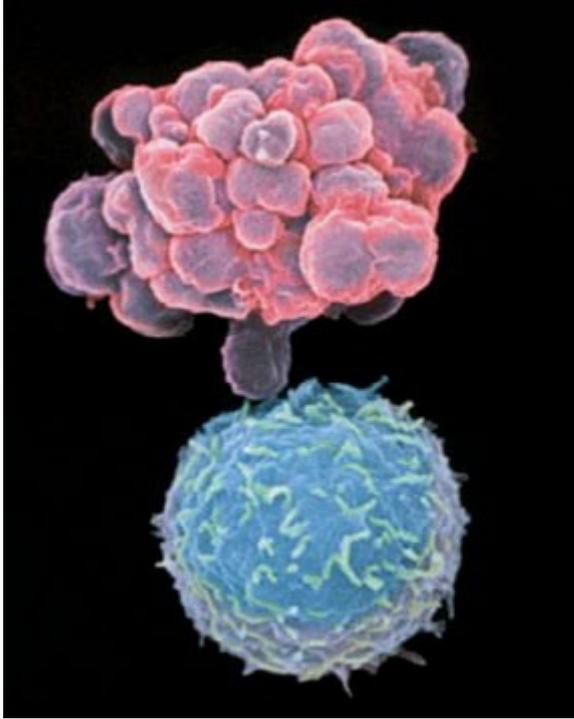


1

Апоптоз



Существует множество определений понятия "апоптоз".

- явление программируемой клеточной смерти, сопровождаемой набором характерных цитологических признаков (маркеров апоптоза) и молекулярных процессов, имеющих различия у одноклеточных и многоклеточных организмов (т.е. изменений в строении и функционировании клетки, характерных для апоптоза).

- форма гибели клетки, проявляющаяся в уменьшении ее размера, конденсации (уплотнении) и фрагментации хроматина, уплотнении наружной и цитоплазматической мембран без выхода содержимого клетки в окружающую среду.

Суть апоптоза заключается в том, что это программируемая клеточная гибель, т.е. существуют определенные механизмы, в результате реализации которых клетка сама завершает свое существование.

В многоклеточном организме апоптозом гибнут клетки в процессе эмбриогенеза, Т-клетки в процессе дифференцировки в тимусе, клетки, зараженные вирусами, измененные клетки (при недостаточной интенсивности апоптотических процессов развиваются онкологические заболевания) и мн. др. Основное биологическое назначение апоптоза состоит в том, чтобы в процессе эмбрионального морфогенеза создавать органы и ткани с эволюционно закрепленными конфигурациями и размерами и затем поддерживать эти параметры с допустимыми допусками в течение жизни. Важнейшим проявлением этой функции апоптоза после окончания развития человека и других млекопитающих является его участие в процессе физиологической регенерации (обновления) клеток разных тканей и органов и поддержании клеточного гомеостаза. Регенерации в разной степени выраженности на протяжении всей жизни подвержены практически все клетки нашего организма. Особенно интенсивно клеточное обновление протекает в клетках эпителия, соприкасающихся с внешней средой, кожи, желудочно-кишечного тракта, мочеполовой и легочной систем, а также в клетках крови, иммунной системы.

Важна роль и в процессах отторжения чужеродных органов и тканей при их трансплантации.

Другой важнейшей функцией апоптоза является контроль за внутренней средой клетки, в том числе клеточного ядра с его содержимым. Правда, сейчас показано, что апоптоз может протекать и в клетках, лишенных ядра. При возникновении в клетке нарушений, превышающие допустимые пределы, клетка подвергается самоуничтожению. Апоптоз возникает при действии различных повреждающих факторов, которые способны вызвать некроз, но действующих в небольших дозах, например, при действии высокой температуры, ионизирующего излучения, противоопухолевых препаратов.

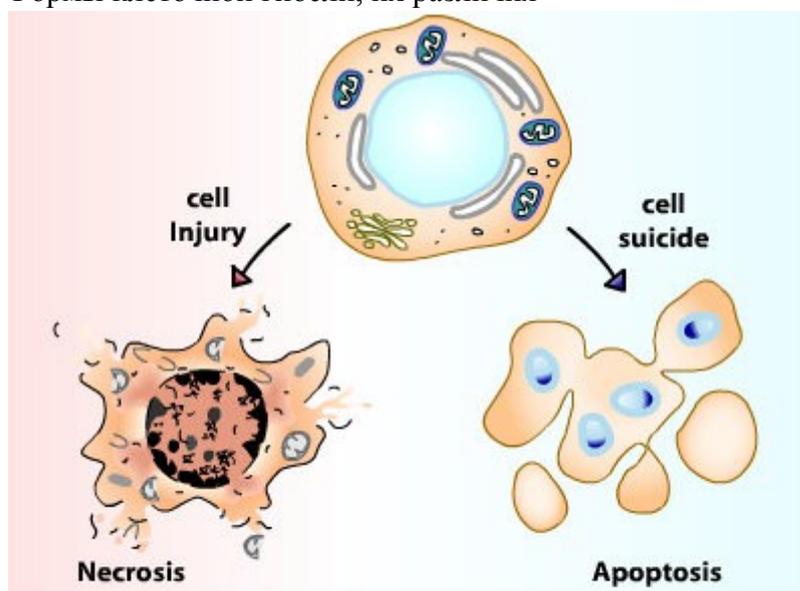
Апоптоз принимает активное участие в ряде физиологических и патологических процессов. Например, при гормон-зависимой инволюции органов у взрослых, в частности, отторжение эндометрия во время менструального цикла, атрезии (заращении) фолликулов в яичниках в менопаузе и регрессии (обратном развитии) молочной железы после прекращения лактации.

Велика роль апоптоза и при патологической атрофии гормон-зависимых органов, например, атрофии предстательной железы после кастрации и истощении лимфоцитов в тимусе при терапии глюкокортикоидами. Или патологической атрофии паренхиматозных органов после обтурации (закупорки) выводных протоков, что наблюдается в поджелудочной и слюнных железах, почках. Гибель клеток в процессе атрофии наблюдается и в коре надпочечников при воздействии глюкокортикоидов или при атрофии эндокрин-зависимых тканей.

Во многих случаях острого или хронического ишемического либо токсического воздействия гибель клеток происходит через апоптоз. Такая картина наблюдается при инсульте, инфаркте не только миокарда, но и в почках, при диабете, отдельных формах нефрита, нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера и Паркинсона. В патогенезе токсических повреждений печени, поджелудочной железы и почек активация апоптоза также имеет важное значение.

