

# Общие представления о роли сфинголипидов в сигнальных путях апоптоза

Мартынова Е.А.

ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН,  
125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8, e-mail: e.a.martinova@gmail.com

Текст обзорной статьи дает представление об основных механизмах, лежащих в основе особого типа программируемой гибели клеток, называемого «апоптозом». Роль сфинголипидов в развитии и регуляции апоптоза остается всё ещё мало изученной, несмотря на многочисленные работы. Это связано, прежде всего, с разнообразием молекул сфинголипидов, участвующих в передаче сигналов апоптоза. сложной системой их метаболизма и многоуровневым контролем выполнения функций, а также участием сфинголипидов в большинстве липидо-зависимых физиологических и патофизиологических процессах в клетке. В нашей статье показано, каким образом метаболизм сфинголипидов сопряжен с известными сигнальными путями апоптоза, и какие существуют возможности для внешнего воздействия на этот процесс.

**Ключевые слова:** сфинголипиды, церамид, апоптоз

**Список сокращений:** а.к.о. — аминокислотные остатки; т.п.о. — килобазы; AMPK — циклоаденозин монофосфат-зависимая протеинтирозинкиназа; с-AMP — циклический аденозин монофосфат; Araf-1 — активирующий апоптозные протеазы фактор-1;  $[Ca^{2+}]_i$  — внутриклеточный кальций; SAPK — церамид-ассоциированные киназы; SAPP — церамид-ассоциированные фосфатазы; CARD — ассоциированный с каспазами рекрутирующий домен; CD95/Fas-R — рецептор апоптоза; CED-3 — белок гибели *Caenorhabditis elegans*; DED — эффекторный домен гибели клетки; DFF40/45 — ДНК — фрагментирующий фактор; DISC — рецепторно — зависимый сигнальный комплекс апоптоза; ER — эндоплазматический ретикулум; ERK — киназный каскад передачи экстраклеточных сигналов к ядру клетки; F1A $\alpha$  — белок A $\alpha$ , связывающий Fas-рецептор; FADD — белок, ассоциированный с DD доменами Fas-рецептора; FAF1 — фактор-1 Fas-ассоциированного протеина; FAP-1 — Fas-ассоциированная фосфатаза-1; Fas-L — лиганд Fas-рецептора; ICE — IL-1 $\beta$ -конвертирующий фермент; IFN- $\gamma$  — гамма-интерферон; I $\beta$  $\alpha$  — ингибиторная единица ядерного фактора транскрипции NF-B; IL — интерлейкины; IP3-киназа — инозитидфосфат-3-киназа; JNK — с-Jun-NH2-терминальная киназа; L — лиганд; mAb — моноклональные антитела; MAPK — митогенактивированные протеинкиназы; NF-B — ядерный фактор транскрипции kB; NK — натуральные киллеры; PARP — поли(АДФ-рибозо)полимераза; PI — фосфатидилинозитид; PIP2 — фосфатидилинозитид-4,5-бифосфат; PKC — протеинкиназа C; PLC — фосфолипаза C; PTK — протеинтирозинкиназа; PTP — протеинтирозинфосфатаза; R — рецептор; RIP — белок, взаимодействующий с Fas-рецептором; ROS — реактивные метаболиты кислорода; SAPK — стресс — активированная протеинкиназа; SARP — секретируемые белки апоптоза; SMase — сфингомиелиназа; TGF- $\beta$  — трансформирующий ростовой фактор бета; TNF- $\alpha$  — фактор некроза опухоли альфа; TRAIL — лиганд рецепторов апоптоза семейства TNF; z-VAD-fmk — бензилоксикарбонил-Val-Leu-Asp-фторометилкетон (универсальный ингибитор каспаз

## 1. Апоптоз и его значение для организма

### Определение термина «апоптоз»

Слово «апоптоз» в переводе с латыни означает листопад, или опадание. Этот термин подчеркивает значение апоптоза как интегрального компонента жизни — это отмирание старого для рождения нового. В 1972 г. Kerr, Wyllie и Currie [37] опубликовали работу, в которой дали определение особому типу гибели клеток, который они назвали «апоптоз», и указали его место и роль в развитии тканей и органов, а также провели различия между двумя основными типами гибели клеток — апоптозом и некрозом.

