках карциномы прямой кишки человека (HCT116), несмотря на индукцию апоптоза, каспаза-2 активировалась по RIDDосома-независимому пути и оставалась в цитозоле [23, 39, 40]. Таким образом, внутриклеточная локализация каспазы-2 может иметь решающее значение для определения пути активации [44]. Несомненно, этот вопрос требует дальнейшего изучения.

СУБСТРАТЫ КАСПАЗЫ-2

В отличие от других каспаз, субстратами которых служат тетрапептиды, каспаза-2 узнает и использует в качестве субстрата пентапептид XDVD. Среди более 500 белков, известных как природные субстраты различных каспаз, всего несколько расщепляются каспазой-2 (таблица).

Так, каспаза-2, помимо автопроцессинга, может расщеплять белок гольджин-160, весь пул которого сосредоточен в аппарате Гольджи. Расщепление каспазой-2 белка гольджин-160 — одно из основных звеньев процесса фрагментации аппарата Гольджи в ходе апоптоза [45]. Каспаза-3 и каспаза-7 также могут расщеплять гольджин-160, но, поскольку непосредственно в аппарате Гольджи обнаружена лишь каспаза-2, можно предполагать, что именно у нее есть “прямой доступ” к этому белку.

Каспаза-2 может расщеплять про-апоптотический белок семейства Bcl-2, относящийся к подклассу BH3-домен-содержащих белков (BH3-only protein), Bid, с образованием продукта tBid, после чего следует транслокация tBid в митохондрии и выход цитохрома *c* [46]. Расщепление белка Bid после активации каспазы-2 в комплексе DISC может играть важную роль при передаче апоптотического сигнала, передаваемого через рецепторы смерти [21, 57], а также при возможной инициации каспазой-2 митохондриального пути запуска апоптоза [46].

Еще один субстрат каспазы-2 — белок α II-спектрин [47], входящий в состав плазматической мембраны. Процессинг этого белка в ходе апоптоза приводит к дестабилизации мембранного цитоскелета. Кроме того, α II-спектрин считается мишенью таких протеаз, как *m*- и μ -кальпаины (Ca^{2+} -активируемые протеазы) и каспаза-3. Интересно, что эффекторная каспаза-7, как и каспазы-3 и -2, расщепляет спектрин по Asp1185, что служит косвенным доказательством эффекторной функции каспазы-2 в клетке [5].

Каспаза-2 может также расщеплять белок RIP1, который активирует NF- κ B в ответ на экспрессию TNF- α и повреждение ДНК [48]. Расщепление каспазой-2 белка RIP1 ингибирует активацию NF- κ B и приводит к блокированию экспрессии ряда анти-апоптотических генов [48]. Таким образом, каспаза-2 может усиливать апоптоз за счет ингибирования анти-апоптотических сигналов.

В опытах на клетках линии Jurkat открыт еще один субстрат каспазы-2 — протеинкиназа C δ (PKC δ) [49]. Еще несколько белков: ICAD, PARP, BAD, Δ Np63 α и транскрипционный фактор CUX1 — относят к предполагаемым субстратам каспазы-2 [52–56] (табл.). Однако многие из этих результатов получены *in vitro* с использованием рекомбинантной каспазы-2 и нуждаются в дальнейшем подтверждении в клеточной системе. Один из интереснейших субстратов каспазы-2 — белок Mdm2, который играет ключевую роль в регуляции активности белка p53, а также других белков путем убиквитинирования [34]. На клетках рака легкого человека показано, что каспаза-2 гидролизует Mdm2 по сайту FDVPD³⁶⁷, что при-

водит к отщеплению от Mdm2 p53-связывающего домена и RING-структуры, ответственной за убиквитинирование p53. В результате образуется p60 фрагмент, который конкурирует с полноразмерным белком Mdm2 за связывание с p53. Как следствие, уровень стабильного p53 в клетке возрастает, что индуцирует остановку клеточного цикла и последующую устойчивость к химиотерапевтическим препаратам [34].

В данном случае каспаза-2 выступает позитивным регулятором активности p53. Однако есть работы, в которых показано реципрокное взаимодействие между этими белками. Так, у старых *casp2*^{-/-} мышей наблюдается экспрессия p53 [58]. Более того, подавление экспрессии каспазы-2 или ингибирование ее активности приводит к стабилизации экспрессии p53 [40]. Кроме того, ингибитор каспазы-2, z-VDVAD-fmk, блокирует фосфорилирование гистона H2AX (Ser139) и p53 (Ser15), но не оказывает воздействия на фосфорилирование ATM (Ser1981) в клетках линии RT4, что предполагает участие каспазы-2 в активации p53 и/или H2AX [59]. Замечена сниженная частота встречаемости мутаций p53 в клетках *E μ -Myc/casp2*^{-/-} лимфом по сравнению с *E μ -Myc* лимфомами, что ставит каспазу-2 выше p53 в иерархии молекулярного пути запуска апоптоза [34]. Ассоциировано ли это различие с тканеспецифичностью, покажут дальнейшие исследования.

Из совокупности рассмотренных данных следует, что каспаза-2 может действовать и как инициаторная каспаза (автопроцессинг, расщепление белков гольджин-160, Bid, PKC δ и RIP1), и как эффекторная каспаза (расщепление α II-спектрин) [60]. Поиск новых белков — клеточных мишеней каспазы-2 — продолжается.

КАСПАЗА-2 И КЛЕТОЧНАЯ ГИБЕЛЬ

В последнее десятилетие появляется все больше данных, свидетельствующих об участии каспазы-2 в процессе клеточной гибели, опосредованной различными стимулами [5, 6]. Обратимся к рассмотрению участия каспазы-2 в различных путях индукции ПКС (рис. 3).

Каспаза-2 и митохондриальный путь индукции апоптоза

Как отмечалось выше, при повреждении ДНК каспаза-2 может выступать и как инициатор, и как эффектор митохондриального пути развития апоптоза в зависимости от вида повреждения и типа исследуемых клеток [5] (рис. 3). Не зависимо друг от друга три группы исследователей показали, что каспаза-2 непосредственно влияет на активацию митохондриального пути [18, 41, 46]. Каким же образом это может происходить? Была предложена модель, согласно которой на ранних

этапах апоптоза каспаза-2, находясь в ядре, способна индуцировать ПВММ [19]. Показано, что выход цитохрома *c* происходит в отсутствие очевидных изменений в строении ядерных пор и ядерно-цитоплазматического барьера. До сих пор остается неясным вопрос, необходимы ли морфологические изменения в ядерной мембране для экспорта активной формы каспазы-2 из ядра. Можно предположить что существует ядерный фактор, регулируемый каспазой-2, который выходит из ядра в цитозоль, где служит индуктором передачи сигнала в митохондрии [19].