2

Формы клеточной гибели, их различия



CELL DEATH: NECROSIS VS. APOPTOSIS

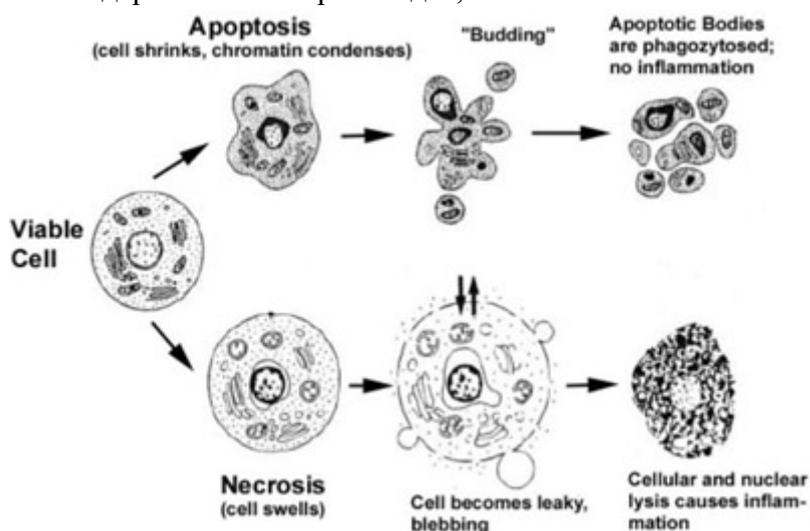
Существует две формы гибели клетки - некроз и апоптоз.

Некроз - это патологический процесс, выражающийся в местной гибели ткани в живом организме в результате какого-либо экзо- (внешнего) или эндогенного (внутреннего) ее повреждения. Некроз проявляется в набухании, денатурации и

коагуляции (слипанию) цитоплазматических белков, разрушении клеточных органелл и, наконец, всей клетки.

Главное отличие некроза и апоптоза состоит в том, что апоптоз - это программируемая гибель клетки, а некроз - это патологический процесс, запускающийся в ответ на какое-либо повреждающее воздействие (инфекция, химическое воздействие, облучение, недостаточное кровоснабжение и т.д.).

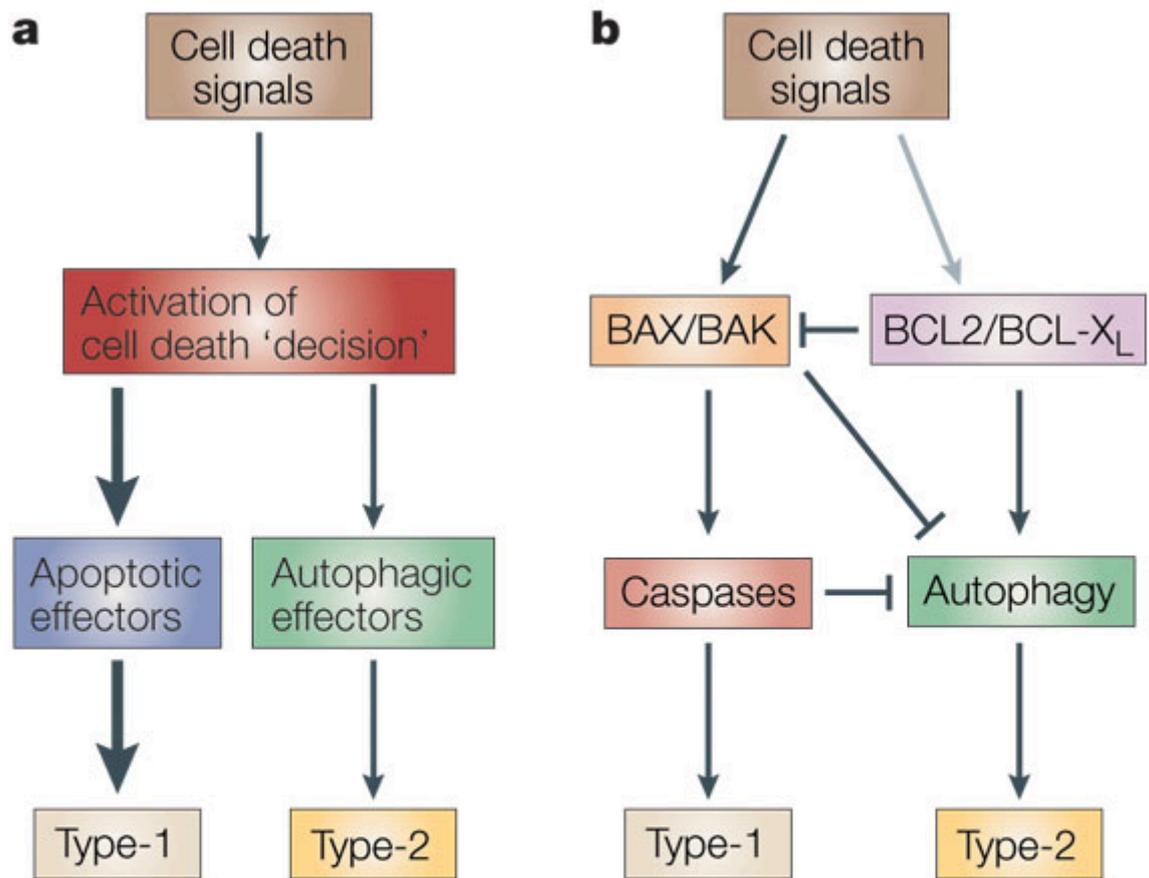
В процессе апоптоза в клетке задействованы сложные молекулярные каскады, в результате реализации которых происходит сморщивание цитоплазматической мембраны, уменьшение объёма клетки, разрывы нитей ядерной ДНК, конденсация хроматина по периферии ядра, последующий распад ядра на части, фрагментация клеток на везикулы (пузырьки) с внутриклеточным содержимым — апоптотические тельца, которые захватываются соседними клетками, могут и фагоцитами, как в случае некроза. Выброса клеточного содержимого не происходит, воспаления не возникает.



При некрозе, наоборот, происходит выход лизосомальных ферментов из лизосом, которые и переваривают содержимое клетки, клетка набухает и лопаётся. Содержимое клетки выбрасывается во внеклеточную среду, где поглощается фагоцитами, развивается воспаление.

Апоптоз- это физиологический процесс, некроз- патологический.

Существуют и другие формы программируемой гибели, например, аутофагия. Процесс аутофагии заключается в том, что органеллы соединяются с лизосомами, где перевариваются лизосомальными ферментами. Затем остатки клетки поглощают макрофаги.

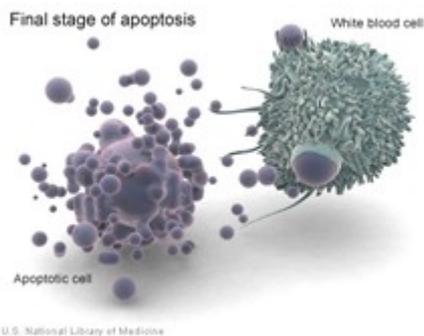


Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

а) - Кинетическая модель баланса апоптоза и аутофагии. Одно из летальных воздействий активирует в клетке программу и клетка "решает умереть". Если достаточно апоптотических эффекторов (молекул, задействованных в процессе апоптоза), то апоптоз является единственным ответом большинства клеток на летальное воздействие. Подавление апоптотических эффекторов запускает альтернативный путь- аутофагию.