*Апоптоз — это системный процесс, контролирующийся гибелью клеток, регулируемый генами, планируемый в соответствии с общим планом развития организма, требующий затраты энергии и синтеза белка, сопровождаемый активацией гидролаз и эндонуклеаз, завершаемый формированием апоптозных телец.*

Апоптоз необходим для поддержания гомеостаза: нарушения в реализации программы гибели клеток приводят к развитию ряда заболеваний.

Апоптоз требует затраты энергии, что принципиально отличает его от некроза, который чаще всего является ре-

зультатом резкой потери внутриклеточной энергии при блокировании митохондриального дыхания и/или гликолитического образования АТФ. Невозможность осуществления энергозависимого апоптоза является одним из механизмов инициации некроза. Некроз является, как правило, результатом подавления синтеза АТФ или его массивной потери, характеризуется набуханием митохондрий, распадом плазматической мембраны, выходом содержимого клетки в окружающую среду с развитием воспалительной реакции.

Апоптоз и некроз — это полярные типы окончания жизни клетки, при этом существуют другие механизмы, регулирующие клеточный гомеостаз, прежде всего, аутофагия, главной целью которой является сохранение жизнеспособности клетки в неблагоприятных условиях микроокружения. Аутофагия может завершиться накоплением вакуолей в цитоплазме, деградацией комплекса Гольджи, распадом эндоплазматического ретикулума и деструкцией ядра. Однако при восстановлении питания и нормального энергетического потенциала клетки в сроки, когда изменения не достигли критического уровня, она может полностью восстановить свою функциональную активность.

### *Заболевания, связанные с апоптозом*

В основе патоморфологических проявлений заболеваний человека и животных лежат изменения сигнальных путей апоптоза клеток, что сопровождается нарушением их гибели, например, неконтролируемая пролиферация клеток, ускоренная гибель клеток крови, гибель постмитотических нейронов и другие изменения.

#### *Заболевания, связанные с ингибированием апоптоза:*

- онкологические заболевания:
  - рак;
  - саркомы;
  - карциномы;
  - лимфомы;
  - лейкозы;
- аутоиммунные заболевания:
  - системная красная волчанка;
  - аутоиммунный гломерулонефрит;
  - ревматоидный артрит;
  - миастения гравис;
- вирусные инфекции:
  - герпетическая инфекция;
  - аденовирусная инфекция;
  - бакуловирусная инфекция;
- воспалительные заболевания:
  - бронхиальная астма.
  - воспаление легких;
  - анаплазмоз гранулоцитов.

#### *Заболевания, связанные с индукцией апоптоза:*

- нейродегенеративные заболевания:
  - болезнь Паркинсона;
  - болезнь Альцгеймера;
  - боковой амиотрофический склероз;
  - эпилепсия;
  - пигментные ретинопатии;
- гематологические заболевания:
  - апластическая анемия;
  - лимфоцитопения;
  - миелодиспластический синдром;
  - синдром приобретенного иммунодефицита.

#### *Заболевания, сопровождаемые одновременно апоптозом и некрозом клеток:*

- инфаркт миокарда;
- тромбоз глубоких вен;
- послеоперационные некрозы тканей;
- острое отторжение трансплантата;
- инсульты;
- острая почечная недостаточность;
- поликистоз почек.

Онкологические заболевания всегда сопровождаются нарушениями апоптоза. При хроническом лимфолейкозе резко снижается процент апоптоза лимфоцитов периферической крови. В клинической практике широко используют понятие Апоптозного индекса (AI) — это соотношение клеток в апоптозе к общему числу клеток в данной популяции. Индекс AI измеряют до и после проведенной химиотерапии, AI < 4,5% часто регистрируется у больных хроническими лейкозами с плохим прогнозом [50].