Выше упоминалось о том, что белок Bid, будучи субстратом каспазы-2, превращается в укороченную форму, tBid, способную инициировать митохондриальный путь [21, 46, 57]. Однако есть группа исследователей, которая придерживается мнения, что ПВММ, индуцированная каспазой-2, происходит независимо от расщепления Bid. Используя рекомбинантную каспазу-2, Робертсон (Robertson J.D) и др. обнаружили, что только процессированная каспаза-2, но не каспазы-3, -6, -7 или -8, пермеабилизирует внешнюю мембрану митохондрий и индуцирует выход цитохрома *c* и Smac/DIABLO [61]. Эти процессы происходят независимо от белков семейства Bcl-2, включая Bax, Bak и Bcl-2, и не требуют протеолитической активности каспазы-2. Возможно, выход проапоптотических белков из межмембранного пространства митохондрий может происходить за счет связывания каспазы-2 с фосфолипидами, расположенными на внешней мембране митохондрий [5]. Показано, что процессированная рекомбинантная каспаза-2 индуцирует быстрый, концентрационно-зависимый выход цитохрома *c* в пермеабилизированных клетках, в изолированных митохондриях, а также в свободных от белков липосомах [62]. Интересно, что каспаза-2 способна разрывать связь между цитохромом *c* и фосфолипидами, в том числе с кардиолипином, тем самым способствуя дополнительному выбросу цитохрома *c* в цитозоль или супернатант [62]. Эти результаты наводят на мысль, что каспаза-2 обладает уникальным свойством, а именно, запускает митохондриальный путь индукции апоптоза без расщепления белка Bid [61]. Однако есть и другие данные, которые не согласуются с вышеизложенными. Так, ни клетки *Bid*^{-/-} МЭФ, ни клетки HeLa с siРНК против Bid не претерпевают апоптоза, и в этих клеточных линиях не происходит выброса цитохрома *c* при повышенной экспрессии каспазы-2 [63].

Из вышеприведенных данных следует, что каспаза-2 выполняет инициаторную функцию в протеолитическом каскаде, индуцированном повреждением ДНК. Однако каспаза-2 может играть важную роль не только на инициаторных этапах митохондриального пути индукции апоптоза, но и на эффекторных (рис. 3). Так, в лизатах клеток

линий Jurkat и MCF-7, в которых произошел выход цитохрома *c* из митохондрий, наблюдается расщепление прокаспазы-2 каспазой-3 [64]. Кроме того, в *Apaf-1*^{-/-} и *casp9*^{-/-} клетках мышей не происходит индуцируемого этопозидом и γ -излучением аутопротеолиза прокаспазы-2, а это предполагает участие находящейся в составе апоптосомы каспазы-9 в процессинге каспазы-2 [8, 65]. Весьма вероятно, что активация каспазы-2 может происходить и после ПВММ, но этот процесс зависит от типа клеток. Следует заметить, что сих пор нет неопровержимых доказательств того, что процессинг каспазы-2 после ПВММ – достаточное условие для ее активации и дальнейшего участия в индукции ПКС [66].

Каспаза-2 и апоптоз, индуцированный рецепторами смерти

На настоящий момент вопрос о вкладе каспазы-2 в апоптоз, индуцированный через рецепторы смерти, остается открытым в силу недостатка доказательств в пользу кооперации или же, напротив, конкуренции между каспазой-2 и каспазой-8. Как отмечалось выше, есть факты, свидетельствующие как о инициаторной, так и о эффекторной роли каспазы-2 при стимуляции рецепторов смерти [21, 38]. Поскольку Bid – субстрат каспазы-2, не исключено, что каспаза-2, расщепив Bid, может запускать апоптоз при пониженной экспрессии каспазы-8 или действовать параллельно с ней. Эту гипотезу подтверждают результаты экспериментов, проведенных на рецепторах смерти TRAIL-R и TNF-R [6, 36, 38, 57] (рис. 3).

Каспаза-2 и тепловой шок

На модели клеток Jurkat была разработана новая методика мечения *in situ*, которая позволяет определить иерархическое положение активированной каспазы [67]. Клетки обрабатывали проникающим через мембрану биотинилированным ингибитором каспаз biotin-VAD-fmk, который ковалентно связывается с первой из каспаз, активированной в ответ на определенный стимул. Так показали, что каспаза-2 первой активируется в ответ на действие теплового шока, а это влечет за собой клеточную смерть, сопровождающуюся процессингом Bid [63, 67] (рис. 3). Однако попытки воспроизвести эти результаты на других клетках: первичных тимоцитах, активированных спленоцитах или иммортализованных МЭФ, полученных из *casp2*^{-/-} или *raidd*^{-/-} животных, – не подтвердили механизм активации каспазы-2 при действии теплового шока на клетку [6]. Также следует отметить, что индуцированная тепловым шоком ПКС может возникать независимо от активации каких-либо известных инициаторных

каспаз [68]. Так, в погибающих клетках Jurkat авторы не обнаружили ни повышенной экспрессии комплексов FADD-каспазы-8 и RAIDD-каспазы-2-PIDD; ни участия упомянутых выше инициаторных каспаз, а также каспаз-4 и -12, активируемых при стрессе ЭР. Несмотря на то, что после теплового шока происходил выброс цитохрома *c* из митохондрий, активация каспазы-3 происходила по каспазы-9-независимому пути. Это поддерживает идею о том, что тепловой шок может индуцировать олигомеризацию Вах или Bak [69]. Таким образом, вклад каспазы-2 в апоптоз, вызываемый тепловым шоком, остается дискуссионным вопросом.

Каспаза-2 и стресс эндоплазматического ретикулума

Функция каспазы-2 как инициатора клеточной смерти обнаружена в клетках, обработанных агентами, повреждающими ЭР [70, 71] (рис. 3). С помощью конфокальной микроскопии и опытов по фракционированию органелл клеток HeLa была выявлена локализация каспазы-2 в ЭР и ее активация в процессе клеточной смерти. Выше обсуждалось расщепление белка гольджин-160 каспазой-2 в аппарате Гольджи, где эта каспаза играет роль апикального сенсора, воспринимающего стресс-сигналы [8, 45]. Клетки МЭФ, в которых экспрессию каспазы-2 блокировали либо с помощью siРНК, либо брэфелдина А (ингибитор транспорта ЭР-аппарат Гольджи), либо тапсигаргина (ингибитор Ca²⁺ каналов ЭР), оказались устойчивы к факторам, вызывающим ЭР-стресс [71]. Еще одним доказательством в пользу участия каспазы-2 в стрессе ЭР служит тот факт, что при обработке *casp8*^{-/-} SHSY5Y клеток нейробластомы тапсигаргином происходил процессинг каспазы-2 [70]. Наконец, в клетках OVCAR-8 (карцинома яичников), U373 (глиобластома) и NCI-H226 (карцинома легкого) при ингибировании ответа на стресс ЭР с помощью нокдауна одного из участников данного пути, *IRE1α*, после инфицирования рабдовирусом Мараба происходил каспаза-2-опосредованный апоптоз; при этом активация каспазы-2 шла по RAIDD-зависимому пути [72]. Этот механизм может иметь важное клиническое значение при терапии опухолевых заболеваний, позволяя направленно индуцировать ПКС в опухолевых клетках с заблокированным ответом на стресс ЭР. С другой стороны, используя метод *in situ* мечения с помощью biotin-VAD-fmk, показали, что в тимоцитах в ответ на повреждение ЭР первой из всех каспаз активируется каспаза-9 [67].