б) - Ингибиторная модель. Когда летальное воздействие активирует BAX/BAK-зависимый митохондриальный внемембранный путь (BAX/BAK-dependent mitochondrial outer-membrane permeabilization pathway) запускается апоптоз. BAX/BAK, так же как и каспазы, является активным ингибитором BCL2/BCL-XL, облегчающего аутофагию. Активный апоптоз подавляет аутофагию.

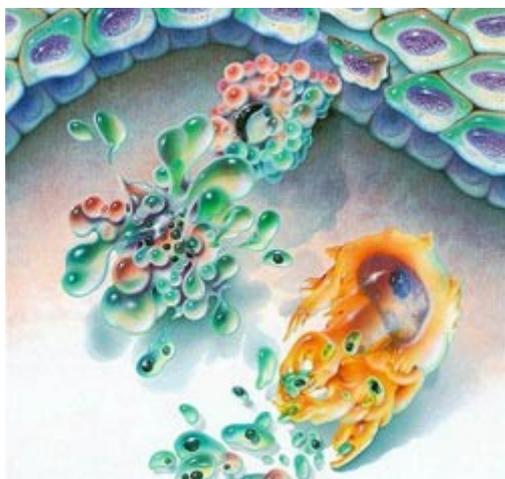
Механизмы апоптоза



Механизмы апоптоза сложны и многообразны, представляют собой самый сложный молекулярный каскад, изучением которого занимаются многие и многие лаборатории по всему миру. Несомненная важность этих исследований в аспекте онкологии и геронтологии доказана успехами терапии онкологических заболеваний индукторами апоптоза раковых клеток.

Так каковы же механизмы.

Поговорим об этом по-подробнее



Первый этап - смертельный приказ

С чего же начинается этот сложный процесс? С того, что клетка получает "приказ умереть", ее гибель необходима для дальнейшей жизнедеятельности организма. Это происходит с помощью сигналов из внеклеточной среды, которые клетка воспринимает с помощью своего рецепторного аппарата. Иногда сигналом для начала апоптоза может быть и отсутствие необходимого сигнала.

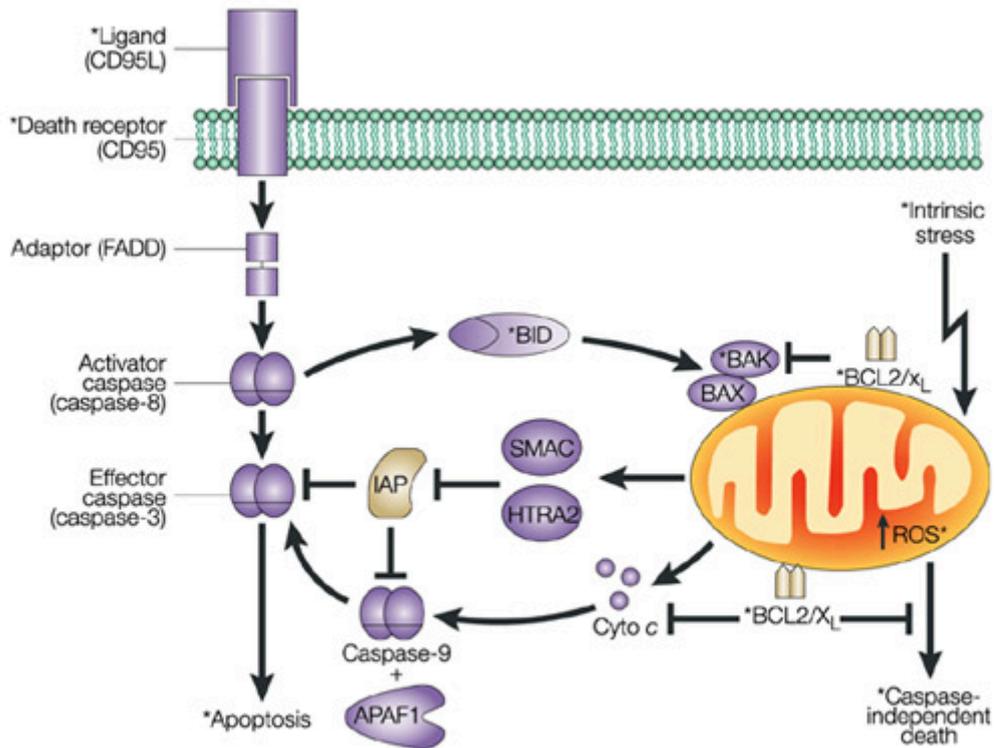
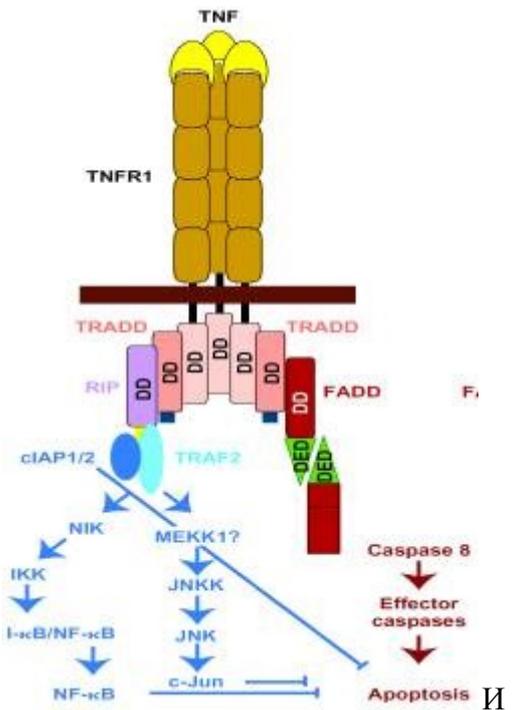
В результате контакта сигнальных молекул с наружной частью белка-рецептора этот рецептор претерпевает структурные изменения. Структурная перестройка захватывает и внутриклеточную часть молекулы рецептора. Она может либо обладать определенной ферментативной активностью сама, либо быть тесно связана с некоторыми клеточными ферментами. Изменение активности рецепторной молекулы приводит к активации фермента.

Часто речь идет об изменении концентрации ионов кальция, а также некоторых относительно мелких фосфорсодержащих органических соединений, относящихся к классу нуклеотидов.

Активные соединения появляются и в результате гидролиза определенных липидов клеточной мембраны. В свою очередь, все это ведет к присоединению или отсоединению остатков фосфата от молекул белковых регуляторов (фосфорилирование), способных влиять на генетический аппарат клетки.

Фосфорилирование и дефосфорилирование (отщепление остатка фосфорной кислоты), а также некоторые другие биохимические модификации меняют активность этих регуляторов.

Рецепторы, воспринимающие "летальный сигнал"



Nature Reviews | Drug Discovery

известны два структурно гомологичных рецептора TNF, p55 и p75 (TNF-RI и TNF-RII, соответственно), относящиеся к трансмембранным белкам I типа. Кроме этого задействованы "рецепторы смерти" CD95. Рецепторы CD95 и рецепторы TNF принадлежат к растущему суперсемейству рецепторов, имеющих гомологию в экстраклеточных доменах. Семейство включает в себя также рецептор фактора роста нервов, В-клеточный антиген CD40, маркер активации Т-лимфоцитов CD27 и некоторые гомологичные белки млекопитающих и вирусов.