Химиотерапия онкологических заболеваний часто приводит к апоптозу клеток крови и гранулоцитопении. Выборочное снижение нейтрофилов после использова-

ния специфических моноклональных антител для лечения онкологических больных часто обусловлено различной экспрессией рецепторов на плазматической мембране лимфоцитов и нейтрофилов. Например, препарат алемтузумаб (антитела к рецептору CD52), снижает только число гранулоцитов в связи с различной экспрессией CD52 на нейтрофилах, лимфоцитах и эозинофилах [1].

Некоторые лекарственные препараты, применяемые для лечения хронических воспалительных заболеваний, например, сульфосалазин при ревматоидном артрите, снижают воспалительную реакцию в тканях за счет индукции апоптоза нейтрофилов, клиренс которых из очага воспаления обуславливает снижение активности протеолитических ферментов в тканях и ослабление болевого синдрома [2].

При лечении аутоиммунных заболеваний измерение уровня апоптоза клеток крови позволяет контролировать эффективность проводимой терапии, а также является прогностическим фактором, указывающим на продолжительность жизни пациента или на переход в более тяжелую стадию заболевания. При ревматоидном артрите обнаружена положительная корреляция между двумя параметрами — уровнем апоптоза и изменением экспрессии специфических гликоконъюгатов на мембране клеток крови, которые определяют лектин-зависимую агглютинацию лимфоцитов и полиморфноядерных лейкоцитов [4].

Системная красная волчанка сопровождается поломками регуляторных механизмов жизнедеятельности клеток на многих уровнях. Повышается фагоцитоз клеток крови за счет их активной опсонизации компонентами комплемента C1q и C3b, появляются аутоантитела, распознающие и связывающие белки гистоны, аннексин-II и другие внутриклеточные структуры, что приводит к ускоренной гибели постмитотические клетки [42].

Большинство вирусов синтезируют вещества, ингибирующие сигнальные белки апоптоза. Вирусы вакцин также кодируют антигены, блокирующие регуляторные сигналы апоптоза. Инфицирование цитомегаловирусом приводит к изменению жизненного цикла макрофагов и нарушению путей апоптоза.

Заболевания легких сопровождаются изменением апоптоза в клетках эпителия. Кроме того, вещества, загрязняющие окружающую среду (пестициды, гербициды, асбесты, аллергены, газообразные отходы химического производства и другие), вызывают окислительный стресс в клетках бронхиального дерева, что приводит к снижению внутриклеточного глутатиона, падению уровня АТФ и повышению концентрации реактивных метаболитов кислорода. Эти метаболические нарушения обуславливают активацию апоптоза и некроза в клетках эпителия [44].

В последнее время активно изучается апоптоз клеток кишечника как прогностический маркер острого отторжение трансплантата тонкой кишки вследствие сопутствующих иммунных нарушений. Повышенный процент апоптоза в клетках крипт в настоящее время используется как критерий диагностики острого клеточного отторжения [80].

В основе большинства нейродегенеративных заболеваний лежит окислительный стресс и вызванная им гибель нейронов. Следует отметить, что механизмы развития апоптоза в нейронах отличаются от других клеток организма.

## Морфологические характеристики апоптоза

Особенности морфологических проявлений апоптоза зависят, прежде всего, от видовой принадлежности организма. Это определяется экспрессией генов, наличием факторов, определяющих реализацию апоптоза, активностью ферментов, регулирующих фосфорилирование и дефосфорилирование сигнальных белков.

У человека клетки различных тканей и органов также имеют собственные временные характеристики апоптоза [86], например, нейронам требуется несколько дней для полного завершения «разборки» клетки при апоптозе, тогда как для клеток кишечника — не более 1 часа. Для лимфоцитов тимуса и периферической крови требуется ~4 ч от момента инициации сигнала апоптоза до полного исчезновения клетки из циркуляции. Эти временные особенности апоптоза следует учитывать при изучении апоптоза в препаратах и в суспензиях клеток. Несмотря на различия в клетках происходят общие события, характерные для апоптоза, в том числе:

- активация каспаз и эндонуклеаз, расщепление структурных белков цитоплазмы и ядра;
- конденсация хроматина;
- олигонуклеосомальная фрагментация ДНК;
- фрагментация ядра;
- конденсация и вакуолизация цитоплазмы;
- реорганизация цитоскелета;
- потеря контакта с экстраклеточным матриксом;
- фрагментация цитоплазмы;
- сморщивание клетки;
- образование апоптозных телец;
- фагоцитоз изолированных клеточных частиц без контакта их содержимого с внешней средой.