Активация каспазы-2 может происходить не только в ответ на ЭР-повреждающие агенты, но и в результате действия инвазивных патогенов, которые используют разнообразные порообразую-

щие токсины для проникновения в клетку хозяина и последующего запуска различных форм ПКС. Так, выявлено участие каспазы-2 в инициации апоптоза фагоцитов, индуцированного энтеробактериальным патогеном *Salmonella* [73]. Инвазивная форма *Salmonella typhimurium* воздействует параллельно и независимо на каспазу-2 и каспазу-1. Это приводит к высвобождению цитохрома *c* и активации каспаз-9 и -3. Интересно, что ни одно из вышеописанных событий не происходит в процессе каспазы-1-иницируемого апоптоза.

С помощью siРНК-нокдауна каспазы-2 в клетках HeLa показано, что при индукции апоптоза, вызванного α-токсином *Staphylococcus aureus* и аэролизинном *Aeromonas hydrophila* каспаза-2 действует как инициаторный фактор [74]. Важно заметить, что активация каспазы-2 в этом случае шла по PIDDосома-независимому пути, хотя в клетках, обработанных α-токсином, собирался каспаза-2-содержащий высокомолекулярный комплекс массой более 1 000 кДа и его сборка была K⁺-зависимой [74]. Как видно из изложенного выше, пути активации каспазы-2 весьма сложны и многоэтапны и, конечно, для их понимания необходимы дальнейшие углубленные исследования.

Каспаза-2 и окислительный стресс

Активные формы кислорода (ROS) представляют собой побочные продукты клеточного метаболизма и играют важную роль в клеточном сигналинге и поддержании клеточного гомеостаза [75]. Апоптоз клеток и образование ROS взаимосвязаны — на многих модельных системах выявлено образование ROS на начальных и поздних стадиях апоптоза [76]. На сегодняшний момент распространена точка зрения, согласно которой ROS в зависимости от апоптотического стимула могут, с одной стороны, выступать как активаторы образования проницаемости митохондрий, а с другой, быть продуктами нарушения их мембранного потенциала, вызывающими усиление апоптоза [77]. Увеличение уровня ROS сопровождается активацией каспазы-2 [78]. Причем сверхпродукция митохондриального O₂ приводит к запуску особенного Вах-независимого пути апоптоза, требующего Bak, tBid и каспазы-2 [79].

На уровне целого организма повреждение, вызываемое избыточным накоплением ROS, рассматривают как один из факторов ускоренного старения [75]. Примечательно, что *casp2*^{-/-} мыши характеризуются повышенным уровнем окисленных белков в печени, вероятно, под действием ROS, а также ускоренным появлением возрастных изменений, ведущих к уменьшению продолжительности жизни [80]. Усиленный окислительный стресс у *casp2*^{-/-} мышей [81] хорошо согласу-

ется с описанными выше результатами. Авторы наблюдали у старых *casp2^{-/-}* мышей увеличенный уровень окисленных белков, липидов и повреждений ДНК, причем при индукции прооксидантами *casp2^{-/-}* МЭФ продуцировали ROS в значительно большем количестве, чем у мышей с нормальным содержанием каспазы-2 [81]. У старых *casp2^{-/-}* нокаутных мышей, по сравнению с диким типом, обнаружили уменьшенную активность глутатион-пероксидазы, супероксид-дисмутазы и повышенный уровень p21, а также увеличенное число гепатоцитов с признаками старения. У молодых *casp2^{-/-}* мышей, по сравнению с молодыми мышами дикого типа, не было усиления активности глутатион-пероксидазы и супероксид-дисмутазы. Авторы работы приблизились к пониманию механизма супрессии окислительного стресса каспазой-2 – они обнаружили, что у старых мышей экспрессия транскрипционных факторов FoxO1 и FoxO3a значительно уменьшена по сравнению с молодыми мышами дикого типа. Таким образом, каспаза-2, вероятнее всего, через транскрипционные факторы FoxO участвует в регуляции окислительного стресса [81].

Не исключено, что, с одной стороны, присутствие активной каспазы-2 противодействует индуцированному ROS апоптозу и ведет к старению; с другой стороны, не во всех клетках высокое содержание ROS приводит к индукции апоптоза. Так, дифференцирующиеся в первичной культуре клеток нейроны отличаются от своих предшественников высокой продукцией свободных радикалов [82]. Открытым остается также вопрос о посредниках, т.е. о сигнальном пути между активацией каспазой-2 и регуляторами окислительного стресса FoxO.

Подытоживая сказанное, следует отметить, что ранее распространенная точка зрения, согласно которой преждевременное старение у *casp2^{-/-}* мышей может быть результатом неправильной работы механизма негомологического сшивания концов цепей ДНК (NHEJ, non-homologous end joining) и сопутствующей генетической нестабильности [83], в последнее время подверглась корректировке, поскольку получены доказательства в пользу ROS-зависимого механизма. Вместе с тем, вклад генетической нестабильности как причины, способной лежать в основе преждевременного старения, нельзя исключать, поскольку для *casp2^{-/-}* клеток характерны укорочение теломера и анеуплоидия, что давно считается маркером старения [58]. Таким образом, нокаут каспазы-2 может оказывать на организм мышей комплексное действие, в том числе вызывать у них появление признаков раннего старения.

РОЛЬ КАСПАЗЫ-2 В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА И ОПУХОЛЕВОЙ СУПРЕССИИ

Сведения относительно участия каспазы-2 в регуляции клеточного цикла немногочисленны. Предполагается, что каспаза-2 может участвовать в регуляции клеточного цикла, так как есть экспериментальные доказательства стабилизации каспазы-2 циклином D3 [84]. Детальное исследование механизма этого взаимодействия может пролить свет на связь между клеточным циклом и ПКК. Обнаружено, что фосфорилирование каспазы-2 по Ser340 комплексом циклин-зависимая киназа-1 (CDK1)-циклин B1 приводит к инактивации каспазы-2 и задержке гибели U2OS клеток (фибросаркома человека) в ответ на митотическую катастрофу, вызванную действием нокадзола [85].

Еще одним доказательством в пользу участия каспазы-2 в регуляции клеточного цикла служит ее связь с киназой Chk1 (checkpoint kinase 1). Установлено, что Chk1 обладает способностью ингибировать активность каспазы-2 [86]. На различных линиях опухолевых клеток человека было показано, что в ответ на действие γ -излучения каспаза-2 может индуцировать апоптоз в условиях ингибирования Chk1 с помощью индолокарбозола (Gö6976), причем активация каспазы-3 наступала лишь перед фрагментацией ДНК, в отличие от классического пути течения апоптоза. Основными регуляторами этого пути ПКК оказались киназы ATM (ataxia telangiectasia mutated) и ATR (ATM and Rad3 related) [86]. ATM – главная киназа, отвечающая за регуляцию G2/M “checkpoint” в ответ на появление двуцепочечных разрывов ДНК [87]. Большинство ATM-фосфорилируемых субстратов, включая p53, принимают участие в регуляции клеточного цикла и/или в ответе на повреждение ДНК. G2/M арест находится под контролем ATM либо через ATM-ATR-Chk1/Chk2-Cdc25, либо через ATM-Chk2-p53-p21/14-3-3 σ /GADD45 пути [88]. Интересно, что при запуске апоптоза через каспазу-2 ни нокдаун p53, ни повышенная экспрессия белков семейства Bcl-2 не оказывали влияния на силу апоптотического ответа [86].