CD95 и TNF-R1 имеют дополнительную гомологичную последовательность во внутриклеточной части молекул. Этот трандукции цитотоксического (повреждающего клетку) сигнала. Цитоплазматический С-конец CD95 содержит также "домен спасения", удаление которого усиливает цитотоксическую активность рецептора.

TNF и лиганд CD95 (CD95-L) являются трансмембранными белками второго типа с внеклеточным С-концевым, внутриклеточным N-концевым и одним трансмембранным элементами, но они могут функционировать и в растворимой, "слушенной" с мембраны форме. И CD95-L, и TNF связываются с соответствующим рецепторами в виде тримера, "сшивают" 3 молекулы рецептора, что активирует его для передачи проапоптотического сигнала.

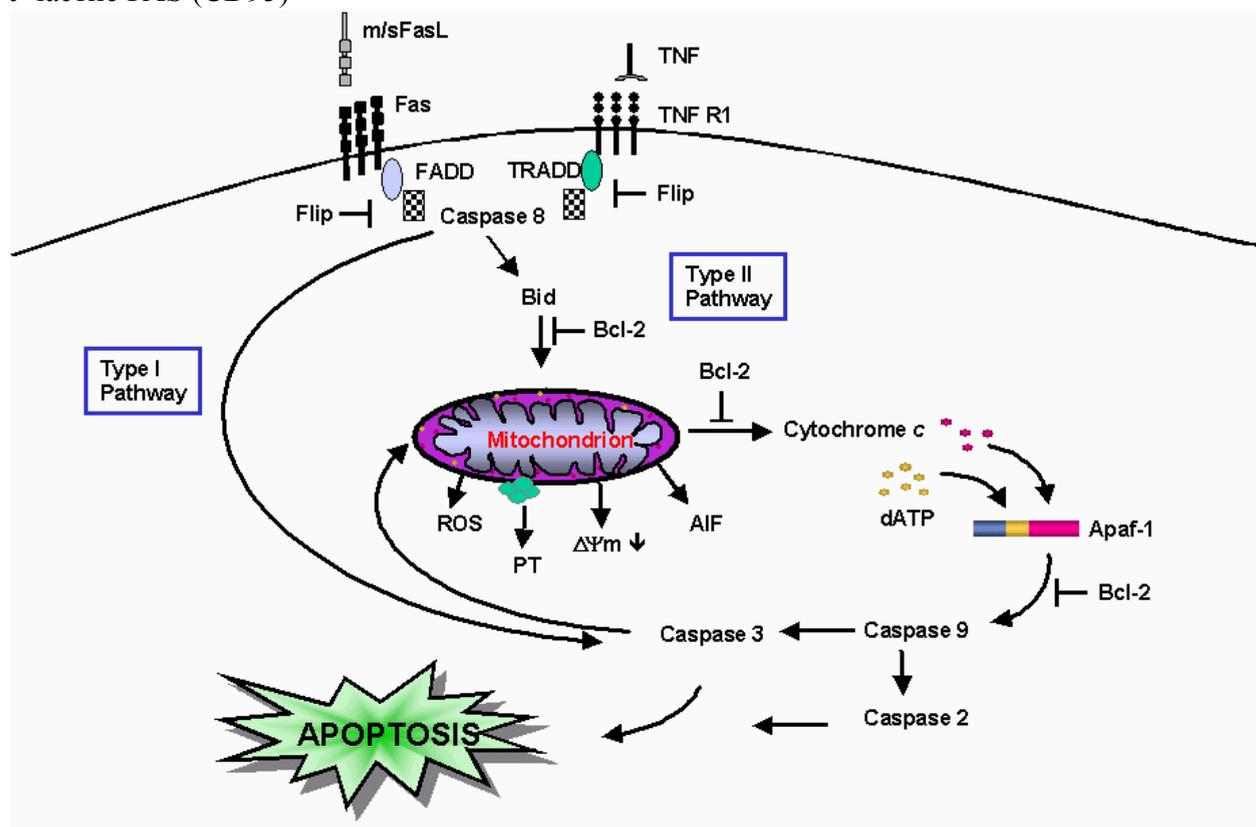
Интенсивные исследования сигнальных механизмов апоптоза, индуцированного антителами к CD95/CD95-L и TNF, привели к значительному прогрессу в двух направлениях - идентификация белков, взаимодействующих с CD95 и TNF-R1, и выяснение участия в процессе вторичного мессенджера церамида.

"Домен смерти" TNF-R1 взаимодействует также с серин/треониновой протеинкиназой и фосфорилируется этим ферментом. 30 С-концевых аминокислотных остатков ингибируют связывание рецептора с протеинкиназой. Роль этих событий в передаче цитотоксического сигнала неясна. Недавно описана тирозиновая фосфатаза, FAP-1, взаимодействующая с 15 С-концевыми аминокислотами CD95, "доменом спасения". Гиперэкспрессия FAP-1 подавляет апоптоз, опосредованный CD95.

Описанные белки участвуют, по-видимому, в начальных этапах передачи сигнала. Другая группа данных свидетельствует о том, что и CD95-L или антитела к CD95, и TNF активируют сфингомиелиновый путь передачи.

Поздние этапы клеточной гибели, индуцированной через CD95 и TNF-R1, таковы же, как при классическом апоптозе. Гибель клеток может быть предотвращена сgmA, что указывает на участие ICE-подобных протеаз. Bcl-2 подавляет апоптоз, индуцированный через CD95 и TNF-R1, по крайней мере на некоторых клеточных линиях.

Участие FAS (CD95)



Этот путь передачи летального сигнала схематически можно изобразить следующим образом: индукторы - рецепторы - адаптеры -каспазы первого эшелона

-регуляторы -каспазы второго эшелона. Так, рецептор, обозначаемый Fas, взаимодействуя с соответствующим лигандом (лигандом FasL), трансмембранным белком Т-киллера, активируется и запускает программу смерти клетки, инфицированной вирусом. Тем же путем при взаимодействии с лигандом FasL на поверхности Th1-лимфоцитов или с антителом к Fas-рецептору погибают ставшие ненужными выздоровевшему организму В-лимфоциты, продуценты антител, несущие Fas-рецептор. FasL – лиганд, относящийся к многочисленному семейству фактора некроза опухолей TNF. Это семейство гомотримерных лигандов (т.е. биологически активных веществ (белков), состоящих из 3 одинаковых доменов (частей), кроме FasL и TNF α , включает TNF β (лимфотоксин).

Fas – член семейства рецепторов TNF. Как говорилось выше, все они представлены трансмембранными белками, которые внеклеточными участками взаимодействуют с тримерами лигандов-индукторов. Взаимодействие рецептора и лиганда приводит к образованию кластеров рецепторных молекул и связыванию их внутриклеточных участков с адаптерами. Адаптер, связавшись с рецептором, вступает во взаимодействие с эффекторами, пока еще неактивными предшественниками протеаз из семейства каспаз первого эшелона (инициирующих каспаз).