Морфологические проявления апоптоза определяют, в основном, активностью каспаз в отношении их специфических субстратов.

## Фагоцитоз апоптозных клеток

Распознавание и поглощение изолированных фрагментов апоптозной клетки (апоптозных телец) путем фагоцитирования их другими клетками критически необходимо для правильного внутриутробного развития, поддержания гомеостаза, ремоделирования тканей, прекращения воспаления, предотвращения активации клеток в органах и сосудах. Этот процесс регулируется сложной сигнальной системой, включающей распознавание специфических лигандов на поверхности апоптозных телец рецепторами на фагоцитах, активацию лизосомных и эндосомных ферментов в клетках. Фагоцитоз апоптозных телец предотвращает контакт их содержимого с экстраклеточным матриксом. В зарубежной литературе фагоцитоз апоптозных телец иногда называют эффероцитозом (*efferoctosis*), хотя этот термин не прижился в нашей научной среде [5].

Апоптозные тельца распознаются и поглощаются несколькими типами клеток:

- «профессиональными» фагоцитами: макрофагами, дендритными клетками, активированными нейтрофилами, моноцитами, клетками микроглии;
- клетками эпителия и эндотелия, тубулярными клетками, stellatными клетками печени и другими так называемыми «непрофессиональными» фагоцитами.

Сигналом для фагоцитоза макрофагами является появление на поверхности апоптозных телец фосфатидилсерина, который перемещается с внутреннего бислоя плазматической мембраны к наружному бислою, нарушая асимметрию фосфолипидов, поддерживаемую АТФ-зависимой аминоксфолипид-транслоказой [40]. Бета2-гликопротеин-1 (50 кДа) связывает фосфатидилсерин на клетках, что служит сигналом для активации фагоцитов. В проточной цитометрии фосфатидилсерин окрашивается аннексином V, что позволяет разделить клетки на разных стадиях апоптоза [87].

Распознавание апоптозных телец макрофагами также происходит за счет экстраклеточных нуклеотидов, высвобождаемых из гибнущих клеток, которые повышают способность макрофагов к связыванию апоптозных телец. Агонисты пуриnergических рецепторов (АТФ, АДФ, урацилтрифосфат (УТФ) и УДФ и т.д.) распознаются рецепторами P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2Y(2) на моноцитах и макрофагах [47]. Пуриnergические рецепторы появляются на поверхности плазматической мембраны клеток на ранних стадиях развития апоптоза [18].

Апоптозные клетки распознаются рецепторным взаимодействием, в частности, по экспрессии рецептора CD14, Mac1 (CD11β/CD18), αvβ3 интегрина (CD51/CD61 рецептора витронектина), β1 интегрина и другие [47].

При фагоцитозе апоптозных телец лимфоцитов, инфицированных вирусом ВИЧ-1, происходит передача вируса фагоцитирующей клетке [71].

Апоптозные тельца фагоцитируются макрофагами без контакта их содержимого с внешней средой. Скорость элиминации апоптозных телец различна для разных тканей, но не превышает нескольких минут. Изучение фагоцитоза клеток имеет практическое значение, так как определяет клиническое течение многих заболеваний. Например, нарушение фагоцитарной активности макрофагов и нейтрофилов в очаге воспаления поддерживает активности бактериальных патогенов и воспалительную реакцию.