Недавно установлен механизм стабилизации и увеличения количества белка p53 в клетках с нормальной функцией каспазы-2 [34]. Ускоренная пролиферация при нокдауне каспазы-2, выявленная на модели клеток A549, происходила, очевидно, по причине дестабилизации p53. Тогда как повышенная экспрессия PIDD в клетках HCT116 p53^{+/+} приводила к задержке клеточного цикла даже в отсутствие повреждения ДНК [34]. Следует отметить, что подавление экспрессии каспазы-2 в клетках не всегда сопровождается снижением содержания p53. Так, в клетках обработанных

5-FU, подавление каспазы-2 приводило к увеличению количества белка p53 [40].

В нескольких работах рассматривалась взаимосвязь между p53, каспазой-2 и белком p21 – ингибитором циклин-зависимых киназ и репрессором клеточного цикла. Так, установлено что p21, экспрессия которого регулируется p53, подавляет уровень мРНК гена *casp2* независимо от наличия повреждений ДНК, а делеция p21 или E2F1 приводит к повышенной экспрессии каспазы-2 в опухолевых клетках человека H1299 [89]. Вместе с тем, используя панель клеточных линий немелкоклеточного рака легкого, в том числе и H1299, продемонстрировано, что экспрессия мРНК каспазы-2 не зависит от статуса p53 и наличия повышенного количества PIDD, тогда как экспрессия p21 зависит от присутствия p53 дикого типа [34]. Эти данные, с одной стороны, свидетельствуют об отсутствии регуляции транскрипционной активности гена *casp2* белком p53 и, с другой стороны, предполагают наличие прямой взаимосвязи между каспазой-2 и p21. Такую взаимосвязь пытались выявить Сон (Sohn) и соавт., предложившие трансляционный механизм регуляции экспрессии p21 каспазой-2 [90]. Они обнаружили, что повышенная экспрессия каталитически неактивной мутантной формы каспазы-2 увеличивала уровень экспрессии p21 в НСТ116 p53^{+/+} клетках, тогда как ее нокдаун приводил к снижению экспрессии p21, и заключили, что энзиматическая активность каспазы-2 не требуется для регуляции экспрессии p21. Интересно, что при нокдауне каспазы-2 наблюдалась повышенная пролиферация облученных НСТ116 p53^{+/+} клеток, что хорошо согласуется с данными, полученными на *casp2*^{-/-} МЭФ, потеря функции p53 в которых приводила к пониженному уровню мРНК p21 [58, 91].

Связь каспазы-2 с клеточным циклом имеет большое значение в вопросах супрессии опухолей. Переходя к рассмотрению каспазы-2 как опухолевого супрессора, следует отметить, что в течение продолжительного времени считалось, что цитогенетические аномалии в районе 7q34-35 хромосомы 7, содержащей ген каспазы-2, ассоциированы с развитием целого ряда гематологических опухолей [92]. В связи с этим высказывали предположение об участии каспазы-2 в качестве опухолевого супрессора в некоторых формах рака [93]. Одним из главных доказательств в пользу такой роли каспазы-2 стали результаты экспериментов, выполненных на *casp2*^{-/-} МЭФ, а также на модели мышью лимфомы *Eμ-Myc* [91]. У *Eμ-Myc*-трансгенных мышей развитие лимфом отмечается в среднем в возрасте 16 недель [94]. Появление лимфом у гетерозиготных по *casp2* *Eμ-Myc*-мышей детектировали в возрасте около 12 недель, причем более 90% особей были неизлечимы. В то же время, у *Eμ-Myc casp2*^{+/+} животных

лимфомагенез развивался у менее чем 50% особей. Потеря обеих копий *casp2* приводила к повышенной скорости лимфомагенеза, и *Eμ-Myc casp2*^{-/-} животные становились неизлечимо больными через 4 недели, при этом средняя продолжительность жизни у них составляла 8 недель, в то время как *Eμ-Myc*-трансгенные мыши в среднем живут несколько месяцев [91]. Подверженность *Eμ-Myc*-индуцированному лимфомагенезу у *casp2*^{+/+} и *casp2*^{-/-} мышей была аналогична таковой для мышей *Eμ-Myc Bim*^{+/+} и *Eμ-Myc Bim*^{-/-}, дефицитных по белку Bim – регулятору лимфоидного и миелоидного гомеостаза [95].

МЭФ с ноккаутом *casp2* обладали сниженной восприимчивостью к апоптозу, индуцированному цитотоксическими агентами и γ -излучением, и повышенной пролиферативной активностью по сравнению с МЭФ дикого типа. Скорость роста E2A- и HRAS^{v12}-трансформированных *casp2*^{-/-} МЭФ была выше, чем у трансформированных МЭФ дикого типа. Трансформированные *casp2*^{-/-} МЭФ образовывали более крупные колонии, которых также было количественно больше в агаре по сравнению с МЭФ мышей дикого типа [91]. При инъекции E2A- и HRAS^{v12}-трансформированных *casp2*^{-/-} МЭФ в иммунодефицитных мышей у животных быстро образовывались агрессивные опухоли, которые за 10 сут развивались в крупные опухоли. При инъекции трансформированными МЭФ дикого типа у мышей развивались мелкие, часто трудно детектируемые, опухоли [91].

В *casp2*^{-/-} МЭФ также обнаружена пониженная экспрессия генов-мишеней белка p53, включая *Cdkn1a* (кодирует белок p21), что могло стать причиной повышенной пролиферации и соответствующей туморогенной активности этих клеток, а также ослабленного ответа на действие апоптотических факторов [91]. В ходе дальнейших исследований на *casp2*^{-/-} МЭФ и *Eμ-Myc*-трансформированных клетках выявлено, что потеря каспазы-2 приводит к нарушению активации p53 (из-за снижения уровня фосфорилирования p53 по Ser18) и пониженной трансактивации p21 в ответ на действие γ -излучения [58]. Таким образом, снижение уровня или полное отсутствие каспазы-2 приводит к повышенной пролиферации клеток как в нормальных условиях, так и при повреждении ДНК, увеличивает их туморогенный потенциал и риск клеточной трансформации.

Продолжением этих работ стали опыты с мышами, нокдаунными по генам *casp2* и *pidd*. Отсутствие каспазы-2 или PIDD не оказывало влияния на скорость развития Т-клеточных лимфом, индуцированных γ -излучением, а также на прогрессию фибросаркомы, вызванной 3-метилхолантроном [96]. Эти данные противоречат результатам, которые предполагают участие компонентов

PIDDосомы в индуцированном повреждении ДНК апоптозе и в супрессии канцерогенеза. В этом случае несоответствие результатов, полученных учеными разных лабораторий, может быть обусловлено различиями и в методических подходах, и в выбранных моделях при постановке эксперимента. Интересно, что на модели *Eμ-Myc* В-клеточной лимфомы [96] получены результаты, сходные с данными Л. Хо (Ho) и соавторов [91], — потеря *casp2* ускоряла начало развития заболевания, а потеря *pidd* неожиданно приводила к задержке лимфомагенеза у *Eμ-Myc*-трансгенных мышей. Удивительно, что отсутствие *Vid* или *TRAIL* также не приводило к ускоренному образованию лимфом. Более того, в индуцированных к онкотрансформации *Eμ-Myc* клетках, полученных из *casp2^{-/-}* и *pidd^{-/-}* мышей, не наблюдалось снижения ПКС, ускоренной пролиферации, увеличения повреждения ДНК или снижения репарации по сравнению с контрольными мышами, что свидетельствует о нормальном ответе на повреждение ДНК. Кроме того, полученные данные говорят о наличии взаимодействий между *p53* и *casp2*, причем очевидно, что каспаза-2 действует в сигнальном пути до *p53*, так как опухолевые клетки *pidd^{-/-}* и *casp2^{-/-}* накапливались в G2/M фазе и митозе гораздо активнее, чем клетки мышей дикого типа. Авторам удалось зарегистрировать снижение уровня мРНК *p21* в *casp2^{-/-}* клетках [96], что соответствует данным Л. Хо (Ho) и соавторов [91]. Эти наблюдения отчасти подтверждают супрессорную функцию каспазы-2 в отношении клеточных опухолей и говорят о туморогенной функции PIDD. Таким образом, приведенные экспериментальные данные показывают существование функциональной связи между каспазой-2 и главным опухолевым супрессором *p53*, при этом каспаза-2 может действовать в сигнальном пути как до, так и после активации *p53* [44].