Взаимодействие адаптера с рецептором и эффектором осуществляется через гомофильные белок-белковые взаимодействия небольших доменов: DD (death domain – домен смерти), DED (death-effector domain – домен эффектора смерти), CARD (– домен активации и рекрутирования каспазы). Все они имеют сходную структуру, содержат по шесть α -спиральных участков. Домены DD(домен смерти) участвуют во взаимодействии рецептора Fas с адаптером FADD (Fas-associated DD-protein). Домены DED участвуют во взаимодействии адаптера FADD с прокаспазами 8 и 10.

Наиболее подробно охарактеризована прокаспазы-8, рекрутируемая рецептором Fas через адаптер FADD. Образуются агрегаты FasL – Fas – FADD – прокаспазы-8. Подобные агрегаты, в которых происходит активация каспаз, названы апоптосомами, апоптозными шаперонами, или сигнальными комплексами, индуцирующими смерть.

Прокаспазы обладают незначительной протеолитической активностью, составляющей 1–2% активности зрелой каспазы. Будучи в мономерной форме, прокаспазы, концентрация которых в клетке ничтожна, находятся в латентном состоянии. Предполагается, что пространственное сближение молекул прокаспаз при их агрегации ведет к образованию активных каспаз через механизм протеолитического само- и перекрестного расщепления (ауто- или транс-процессинга)]. В результате от прокаспазы (молекулярная масса 30–50 кДа) отделяется регуляторный N-концевой домен (продомен), а оставшаяся часть молекулы разделяется на большую (~20 кДа) и малую (~10 кДа) субъединицы (рис. 3). Затем происходит ассоциация большой и малой субъединиц. Два гетеродимера образуют тетрамер с двумя каталитическими участками, действующими независимо друг от друга. Таким образом прокаспазы-8 активируются и высвобождаются в цитоплазму в виде каспазы-8. Существуют другие пути активации каспазы-8 – с участием рецепторов TNFR1 и DR3.

На этапе активации каспаз первого эшелона жизнь клетки еще можно сохранить. Существуют регуляторы, которые блокируют или, напротив, усиливают разрушительное действие каспаз первого эшелона. К ним относятся белки Bcl-2 (ингибиторы апоптоза: A1, Bcl-2, Bcl-W, Bcl-XL, Bcl-1, Mcl-1 и NR13) и Bax (промоторы апоптоза: Bad, Bak, Bax, Bcl-XS, Bid, Bik, Bim, Hrk, Mtd). Эти белки эволюционно консервативны: гомолог Bcl-2 обнаружен даже у губок, у которых апоптоз необходим для морфогенеза.

Каспазы-8 активирует каспазу второго эшелона (эффекторную каспазу): путем протеолиза из прокаспазы-3 образуется каспаза-3, после чего процесс, запущенный программой смерти, оказывается необратимым.

Каспазы-3 способна в дальнейшем к самостоятельной активации (автокатализу или автопроцессингу), активирует ряд других протеаз семейства каспаз, активирует фактор

фрагментации ДНК, ведет к необратимому распаду ДНК на нуклеосомальные фрагменты. Так запускается каскад протеолитических ферментов, осуществляющих апоптоз.

9

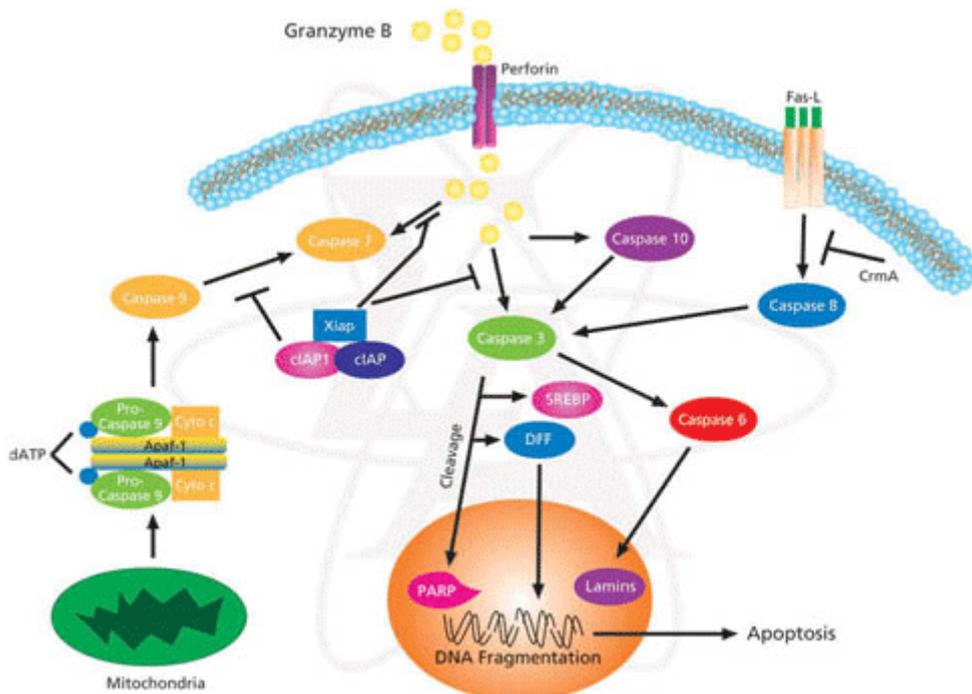
Каспазы

Каспазы-семейство эволюционно консервативных сериновых протеаз, которые специфически расщепляют белки после остатков аспарагиновой кислоты .

На основе структурной гомологии каспазы подразделяются на подсемейства

- каспазы-1 (каспазы 1, 4, 5),
- каспазы-2 (каспаза-2) и
- каспазы-3 (каспазы 3, 6–10) .

Цистеиновые протеазы, по-видимому, участвуют также в программированной клеточной гибели у растений . Однако апоптоз возможен и без участия каспаз: сверхсинтез белков-промоторов апоптоза ВАХ и ВАК индуцирует гибель в присутствии ингибиторов каспаз.



В результате действия каспаз происходит:

1. Активация прокаспаз с образованием каспаз;

2. Расщепление антиапоптозных белков семейства Bcl-2. Подвергается протеолизу ингибитор ДНКазы, ответственный за фрагментацию ДНК. В нормальных клетках апоптозная ДНКаза CAD (caspase-activated DNase) образует неактивный комплекс с ингибитором CAD, обозначаемым ICAD или . При апоптозе ингибитор ICAD с участием каспаз 3 или 7 инактивируется , и свободная CAD, вызывая межнуклеосомальные разрывы хроматина, ведет к образованию фрагментов ДНК с молекулярной массой, кратной молекулярной массе ДНК в нуклеосомных частицах – 180-200 пар нуклеотидов.