## Гены — регуляторы апоптоза

В инициации и реализации апоптоза участвуют *гены — индукторы апоптоза*, которые можно разделить на группы, часть из которых указана ниже:

- гены, кодирующие перфорин и гранзимы, гранулин (NKG5) и т.д.;
- проапоптозные гены семейства *bcl-2*: *bad*, *bak*, *bax*, *bik*, *bag*, *bcl-X(s)* и т.д.;
- Fas-L (CD95L / APO-1-лиганд);
- гены семейства фактора некроза опухолей (*TNF-α*) (*TNF-α*, *CD127L*, *CD27L*, *TRALI* и т.д.);
- гены, кодирующие белки SARP1, SARP2, SARP3 (Secreted Apoptosis-Related Proteins);
- гены, кодирующие белки DAP-1, -2, -3, -4, -5 (Death Associated Proteins);
- гены — усилители суицида: при перенесении в клетку стимулируют образование ферментов, конвертирующих нетоксичные вещества в проапоптозные (*poβ*, *fcy1*, *EHV4tk* и т.д.).

Программа гибели клетки может быть запущена отсутствием ростовых факторов, потерей контакта с экстраклеточным матриксом, токсинами, γ — радиацией, оксидан-

тами, активными формами кислорода, этанолом, дофамином, аденовирусами и другими стимулами.

Генетический анализ нематоды *Caenorhabditis elegans* выявил белки апоптоза, кодируемые генами *ced-3*, *-4*, *-9* (*C. elegans death gene*), мутации которых позволяют клеткам избежать естественной гибели, необходимой в процессе развития организма [88]. Белок Ced-3 оказался гомологом цистеиновой протеазы млекопитающих ICE (interleukin-1 $\beta$  converting enzyme), т.е. каспазы-1 [7, 79]. С этого момента началось изучение семейства протеаз, названных каспазами.

В настоящее время идентифицирован ряд генов — ингибиторов апоптоза, продукты которых препятствуют реализации программы гибели клетки, большинство этих генов имеет вирусное происхождение. ДНК-содержащие вирусы включают в себя последовательности, кодирующие ингибиторы каспаз, гомологи *bcl-2*, белки — регуляторы клеточного цикла, модуляторы транскрипции и другие промоторы апоптоза.

Ингибиторами, в частности, являются:

- гены семейства *bcl-2*: *bcl-2*, *bcl-XL*, *mcl-1* и др.;
- *BHRF-1*, *fap-1*, *FIAM* (**F**as **A**пoptosis **I**nhibitory **M**olecule);
- гены опухолевых супрессоров *p53*, *p16*, *p21*, *p27*;
- гены, кодирующие белки семейства IAP (**I**nhibitor of **A**пoptosis **P**rotein), включающие ингибиторы каспаз-3 и -7, модуляторы ядерных факторов транскрипции NF- $\kappa$ B и v-Rel;
- гены ростовых факторов опухолей, в том числе TGF- $\beta$ .

Ингибиторами апоптоза также являются вирусы, опухолевые промоторы, фенобарбитал, кальпаиновые ингибиторы, ингибиторы цистеиновых протеаз, половые гормоны, нейтральные жирные кислоты, фосфолипиды и т.д.

В настоящее время известно более 50 генов, регулирующих сфинголипидами (в частности, гены каспазы-9, интегрин, матриксных металлопротеиназ, глюкозилцерамидсинтазы, обратной транскриптазы теломеразы, *mdr-1*, *c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, *p21*, *bcl-x*, *cox-2*, *oct-4* и др.). Это дает возможность сфинголипидам регулировать апоптоз на уровне транскрипции. Сфинголипиды влияют на экспрессию генов за счет изменения фосфорилирования и ацетилирования факторов транскрипции ( $\beta$ -катенина), репрессоров транскрипции (гистона H3) и регуляторов сплайсинга мРНК [58].

Противоопухолевые препараты (резвератрол и другие) вызывают апоптоз в малигнизированных клетках за счет регуляции церамид-зависимых генов [36]. Синтез церамидов *de novo* определяется генами *lass*, относящимися к регуляторам продолжительности жизни. Экспрессия гена *mdr-1* подавляется ингибиторами глюкозилцерамидсинтазы, что модулирует эффект множественной лекарственной устойчивости в малигнизированных клетках [75].