Остановка клеточного цикла или повреждение ДНК могут привести к митотической катастрофе — одному из путей ПКС, который начинается в метафазе и, по некоторым данным, требует активации каспаз [97]. Молекулярный механизм этого пути, изученный на клетках линий HeLa и HCT116, не зависит от *p53*, а осуществляется через активацию каспазы-2, выход цитохрома *c* из митохондрий, активацию каспазы-3 и конденсацию хроматина [97]. Блокирование экспрессии каспазы-2 предотвращает митотическую катастрофу и позволяет клеткам завершить клеточный цикл [97]. Согласно другим данным, полученным на клетках эпителиальной карциномы человека SCOV-3, каспаза-2 не требуется для процесса митотической катастрофы, однако *p53^{-/-}* статус абсолютно необходим для ее реализации. Трансфекция клеток плазмидой, содержащей функциональный *p53*, возвращала клеткам способ-

ность переключать программу клеточной гибели с митотической катастрофы на апоптоз [43]. Таким образом, связь между каспазой-2 и белками семейства *p53* представляется вероятным условием для активации различных программ клеточной смерти, правда, молекулярные механизмы этих процессов еще предстоит выяснить.

Принимая во внимание участие каспазы-2 в регуляции клеточного цикла, можно предположить, что уровень экспрессии каспазы-2 будет использоваться как прогностический фактор в клинической диагностике опухолей. К сожалению, за последнее время не так много исследований проведено по оценке экспрессии каспазы-2 в клинических образцах различных опухолей. Показано, что экспрессия каспазы-2 в Т-клетках детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) и пациентов с острым миелоидным лейкозом в три раза ниже по сравнению с экспрессией в В-клетках ОЛЛ [10]. Более того, в Т- и В-клетках, устойчивых к преднизолону, винкристину и *L*-аспаргиназе (РВА), полученных от пациентов с ОЛЛ, экспрессия каспазы-2 в 2 раза ниже, чем в РВА-чувствительных клетках ОЛЛ. Таким образом, уровень каспазы-2 может служить индикатором устойчивости клеток организма к действию лекарственных препаратов [10]. Используя ДНК-микрочипы, удалось показать, что пониженная экспрессия каспазы-2 имеет место при лимфоме клеток мантийной зоны [98]. Изменения в уровне экспрессии каспазы-2 замечены и в солидных опухолях, например, в цитоплазме клеток поверхностного и глубокого эпителия, а также в лимфоцитах слизистой оболочки желудка [9]. Анализ материала, полученного от 120 пациентов с карциномой желудка, показал, что в опухолевых клетках экспрессия каспазы-2 снижена на 52% по сравнению с клетками слизистой оболочки желудка здоровых людей. Весьма вероятно, снижение уровня каспазы-2 вносит вклад в прогрессию рака желудка [9]. Установлено, что в метастазирующих клетках опухоли головного мозга экспрессия каспазы-2 снижена [11]. Эти результаты указывают на вероятную функцию каспазы-2 как опухолевого супрессора.

РОЛЬ КАСПАЗЫ-2 В ПАТОЛОГИИ

Ранее накопленные данные свидетельствовали о возможном участии каспазы-2 в различных патологиях, ассоциированных с процессами старения. Например, активацию каспазы-2 наблюдали в присутствии β-амилоида — главного компонента амилоидных бляшек, которые диссеминирует в головном мозге при болезни Альцгеймера [99]. Участие каспазы-2 в течение болезни Гентингтона — нейродегенеративном заболевании, возникающем при увеличении количества CAG-повторов в гене гентингтина, — тоже отмечали. Экс-

прессия этой формы гена гентингина ассоциирована с повышенной экспрессией каспазы-2, а также каспаз-1, -3 и -7 [100]. Высокий уровень каспазы-2 обнаружен у пациентов, страдающих болезнью Гентингтона [51]. Каспаза-2 может связываться с продуктом гена гентингина в районах CAG-повторов, что приводит к деградации белка гентингина с последующим образованием цитотоксических продуктов, которые вызывают дегенерацию нервной ткани [51].

На модели ишемии и реперфузии кардиомиоцитов, полученных из куриного эмбриона, показано, что ингибирование каспазы-2 приводит к снижению вероятности события ПКС [101]. В этой модели ROS наносят наибольшее повреждение клеткам, а те условия, которые способствуют образованию ROS, могут активировать и каспазу-2 [66]. Оказалось, что каспаза-2 способна связываться с CARD-содержащим белком ARC, экспрессия которого имеет место только в тканях сердечной и скелетной мускулатуры [102]. Более того, ARC защищает кардиомиоциты от апоптоза, индуцированного окислительным стрессом, и, возможно, делает это путем ингибирования каспазы-2 [103]. Манипуляции с геном *casp2* могут найти применение в защите клеток от ROS при повреждениях тканей при ишемии и реперфузии кардиомиоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что с момента обнаружения гена каспазы-2, прошло много лет, ее биологическая роль и функции в клетках остаются еще не до конца понятыми. До сих пор неясно, в каких случаях она выполняет функции инициаторной, а в каких – эффекторной протеазы. Другая проблема связана с локализацией места активации каспазы-2 в клетке – это ядро или цитоплазма? Так что расшифровка молекулярных платформ активации фермента еще впереди. Вместе с тем, недавно полученные данные, углубившие наше понимание роли каспазы-2 в регуляции ответа на окислительный стресс и ее участия в развитии нейродегенерации при ишемическом повреждении мозга, позволяют надеяться на дальнейшее их развитие в клинической практике. Не менее важны наблюдения об участии каспазы-2 в супрессии ряда опухолей. Именно поэтому разработка принципов терапии, направленных на активацию каспазы-2 в опухолевых клетках и индукцию в них апоптоза, должна привлечь внимание исследователей в области современной онкологии.