Апоптоз возможен и без фрагментации ДНК . Обнаружен ядерный белок Acinus (apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus), из которого при комбинированном действии каспазы-3 (протеолиз при Asp 1093) и неидентифицированной протеазы (протеолиз при Ser 987) образуется фрагмент Ser 987 – Asp 1093. Этот фрагмент в присутствии дополнительных неядерных факторов вызывает апоптотическую конденсацию хроматина и фрагментацию ядра (кариорексис) без фрагментации ДНК ;

3. Гидролиз белков ламинов, армирующих (укрепляющих) ядерную мембрану. Это ведет к конденсации хроматина;

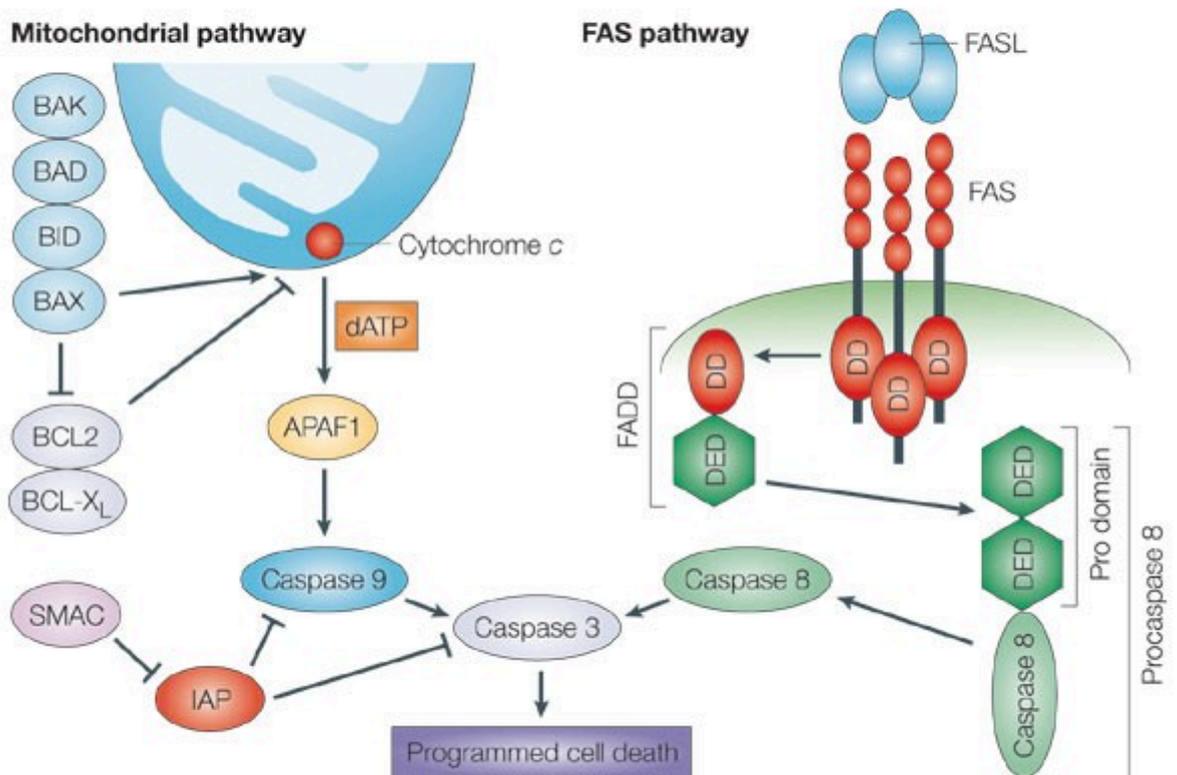
4. Разрушение белков, участвующих в регуляции цитоскелета;

5. Инактивация и нарушение регуляции белков, участвующих в репарации ДНК, сплайсинге мРНК, репликации ДНК.

Мишенью каспаз является поли(ADP-рибозо)полимераза (PARP). Этот фермент участвует в репарации ДНК, катализируя поли(ADP-рибозилирование) белков, связанных с ДНК. Донором ADP-рибозы является NAD^+ . Активность PARP возрастает в 500 раз и более при связывании с участками разрыва ДНК. Апоптотическая гибель клетки сопровождается расщеплением PARP каспазами. Чрезмерная активация PARP при массивных разрывах ДНК, сильно снижая содержание внутриклеточного NAD^+ , ведет к подавлению гликолиза и митохондриального дыхания и вызывает гибель клетки по варианту некроза.

10

Митохондриальный путь



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

В клетках, подвергшихся воздействию индуктора апоптоза, резко снижается мембранный потенциал ($\Delta\psi$) митохондрий. Падение $\Delta\psi$ обусловлено увеличением

проницаемости внутренней мембраны митохондрий вследствие образования гигантских пор . Разнообразны факторы, вызывающие раскрытие пор . К ним относятся истощение клеток восстановленным глутатионом, NAD(P)H, АТФ и АДФ, образование активных форм кислорода, разобщение окислительного фосфорилирования протонными соединениями, увеличение содержания Ca^{2+} в цитоплазме. Образование пор в митохондриях можно вызвать церамидом, NO, каспазами, амфипатическими пептидами, жирными кислотами . Поры имеют диаметр 2,9 нм, позволяющий пересекать мембрану веществам с молекулярной массой 1,5 кДа и ниже. Следствием раскрытия поры является набухание митохондриального матрикса, разрыв наружной мембраны митохондрий и высвобождение растворимых белков межмембранного объема . Среди этих белков – ряд апоптогенных факторов: цитохром С , прокаспазы 2, 3 и 9 , белок АИФ (apoptosis inducing factor), представляющий собой флавопротеин с молекулярной массой 57 кДа.

Образование гигантских пор не является единственным механизмом выхода межмембранных белков митохондрий в цитоплазму. Предполагается , что разрыв наружной мембраны митохондрий может быть вызван гиперполяризацией (переход заряда в отрицательную область) внутренней мембраны. Возможен и альтернативный механизм, без разрыва мембраны, – раскрытие гигантского белкового канала в самой наружной мембране, способного пропускать цитохром С и другие белки из межмембранного пространства .

Высвобождаемый из митохондрий цитохром с вместе с цитоплазматическим фактором АРАФ-1 (apoptosis protease activating factor-1) участвует в активации каспазы-9 .

АРАФ-1 – белок с молекулярной массой 130 кДа, содержащий CARD-домен (caspase activation and recruitment domain) образует комплекс с прокаспазой-9 в присутствии цитохрома с и dАТФ или АТФ. Из этих субъединиц собираются жесткие, симметричные структуры, наподобие веера или пропеллера .АРАФ-1 играет роль арматуры, на которой происходит аутокаталитический процессинг каспазы-9 . Предполагается, что в результате зависимо от гидролиза dАТФ (или АТФ) конформационного изменения АРАФ-1 приобретает способность связывать цитохром С. Связав цитохром с, АРАФ-1 претерпевает дальнейшее конформационное изменение, способствующее его олигомеризации и открывающее доступ CARD-домена АРАФ-1 для прокаспазы-9, которая тоже содержит CARD-домен. Так образуется конструкция, называемая тоже апоптосомой, с молекулярной массой > 1,3 млн дальтон, в составе которой – не менее 8 субъединиц АРАФ-1 . Благодаря гомофильному CARD-CARD-взаимодействию с АРАФ-1 в эквимольном соотношении связывается прокаспаза-9, а затем прокаспаза-9 связывает прокаспазу-3. Пространственное сближение молекул прокаспазы-9 на мультимерной арматуре из АРАФ-1-цитохром-с-комплексов, по-видимому, приводит к межмолекулярному протеолитическому процессингу (модификации) прокаспазы-9 с образованием активной каспазы-9. Зрелая каспаза-9 затем расщепляет и активирует прокаспазу-3.

