**Лекция 5. Способы и механизмы программируемй клеточной гибели (апоптоз, аутофагия).**

Программированная гибель клеток привлекает к себе внимание многочисленных исследователей уже более тридцати лет, прежде всего, по двум причинам. Во-первых, она играет важную роль в морфогенетических процессах и в регуляции численности клеток на протяжении всего онтогенетического развития многоклеточного организма. Во-вторых, обнаружено, что возникновение многих тяжелых заболеваний связано с такими нарушениями программы клеточной гибели, при которых клетки либо перестают погибать, и тогда возможно возникновение опухолей, либо гибель захватывает избыточное число клеток, что в свою очередь приводит к патологической дегенерации тканей и органов.

 По другим данным в составе программированной клеточной гибели (ПКГ) выделяют несколько типов: апоптоз, аутофагическую гибель и программированный некроз (Ogier Denis, Codagno, 2003; Edinger, Thompson, 2004). В свою очередь, апоптоз может быть подразделен на апоптоз одноядерных клеток и митотическую катастрофу. Последняя при этом подразделяется на апоптоз собственно в митозе и апоптоз полиплоидных клеток, образовавшихся в результате патологического митоза.

Апоптоз — программируемая гибель клеток — естественный процесс, предназначенный для элиминации поврежденных клеток либо клеток, «не нужных» по программе морфогенеза и индивидуального развития организма.

Важной особенностью апоптоза, отличающей его от некроза, является отсутствие воспалительной реакции соседних клеток на продукты распада, так как деградирующая клетка сохраняет целостность мембраны до конечных

стадий процесса, а затем подвергается фагоцитозу.

 К характерным признакам апоптоза принято относить: дегидратационное сжатие клеток, утрату межклеточных контактов, блеббинг, разрушение цитоскелета, конденсацию хроматина, фрагментацию ядер и деградацию ДНК .

Чаще всего идентификацию апоптоза проводят по морфологическим признакам, а также регистрируя интернуклеосомные разрывы ДНК на электрофореграммах и определяя активность каспаз. При работе с живыми

клетками широко используется мечение аннексином V, выявляющим появление фосфатидилсерина на внешней стороне плазматической мембраны в процессе апоптоза.

В зависимости от типа клеток, их состояния и вида индуктора основные признаки апоптоза могут варьировать, а некоторые могут вовсе отсутствовать, как это происходит, например, при апоптозе безъядерных эритроцитов.

При более строгом подходе необходимо учитывать, что критерием апоптоза может быть только комплекс признаков.

Сигнальные пути при апоптозе

Общая схема запуска и развития апоптоза представлена на рис. 1. Апоптоз может быть вызван как внешними, так и эндогенными сигналами, к важнейшим из которых относится повреждение ДНК. Апоптоз — сложный многостадийный процесс, в котором существенную роль играют каспазы — семейство эволюционно консервативных протеаз. В нормальном состоянии каспазы присутствуют в клетке в неактивной форме, как проензимы. Различают два вида каспаз — «инициирующие» и «эффекторные». К первым

относятся каспазы 8, 9, 10 и 12, которые после активации действуют на эффекторные каспазы 3, 6, 7 и 14. Каспаза 2 обладает как инициирующими, так и эффекторными функциями. Мишени эффекторных каспаз многообразны: например, для каспазы 3 это могут быть фактор фрагментации ДНК DFF-45, гельзолин, PARP-полимераза или PAK2-киназа

(Janicke et al., 1998). Только на этапе активации инициирующих каспаз апоптоз обратим.

Механизмы активации инициирующих каспаз могут быть различными. Рцепторный путь запуска каспазного каскада начинается с активации одного из расположенных на клеточной мембране рецепторов, воспринимающих

внешний сигнал, например Fas/CD95, TNF, DR-4, DR-5 и т. п.

В случае рецептора Fas его активация одноименным лигандом либо антителами ведет к присоединению к рецептору адаптора FADD (Fas-associated protein with death domain). FADD в свою очередь связывается с прокаспазой 8, что приводит к активации каспазы 8, которая затем активирует прокаспазу 3 (рис. 3). Такой тип передачи сигнала имеет место, например, у лимфоидных клеток.У других клеток активации каспазы 8 недостаточно для активации прокаспазы 3.

В случае митохондриального пути запуска каспазного каскада ключевым звеном является изменение состояния митохондрий, при котором снижается мембранный потенциал на внутренней мембране, в ней образуются гигантские поры, матрикс набухает, разрывается наружная мембрана, из митохондрий выходит ряд белков, в частности цитохром *c.* Последний в комбинации с фактором Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) и прокаспазой 9 образует так называемый апоптосомный комплекс, в котором

прокаспаза превращается в каспазу 9. Далее каспаза 9 активирует каспазу 3. Рецепторный и митохондриальный пути активации каспазного каскада сходятся на стадии активации какой-либо эффекторной каспазы. Так, например, каспаза 3 или 7, действуя на комплекс ДНКазы CAD (caspase activated DNase) с ингибитором DFF-45/ICAD, отщепляет и инактивирует последний.



Рис. 3. Схема передачи сигналов при апоптозе (по: Hengartner, 2000, с дополнениями).

CD95—рецептор, расположенный на клеточной мембране; FADD—(Fas-associated protein with death domain)—адаптер; Bid, Bcl-XL, Bcl-2, Bax—

белки семейства Bcl-2; p53—белок-супрессор развития опухолей; Apaf-1—фактор активации протеаз; AIF—фактор индукции апоптоза; цитохром

*c* — белок митохондриальной электрон-транспортной цепи.

Свободная CAD вызывает межнуклеосомные разрывы ДНК и образование фрагментов в 180—200 пар оснований. Один из белков семейства Bcl-2 —

промотор апоптоза Bid — также может связывать рецепторный и митохондриальный пути.

Митохондрии являются ключевым звеном в передаче сигнала во время апоптоза, связанного с повреждением ДНК при действии на клетку разного рода факторов, в частности радиации, активных форм кислорода, высокой температуры (Beere, 2004) и др.

Важную роль при этом играет белок p53. Отсутствие или мутация гена *p53* приводит к блокированию апоптоза и способствует развитию злокачественных новообразований из-за прекращения элиминации злокачественных клеток. При действии ультрафиолетового излучения, радиации, химиопрепаратов и других факторов, приводящих к нарушениям структуры ДНК, уровень p53 повышается.

Помимо передачи сигнала в митохондрии p53 может участвовать в активации экспрессии проапоптозных генов и подавлении экспрессии антиапоптозных генов.

На наружной мембране митохондрий локализована большая часть белков семейства Bcl-2, в состав которого входят промоторы (Bax, Bid и Bik) и ингибиторы (собственно Bcl-2 и Bcl-XL) апоптоза. От соотношения активности этих белков зависит, состоится апоптоз или нет Открытие AIF (apoptosis inducing factor) является важным этапом в развитии представлений о существующих в клетке сигнальных апоптозных каскадах. Этот митохондриальный флавопротеин перемещается от митохондрий к ядру, где вызывает конденсацию хроматина на периферии ядра и разрыв ДНК с образованием крупных фрагментов. В этом случае действует каспазонезависимый механизм. Таким образом, AIF и цитохром *c* выполняют важную роль проапоптозных факторов.