Работа поддержана грантом Министерства образования и науки Российской Федерации (11.G34.31.0006).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*. **26**, 239–257.
2. Hengartner M. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. **407**, 770–776.
3. Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H., Horvitz H. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*. **75**, 641–652.
4. Kumar S., Kinoshita M., Noda M., Copeland N.G., Jenkins N.A. 1994. Induction of apoptosis by the mouse *Nedd2* gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-3* and the mammalian IL-1- β -converting enzyme. *Genes Dev*. **8**, 1613–1626.
5. Zhivotovsky B., Orrenius S. 2005. Caspase-2 function in response to DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 859–867.
6. Krumschnabel G., Sohm B., Bock F., Manzl C., Villunger A. 2009. The enigma of caspase-2: the laymen's view. *Cell Death Differ.* **16**, 195–207.
7. Bergeron L., Perez G.I., Macdonald G., et al. 1998. Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes Dev*. **12**, 1304–1314.
8. O'Reilly L.A., Ekert P., Harvey N., et al. 2002. Caspase-2 is not required for thymocyte or neuronal apoptosis even though cleavage of caspase-2 is dependent on both Apaf-1 and caspase-9. *Cell Death Differ.* **9**, 832–841.
9. Yoo N.J., Lee J.W., Kim Y.J., Soung Y.H., Kim S.Y., Nam S.W., Park W.S., Lee J.Y., Lee S.H. 2004. Loss of caspase-2, -6 and -7 expression in gastric cancers. *APMIS*. **112**, 330–335.
10. Holleman A., den Boer M.L., Kazemier K.M., Beverloo H.B., von Bergh A.R., Janka-Schaub G.E., Pieters R. 2005. Decreased PARP and procaspase-2 protein levels are associated with cellular drug resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. **106**, 1817–1823.
11. Zohrabian V.M., Nandu H., Gulati N., et al. 2007. Gene expression profiling of metastatic brain cancer. *Oncol. Rep.* **18**, 321–328.
12. Baliga B.C., Read S.H., Kumar S. 2004. The biochemical mechanism of caspase-2 activation. *Cell Death Differ.* **11**, 1234–1241.
13. Wang L., Miura M., Bergeron L., Zhu H., Yuan J. 1994. *Ich-1*, an *Ice/ced-3*-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell*. **78**, 739–750.
14. Martinet W., Knaapen M.W., de Meyer G.R., Herman A.G., Kockx M.M. 2003. Overexpression of the anti-apoptotic caspase-2 short isoform in macrophage-derived foam cells of human atherosclerotic plaques. *Am. J. Pathol.* **162**, 731–736.
15. Zhivotovsky B., Samali A., Gahm A., Orrenius S. 1999. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ.* **6**, 644–651.
16. Van Loo G., Saelens X., Matthijssens F., Schotte P., Beyaert R., Declercq W., Vandenabeele P. 2002. Caspases are not localized in mitochondria during life or death. *Cell Death Differ.* **9**, 1207–1211.

17. Colussi P.A., Harvey N.L., Kumar S. 1998. Prodomain-dependent nuclear localization of the caspase-2 (Nedd2) precursor. A novel function for a caspase prodomain. *J. Biol. Chem.* **273**, 24535–24542.
18. Robertson J.D., Enoksson M., Suomela M., Zhivotovsky B., Orrenius S. 2002. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome *c* release during etoposide induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 29803–29809.
19. Paroni G., Henderson C., Schneider C., Brancolini C. 2002. Caspase-2 can trigger cytochrome *c* release and apoptosis from the nucleus. *J. Biol. Chem.* **277**, 15147–15161.
20. Tinel A., Tschopp J. 2004. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science*. **304**, 843–846.
21. Lavrik I.N., Golks A., Baumann S., Krammer P.H. 2006. Caspase-2 is activated at the CD95 death inducing signaling complex in the course of CD95-induced apoptosis. *Blood*. **108**, 559–565.
22. Niizuma K., Endo H., Nito C., Myer D.J., Kim G.S., Chan P.H. 2008. The PIDDosome mediates delayed death of hippocampal CA1 neurons after transient global cerebral ischemia in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 16368–16373.
23. Olsson M., Vakifahmetoglu H., Abruzzo P.M., Hogstrand K., Grandien A., Zhivotovsky B. 2009. DISC-mediated activation of caspase-2 in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*. **28**, 1949–1959.
24. Janssens S., Tinel A., Lippens S., Tschopp J. 2005. PIDD mediates NF-kappaB activation in response to DNA damage. *Cell*. **123**, 1079–1092.
25. Park H.H., Logette E., Raunser S., Cuenin S., Walz T., Tschopp J., Wu H. 2007. Death domain assembly mechanism revealed by crystal structure of the oligomeric PIDDosome core complex. *Cell*. **128**, 533–546.
26. Jang T., Zheng C., Wu H., Jeon J.-H., Park H.H. 2010. *In vitro* reconstruction of the interactions in the PIDDosome. *Apoptosis*. **15**, 1444–1452.
27. Tinel A., Janssens S., Lippens S., Cuenin S., Logette E., Jaccard B., Quadroni M., Tschopp J. 2007. Autoproteolysis of PIDD marks the bifurcation between pro-death caspase-2 and pro-survival NF-kappaB pathway. *EMBO J.* **26**, 197–208.
28. Cuenin S., Tinel A., Janssens S., Tschopp J. 2008. p53-induced protein with a death domain (PIDD) isoforms differentially activate nuclear factor-kappaB and caspase-2 in response to genotoxic stress. *Oncogene*. **27**, 387–396.
29. Berube C., Boucher L.M., Ma W., Wakeham A., Salmena L., Hakem R., Yeh W.C., Mak T.W., Benchimol S. 2005. Apoptosis caused by p53-induced protein with death domain (PIDD) depends on the death adapter protein RAIDD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 14314–14320.
30. Shi M., Vivian C.J., Lee K.J., et al. 2009. DNA-PKcs-PIDDosome: a nuclear caspase-2-activating complex with role in G2/M checkpoint maintenance. *Cell*. **136**, 508–520.
31. Carlsson Y., Wang X., Schwendimann L., Rousset C.I., Jacotot E., Gressens P., Thoresen M., Mallard C., Hagberg H. 2012. Combined effect of hypothermia and caspase-2 gene deficiency on neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatric Res.* **71**, 566–572.
32. Ribe E.M., Jean Y.Y., Goldstein R.L., Manzl C., Stefanis L., Villunger A., Troy C.M. 2012. Neuronal caspase 2 activity and function requires RAIDD, but not PIDD. *J. Biol. Chem.* **444**, 591–599.
33. Pistrutto G., Papaleo V., Sanchez P., Ceci C., Barbaccia M.L. 2012. Divergent modulation of neuronal differentiation by caspase-2 and -9. *PLOS ONE*. **7**, e36002.
34. Oliver T.G., Meylan E., Chang G.P., Xue W., Burke J.R., Humpton T.J., Hubbard D., Bhutkar A., Jacks T. 2011. Caspase-2-mediated cleavage of Mdm2 creates a p53-induced positive feedback loop. *Mol. Cell*. **43**, 57–71.
35. Duan H., Dixit V.M. 1997. RAIDD is a new ‘death’ adaptor molecule. *Nature*. **385**, 86–89.
36. Chen H., Chung S., Sukumar S. 2004. HOXA5-induced apoptosis in breast cancer cells is mediated by caspases-2 and -8. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 924–935.
37. Haas T.L., Emmerich C.H., Gerlach B., et al. 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.
38. Shin S., Lee Y., Kim W., Ko H., Choi H., Kim K. 2005. Caspase-2 primes cancer cells for TRAIL-mediated apoptosis by processing procaspase-8. *EMBO J.* **24**, 3532–3542.
39. Manzl C., Krumschnabel G., Bock F., Sohm B., Labi V., Baumgartner F., Logette E., Tschopp J., Villunger A. 2009. Caspase-2 activation in the absence of PIDDosome formation. *J. Cell Biol.* **185**, 291–303.
40. Vakifahmetoglu H., Olsson M., Orrenius S., Zhivotovsky B. 2006. Functional connection between p53 and caspase-2 is essential for apoptosis induced by DNA damage. *Oncogene*. **25**, 5683–5692.
41. Lassus P., Opitz-Araya X., Lazebnik Y. 2002. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science*. **297**, 1352–1354.
42. Marsden V.S., Ekert P.G., Van Delft M., Vaux D.L., Adams J.M., Strasser A. 2004. Bcl-2-regulated apoptosis and cytochrome *c* release can occur independently of both caspase-2 and caspase-9. *J. Cell Biol.* **165**, 775–780.
43. Vakifahmetoglu H., Olsson M., Tamm C., Heidari N., Orrenius S., Zhivotovsky B. 2008. DNA damage induces two distinct modes of cell death in ovarian carcinomas. *Cell Death Differ.* **15**, 555–566.
44. Vakifahmetoglu-Norberg H., Zhivotovsky B. 2010. The unpredictable caspase-2: what can it do? *Trends Cell. Biol.* **20**, 150–159.
45. Mancini M., Machamer C.E., Roy S., Nicholson D.W., Thornberry N.A., Casciola-Rosen L.A., Rosen A. 2000. Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J. Cell Biol.* **149**, 603–612.
46. Guo Y., Srinivasula S.M., Druilhe A., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E.S. 2002. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J. Biol. Chem.* **277**, 13430–13437.