Флавопротеин АИФ, будучи добавленным к изолированным ядрам из клеток HeLa, вызывает конденсацию хроматина и фрагментацию ДНК, а при добавлении к изолированным митохондриям печени крыс – высвобождение цитохрома с и каспазы- АИФ является митохондриальным эффектором гибели клеток у животных, действующим независимо от каспаз .

Кроме рассмотренных компонентов, при нарушении наружной мембраны митохондрий из межмембранного объема выделяется термочувствительный фактор, вызывающий необратимое превращение ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу . Ксантиндегидрогеназа катализирует зависимое от NAD⁺ окисление ксантина до гипоксантина и последующее окисление гипоксантина до мочевой кислоты. Ксантиноксидаза катализирует те же реакции, но не с NAD⁺, а с O₂ в качестве акцептора электронов. При этом образуются O₂A, H₂O₂, а из них – и другие активные формы кислорода (АФК), которые разрушают митохондрии и являются мощными индукторами

апоптоза. Механизмы образования АФК, конечно, не ограничиваются ксантиноксидазной реакцией. Главным источником АФК в клетках являются митохондрии. Резкое увеличение АФК происходит при возрастании мембранного потенциала в митохондриях, когда снижено потребление АТФ и скорость дыхания лимитируется АДФ. Цитоплазматическая мембрана макрофагов и нейтрофилов содержит O_2A – генерирующую NADPH-оксидазу.

В зависимости от пути, по которому осуществляется активация каспаз, различают разные типы клеток. Клетки типа I (в частности, линия лимфобластоидных В-клеток SKW и Т-клетки линии Н9) подвергаются ПКС по пути, зависимому от апоптозных рецепторов плазматической мембраны без участия митохондриальных белков. Клетки типа II (например, линии Т-клеток Jurkat и СЕМ) погибают по пути апоптоза, зависимому от митохондриального цитохрома С. Гибель клеток, вызванная химиотерапевтическими соединениями, УФ- или γ -облучением, по-видимому, напрямую связана с апоптозной функцией митохондрий.

Некоторые клетки, например, клетки эмбриональной нервной системы, включают механизмы апоптоза, если они испытывают дефицит апоптозподавляющих сигналов (называемых также факторами выживания) от других клеток. Физиологический смысл процесса – в элиминации избыточных нервных клеток, конкурирующих за ограниченный фонд факторов выживания. Эпителиальные клетки при отделении от внеклеточного матрикса, вырабатывающего факторы выживания, тоже обречены на смерть. Факторы выживания связываются соответствующими цитоплазматическими рецепторами, активируя синтез подавляющих апоптоз агентов и блокируя стимуляторы апоптоза. Некоторые вещества (например, стероидные гормоны) оказывают дифференцированный эффект на различные типы клеток – предотвращают апоптоз одних типов клеток и индуцируют его у других. Так, при наличии во внеклеточном матриксе факторов роста PDGF (platelet-derived growth factor – тромбоцитарный фактор роста) или NGF (nerve growth factor – фактор роста нервов) и цитокина интерлейкина-3 (IL-3) проапоптозный белок Bad не активен. Факторы роста, связавшись со своим рецептором на плазматической мембране, вызывают активацию цитозольной протеинкиназы В, и катализирующей фосфорилирование Bad по Ser-136. IL-3 тоже связывается со своим рецептором на плазматической мембране и активирует митохондриальную cAMP-зависимую протеинкиназу А, катализирующую фосфорилирование Bad по Ser-112. Будучи фосфорилированным по обоим остаткам серина, Bad образует комплекс с белком 14-3-3, располагающийся в цитоплазме. Дефицит факторов роста и IL-3 воспринимается клеткой как сигнал к апоптозу: происходит дефосфорилирование Bad, его внедрение в наружную мембрану митохондрий, выход цитохрома С из митохондрий и последующая активация каспазы-9 через АРАФ-1-зависимый механизм.

11

Другие пути

В ряде случаев апоптоз реализуется в результате комбинированного действия двух путей – с участием и рецепторов плазматической мембраны, и митохондриального цитохрома С. Так, повреждение ДНК ведет к накоплению в клетке белкового продукта гена p53, который может останавливать деление клеток и/или индуцировать апоптоз.

Белок p53 является фактором транскрипции, регулирующим активность ряда генов. Предполагается, что ответная реакция на образование белка p53 зависит от степени нарушения клеточного генома. При умеренном нарушении генома происходит остановка клеточного деления, осуществляется репарация ДНК, и клетка продолжает свое существование. При чрезмерном нарушении генома, когда ДНК уже не поддается репарации, включаются рецепторный и цитохром С-зависимый апоптозные каскады активации каспаз.

Также Существует путь передачи летального сигнала с участием эндоплазматического ретикулума (ЭР) . В ЭР локализована прокаспаза-12. Нарушение внутриклеточного Ca^{2+} -гомеостаза добавкой тапсигаргина или Ca^{2+} -ионофорного антибиотика A23187 ведет к апоптозу клеток, вызванному превращением прокаспазы-12 в каспазу-12. ЭР-зависимый апоптоз связан с болезнью Альцгеймера.

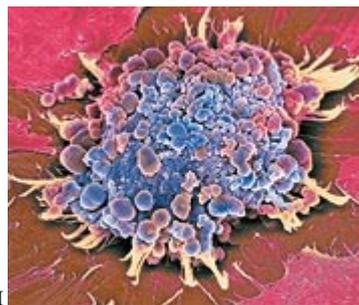
Цитотоксические лимфоциты, Т-киллеры, могут вызывать апоптоз у инфицированных клеток с помощью белка перфорина. Полимеризуясь, перфорин образует в цитоплазматической мембране клетки-мишени трансмембранные каналы, по которым внутрь клетки поступают TNF α , гранзимы (фрагментины) – смесь сериновых протеаз. Существенным компонентом этой смеси является гранзим В – протеолитический фермент, превращающий прокаспазу-3 в активную каспазу-3.

Взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом осуществляется с помощью интегринов. Интегрины – большое семейство гетеродимерных мембранных белков, которые участвуют в адгезии клеток, связывая внутриклеточный цитоскелет с лигандами внеклеточного матрикса. Нарушение адгезии клеток индуцирует апоптоз.

Особую форму апоптоза претерпевают эритроциты млекопитающих. Биогенез эритроцитов из плюрипотентной стволовой клетки в костном мозге включает ряд промежуточных этапов. На этапе эритробласта ядро изгоняется (выталкивается) из клетки и пожирается макрофагом . Альтернативный вариант: кариорексис (деструкция ядра) с образованием телец Жолли (остатки хроматина) и их последующий распад и лизис внутри клетки . Безъядерная клетка, называемая ретикулоцитом, в дальнейшем теряет митохондрии и рибосомы и превращается в эритроцит. Потерю ядра эритробластом можно рассматривать как особую форму ядерного апоптоза. Выяснение его механизма позволило бы применить его для обезвреживания опухолевых клеток.