47. Rotter B., Krovianski Y., Nicolas G., Dhermy D., Lecomte M.C. 2004. AlphaII spectrin is an *in vitro* target for caspase-2, and its cleavage is regulated by calmodulin binding. *J. Biochem.* **378**, 161–168.
48. Guha M., Xia F., Raskett C.M., Altieri D.C. 2010. Caspase-2-mediated tumor suppression involves survivin gene silencing. *Oncogene.* **29**, 1280–1292.
49. Panaretakis T., Laane E., Pokrovskaja K., Bjorklund A.C., Moustakas A., Zhivotovsky B., Heyman M., Shoshan M.C., Dan Grande'r. 2005. Doxorubicin requires the sequential activation of caspase-2, protein kinase C δ , and c-Jun NH2-terminal kinase to induce apoptosis. *Mol. Biol. Cell.* **16**, 3821–3831.
50. Andersen J.L., Thompson J.W., Lindblom K.R., Johnson E.S., Yang C.-S., Lilley L.R., Freel C.D., Moseley M.A., Kornbluth S. 2011. A biotin switch-based proteomics approach identifies 14-3-3 ζ as a target of Sirt1 in the metabolic regulation of caspase-2. *Mol. Cell.* **43**, 834–842.
51. Hermel E., Gafni J., Propp S.S., et al. 2004. Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Cell Death Differ.* **11**, 424–438.
52. Dahal G.R., Karki P., Thapa A., Shah Nawaz M., Shin S.Y., Lee J.S., Cho B., Park I.S. 2007. Caspase-2 cleaves DNA fragmentation factor (DFF45)/inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD). *Arch. Biochem. Biophys.* **468**, 134–139.
53. Gu Y., Sarnecki C., Aldape R.A., Livingston D.J., Su M.S. 1995. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by interleukin-1 beta converting enzyme and its homologs TX and Nedd-2. *J. Biol. Chem.* **270**, 18715–18718.
54. Condorelli F., Salomoni P., Cotteret S., Cesi V., Srinivasula S.M., Alnemri E.S., Calabretta B. 2001. Caspase cleavage enhances the apoptosis-inducing effects of BAD. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3025–3036.
55. Truscott M., Denault J.B., Goulet B., Leduy L., Salvesen G.S., Nepveu A. 2007. Carboxyl-terminal proteolytic processing of CUX1 by a caspase enables transcriptional activation in proliferating cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 30216–30226.
56. Jeon Y.J., Jo M.G., Yoo H.M., Hong S.H., Park J.M., Ka S.H., Oh K.H., Seol J.H., Jung J.K., Chung C.H. 2012. Chemosensitivity is controlled by p63 modification with ubiquitin-like protein ISG15. *J. Clin. Invest.* doi:10.1172/JCI61762.
57. Wagner K.W., Engels I.H., Deveraux Q.L. 2004. Caspase-2 can function upstream of bid cleavage in the TRAIL apoptosis pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 35047–35052.
58. Dorstyn L., Puccini J., Wilson C.H., Shalini S., Nicola M., Moore S., Kumar S. 2012. Caspase-2 deficiency promotes aberrant DNA-damage response and genetic instability. *Cell Death Differ.* **19**, 1288–1298.
59. Tyagi A., Singh R.P., Agarwal C., Agarwal R. 2006. Silibinin activates p53-caspase 2 pathway and causes caspase-mediated cleavage of Cip1/p21 in apoptosis induction in bladder transitional-cell papilloma RT4 cells: evidence for a regulatory loop between p53 and caspase 2. *Carcinogenesis.* **27**, 2269–2280.
60. Zhivotovsky B., Orrenius S. 2010. Cell cycle and cell death in disease: past, present and future. *J. Inter. Med.* **268**, 395–409.
61. Robertson J.D., Gogvadze V., Kropotov A., Vakifahmetoglu H., Zhivotovsky B., Orrenius S. 2004. Processed caspase-2 can induce mitochondria-mediated apoptosis independently of its enzymatic activity. *EMBO J.* **5**, 643–648.
62. Enoksson M., Robertson J.D., Gogvadze V., Bu P., Kropotov A., Zhivotovsky B., Orrenius S. 2004. Caspase-2 permeabilizes the outer mitochondrial membrane and disrupts the binding of cytochrome c to anionic phospholipids. *J. Biol. Chem.* **279**, 49575–49578.
63. Bonzon C., Bouchier-Hayes L., Pagliari L.J., Green D.R., Newmeyer D.D. 2006. Caspase-2-induced apoptosis requires bid cleavage: a physiological role for bid in heat shock-induced death. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2150–2157.
64. Slee E.A., Harte M.T., Kluck R.M., et al. 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.* **144**, 281–292.
65. Franklin E.E., Robertson J.D. 2007. Requirement of Apaf-1 for mitochondrial events and the cleavage or activation of all procaspases during genotoxic stress-induced apoptosis. *Biochem. J.* **405**, 115–122.
66. Bouchier-Hayes L. 2010. The role of caspase-2 in stress-induced apoptosis. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 1212–1224.
67. Tu S., McStay G.P., Boucher L.M., Mak T., Beere H.M., Green D.R. 2006. *In situ* trapping of activated initiator caspases reveals a role for caspase-2 in heat shock-induced apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **8**, 72–77.
68. Milleron R.S., Bratton S.B. 2006. Heat shock induces apoptosis independently of any known initiator caspase-activating complex. *J. Biol. Chem.* **281**, 16991–17000.
69. Pagliari L.J., Kuwana T., Bonzon C., Newmeyer D.D., Tu S., Beere H.M., Green D.R. 2005. The multidomain proapoptotic molecules Bax and Bak are directly activated by heat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 17975–17980.
70. Dahmer M.K. 2005. Caspases-2, -3, and -7 are involved in thapsigargin-induced apoptosis of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res.* **80**, 576–583.
71. Upton J.P., Austgen K., Nishino M., Coakley K.M., Hagen A., Han D., Papa F.R., Oakes S.A. 2008. Caspase-2 cleavage of BID is a critical apoptotic signal downstream of endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 3943–3951.
72. Mahoney D.J., Lefebvre C., Allan K., et al. 2011. Virus-tumor interactome screen reveals ER stress response can reprogram resistant cancers for oncolytic virus-triggered caspase-2 cell death. *Cancer Cell.* **20**, 443–456.
73. Jesenberger V., Procyk K.J., Yuan J., Reipert S., Baccharini M. 2000. Salmonella-induced caspase-2 activation in macrophages: a novel mechanism in pathogen-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.* **192**, 1035–1046.
74. 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., Rajalingam K. 2012. Caspase-2 is an initiator caspase responsible for pore-forming toxin-mediated apoptosis. *EMBO J.* **31**, 2615–2628.

75. Toren F., Holbrook N.J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **408**, 239–247.
76. Kroemer G., Reed J.C. 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* **6**, 513–519.
77. Green D.R., Reed J.C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*. **281**, 1309–1312.
78. Dirsch V.M., Kirschke S.O., Estermeier M., Steffan B., Völlmar A.M. 2004. Apoptosis signaling triggered by the marine alkaloid ascididemin is routed via caspase-2 and JNK to mitochondria. *Oncogene*. **23**, 1586–1593.
79. Madesh M., Zong W.X., Hawkins B.J., Ramasamy S., Venkatachalam T., Mukhopadhyay P., Doonan P.J., Irlin K.M., Rajesh M., Pacher P., Thompson C.B. 2009. Execution of superoxide-induced cell death by the proapoptotic Bcl-2-related proteins Bid and Bak. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 3099–3112.
80. Zhang Y., Padalecki S.S., Chaudhuri A.R., De Waal E., Goins B.A., Grubbs B., Ikeno Y., Richardson A., Mundy G.R., Herman B. 2007. Caspase-2 deficiency enhances aging-related traits in mice. *Mech. Ageing Dev.* **128**, 213–221.
81. Shalini S., Dorstyn L., Wilson C., Puccini J., Ho L., Kumar S. 2012. Impaired antioxidant defence and accumulation of oxidative stress in caspase-2-deficient mice. *Cell Death Differ.* **19**, 1370–1380.
82. Tsatmali M., Walcott E.C., Makarenkova H., Crossin K.L. 2006. Reactive oxygen species modulate the differentiation of neurons in clonal cortical cultures. *Mol. Cell. Neurosci.* **4**, 345–357.
83. Kumar S. 2009. Caspase 2 in apoptosis, the DNA damage response and tumour suppression: enigma no more? *Nat. Rev. Cancer.* **9**, 897–903.
84. Mendelsohn A.R., Hamer J.D., Wang Z.B., Brent R. 2002. Cyclin D3 activates caspase-2, connecting cell proliferation with cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 6871–6876.
85. Andersen J.L., Johnson C.E., Freel C.D., Parrish A.B., Day J.L., Buchakjian M.R., Nutt L.K., Thompson J.W., Moseley M.A., Kornbluth S. 2009. Restraint of apoptosis during mitosis through interdomain phosphorylation of caspase-2. *EMBO J.* **28**, 3216–3227.
86. Sidi S., Sanda T., Kennedy R.D., et. al. 2008. Chk1 suppresses a caspase-2 apoptotic response to DNA damage that bypasses p53, Bcl-2, and caspase-3. *Cell.* **133**, 864–877.
87. Lavin M.F. 2008. Ataxia–telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 759–769.
88. Yang J., Yu Y., Hamrick H.E., Duerksen-Hughes P.J. 2003. ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis.* **24**, 1571–1580.
89. Baptiste-Okoh N., Barsotti A.M., Prives C. 2008. A role for caspase-2 and PIDD in the process of p53-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 1937–1942.
90. Sohn D., Budach W., Jänicke R.U. 2011. Caspase-2 is required for DNA damage-induced expression of the CDK inhibitor p21WAF1/CIP1. *Cell Death Differ.* **18**, 1664–1674.
91. Ho L.H., Taylor R., Dorstyn L., Cakouros D., Bouillet P., Kumar S. 2009. A tumor suppressor function for caspase-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 5336–5341.
92. Johansson B., Mertens F., Mitelman F. 1993. Cytogenetic deletion maps of hematologic neoplasms: circumstantial evidence for tumor suppressor loci. *Genes Chromosomes Cancer.* **8**, 205–218.
93. Kumar S., White D.L., Takai S., Turczynowicz S., Juttner C.A., Hughes T.P. 1995. Apoptosis regulatory gene *NEDD2* maps to human chromosome segment 7q34–35, a region frequently affected in haematological neoplasms. *Hum. Genet.* **95**, 641–644.
94. Adams J.M., Harris A.W., Pinkert C.A., Corcoran L.M., Alexander W.S., Cory S., Palmiter R.D., Brinster R.L. 1985. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature.* **318**, 533–538.
95. Kuroda J., Taniwaki M. 2009. Involvement of BH3-only proteins in hematologic malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **71**, 89–101.
96. Manzl C., Peintner L., Krumschnabel G., Bock F., Labi V., Drach M., Newbold A., Johnstone R., Villunger A. 2012. PIDDosome-independent tumor suppression by caspase-2. *Cell Death Differ.* **19**, 1722–1732. doi: 10.1038/cdd.2012.54.
97. Castedo M., Perfettini J.L., Roumier T., et. al. 2004. Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene.* **23**, 4362–4370.
98. Hofmann W.K., de Vos S., Tsukasaki K., Wachsman W., Pinkus G.S., Said J.W., Koeffler H.P. 2001. Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. *Blood.* **98**, 787–794.
99. Troy C.M., Rabacchi S.A., Hohl J.B., Angelastro J.M., Greene L.A., Shelanski M.L. 2001. Death in the balance: alternative participation of the caspase-2 and -9 pathways in neuronal death induced by nerve growth factor deprivation. *J. Neurosci.* **21**, 5007–5016.
100. Majumder P., Raychaudhuri S., Chattopadhyay B., Bhattacharyya N.P. 2007. Increased caspase-2, calpain activations and decreased mitochondrial complex II activity in cells expressing exogenous huntingtin exon 1 containing CAG repeat in the pathogenic range. *Cell. Mol. Neurobiol.* **27**, 1127–1145.
101. Qin Y., Vanden-Hoek T.L., Wojcik K., Anderson T., Li C.Q., Shao Z.H., Becker L.B., Hamann K.J. 2004. Caspase-dependent cytochrome c release and cell death in chick cardiomyocytes after simulated ischemia reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **286**, 2280–2286.
102. Seth R., Yang C., Kaushal V., Shah S.V., Kaushal G.P. 2005. p53-dependent caspase-2 activation in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and its role in renal tubular epithelial cell injury. *J. Biol. Chem.* **280**, 31230–31239.
103. Zhang Y.Q., Herman B. 2006. ARC protects rat cardiomyocytes against oxidative stress through inhibition of caspase-2 mediated mitochondrial pathway. *J. Cell. Biochem.* **99**, 575–588.