12

Механизм апоптоза



13Второй этап- активация генов...а затем конец

На втором этапе запрограммированной смерти клеток внутриклеточные регуляторы, получив важные инструкции, вносят поправки в работу отдельных генов. Работа эта, как известно, заключается в образовании РНК, а затем и белков. Таким образом, в результате срабатывания генетической программы, первоначально запущенной сигналом с рецептора, происходит изменение набора внутриклеточных РНК и белков. В конечном счете появляются или активируются ферменты - протеазы и нуклеазы.

Ферменты расщепляют содержимое клетки, которое затем поглощается фагоцитами.

Апоптоз и старение

Известный американский ученый Л.Хейфлик в Медицинском центре детской больницы Северной Каролины впервые доказал, что естественная продолжительность

жизни человека обусловлена числом митозов, которое могут совершить клетки данного организма. Он брал кусочки кожи от эмбриона, новорожденного и взрослого человека, разбивал их на отдельные клетки и культивировал в специальной питательной среде. Оказалось, что клетки эмбриона могут совершить около 50 делений, а затем в них наблюдаются все признаки апоптотической смерти. У взрослого человека клетки могли совершить уже не 50 а гораздо меньше делений, в зависимости от возраста обследуемого пациента. Впоследствии было показано, что механизм старческого апоптоза запускается и находится в ядре.

В настоящее время для объяснения молекулярно-генетических механизмов старения организма предложено три гипотезы.

1. Первая гипотеза особенно отчетливо развита в трудах профессора Ж. Медведева, а также Л. Орджелом из Института им. Солка в США. Эти исследователи считают, что старение это процесс накопления ошибок в процессах транскрипции и трансляции и возникновении ферментов с дефектным функционированием. При этом механизмы репарации не могут справиться со все возрастающим количеством дефектов.

2. Согласно второй гипотезе, предложенной также Ж. Медведевым 0,4% информации содержащейся в ДНК клеточного ядра, используется клеткой постоянно на протяжении ее жизни. Кроме того, многие гены в молекуле ДНК повторяются, делая генетическую информацию в высокой степени избыточной. Ж. Медведев предположил, что повторяющиеся последовательности обычно репрессированы, но в случае значительного повреждения активного гена он заменяется одним из идентичных резервных генов. Избыточность ДНК может, следовательно, служить гарантией против внутренне присущей подверженности системы случайным молекулярным повреждениям. Однако постепенно весь резерв генов будет исчерпан и тогда начинают возникать патологические изменения, которые приведут к гибели клетки. Таким образом чем больше избыточной ДНК, тем больше продолжительность жизни данного вида.

3. Третья гипотеза постулирует, что возрастные изменения представляют собой продолжение нормальных генетических сигналов, регулирующих развитие животного от момента его зачатия до полового созревания. Быть может даже есть "гены старения" которые замедляют или даже закрывают биохимические пути один за другим и ведут к предсказуемым возрастным изменениям. При этом снижаются функциональные возможности клеток. Старение организма - это по существу старение и апоптоз ключевых клеток, гибель которых способна повлиять на физиологию всего организма.

В процессе старения происходит постоянное уменьшение числа неделящихся клеток, например нейронов. Согласно одной из теорий старения, в организме происходит накопление "поломок" - поломки ДНК, накопление токсических продуктов и т.д. В результате этого клетки гибнут.

В 1982 году С.Р. Уманский предложил гипотезу, согласно которой старение может быть следствием плеiotропного эффекта группы генов, несущих информацию о запрограммированной гибели клетки (апоптозе). С одной стороны, эта программа необходима для развития и функционирования многоклеточного организма. Вместе с тем она делает неизбежной гибель клеток у взрослого организма. В таком случае старение является следствием постепенной убыли функционально активных клеток (Уманский, 1982).

До сих пор идут дискуссии о роли апоптоза в процессе старения. Часть исследователей во главе с академиком Скулачевым являются сторонниками теории клеточного апоптоза. Старение, с точки зрения Скулачева, – результат того, что в организме гибнет больше клеток, чем рождается, а отмирающие функциональные клетки

заменяются соединительной тканью. Суть его работы – поиск методов противодействия разрушению клеточных структур свободными радикалами. По мнению ученого, старость – это болезнь, которую можно и нужно лечить, программу старения организма можно вывести из строя и тем самым выключить механизм, сокращающий нашу жизнь.

Некоторые ученые, например, Бойко, критикуют теорию Скулачева. В частности сам Бойко является автором астроцитарной теории старения.

15

Исследования и перспективы

Как упоминалось выше, сейчас по всему миру идут интенсивные исследования апоптоза. В основном это связано с онкологией- индукция апоптоза раковых клеток. Но этим все не ограничивается. В настоящее время идет разработка методов подавления возрастзависимого апоптоза в постмитотических и слабопролиферирующих тканях.

На первом месте среди причин смерти в большинстве стран стоят сердечно-сосудистые заболевания. Практически все пожилые люди страдают ими. Сердечная недостаточность, являющаяся конечным этапом сердечно-сосудистых заболеваний, приводит к недостаточному кровоснабжению органов, патологическим изменениям в них, т.е. в конечном итоге- к ускорению процесса износа организма- к ускорению процесса старения. При ишемии миокарда и его последующей реперфузии кардиомиоциты гибнут апоптозом. Китайские ученые Lv X, Wan J, Yang J, Cheng H, Li Y, Ao Y, Peng R провели исследование, в результате которого было определено, что селективные ингибиторы цитохром P450-омега гидроксилазы, которая индуцирует апоптоз кардиомиоцитов, снижают гибель кардиомиоцитов после ишемии и последующей реперфузии. Подобные исследования были проведены в отношении DIDS (4,4'-диизотиоцианостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота), который снижает Staurosporine-индуцируемый апоптоз кардиомиоцитов, проходящий через PI3K/Akt-сигнальный путь апоптоза, с помощью активации NO-синтазы и подавления транслокации BAX.

Также проводились исследования на клетках эндотелия (эндотелий- выстилка сосудов) в условиях гипоксии и гиперхолестеринемии (повышенного содержания холестерина в крови), нейронах, хондроцитах и т.д. Т.е. в условиях, близких к возрастным изменениям в человеческом организме- ишемическая болезнь сердца, заболевания нервной системы и опорно- двигательного аппарата. Необходимо расширить изучение этой проблемы, перейти от экспериментов на животных к исследованиям на людях, т.к. перспективы этого направления исследований огромны- это возможность продлить жизнь, продлить активные годы, улучшить качество жизни.

Другой задачей для ученых должно стать исследование возможности индукции апоптоза нерепарирующихся клеток на ранних стадиях развития совместно с компенсаторной пролиферацией для замедления последующего старения тканей. (Москалев, 2007)

Необходимо переходить от дрозофил к людям, от изучения механизмов к практическим разработкам в целях борьбы со старением.