**Альтернативный сплайсинг генов** — это важный регулятор апоптоза. Большое число генов, ассоциированных с апоптозом, используют сплайсинг для образования функционально различных или антагонистических изоформ. Эти гены кодируют белки сигнальных путей апоптоза, рецепторов апоптоза, внутриклеточных адаптеров, каспаз и т.д. Для каспазы-2 мышей было показано наличие двух антагонистических изоформ — каспазы-2L и -2S.

Интронный элемент из 100 нуклеотидов (In100) состоит из двух доменов — содержащего 3'сплайсинговый сайт и обогащенного U/C повторами, взаимодействующего со

сплайсинговым репрессором РТВ. Эти In100-подобные элементы чаще локализируются в интронах. На основании сигнальной последовательности In100 в каспазе-2 были определены подобные последовательности в семействе элементов генома человека, ассоциированных с альтернативным сплайсингом, и было обнаружено более 4000 подобных элементов в 2757 генах. Гены, содержащие In100-последовательности, разделены на 1865 семейств [26]. In100-подобные элементы обнаружены в генах каспаз-3, -8, -9 человека; все они локализованы в последовательностях, соединяющих интроны и экзоны, кодирующие активный сайт каспаз (QACXG). В этом случае альтернативный сплайсинг дает изоформы, не имеющие каталитического домена, т.е. в которых отсутствует каталитическая активность [26].

Сплайсинг мРНК может регулироваться фосфорилированием сплайсинговых факторов и, таким образом, менять экспрессию генов апоптоза. Например, hnRNP3 человека изменяет уровень фосфорилирования и управляет альтернативным сплайсингом лиганда TRAIL. Этопозид и циклогексимид повышают альтернативный сплайсинг гена TRAIL. Синтез церамида *de novo* и активация протеинфосфатазы-1 (PP-1) повышают альтернативный сплайсинг генов апоптоза и лиганда TRAIL. В этом случае появление альтернативной проапоптозной изоформы белка TRAIL изменяет сигнальные пути апоптоза [34].

#### Типы апоптоза

С точки зрения биохимических процессов в клетке апоптоз условно можно разделить на типы, отличающиеся активностью определенных классов ферментов и сигнальными путями от рецепторов апоптоза. Программа гибели клетки может реализоваться без участия ядра и не требовать активации ядерных факторов транскрипции.

В зависимости от сигнального пути апоптоза и вовлечения вторичных мессенджеров передачи сигналов в настоящее время различают несколько типов апоптоза:

- апоптоз, инициируемый при повреждении ДНК;
- обусловленный стрессом;
- активационно-индуцированный;
- инициируемый свободными радикалами;
- кислородзависимый;
- NO-зависимый;
- Fas-индуцированный;
- зависимый от фактора некроза опухолей (TNF- $\alpha$ );
- гамма-интерферон (IFN- $\gamma$ )-зависимый;
- глюкокортикоид-индуцированный;
- гранзим В-индуцированный;
- перфорин-зависимый;
- инициируемый проапоптозными генами семейства *bcl-2*;
- инициируемый секретируемыми проапоптозными белками (SARP-2 и др.);
- инициируемый генами опухолевых супрессоров *p53*, *p16*, *p21*, *p27*;
- инициируемый потерей контакта с внеклеточным матриксом;
- активируемый при повреждении митохондрий;
- активируемый при повреждении мембран лизосом;
- филогенетически древние типы апоптоза, ассоциированные с одной органеллой;
- другие типы апоптоза.

Местом инициации апоптоза могут быть органеллы (митохондрии, лизосомы), плазматическая мембрана, ядро, эндоплазматический ретикулум, что определяет различия в сигналах, специфичных для каждого из этих типов апоптоза. В зависимости от *участвующих каспаз* апоптоз можно классифицировать на три основные группы:

- рецепторный тип апоптоза (инициирующие каспаза-8 и -10);
- апоптоз, связанный с митохондриями (инициирующие каспаза-2 и -9);
- апоптоз, обусловленный стрессовыми сигналами из эндоплазматического ретикулума (инициирующая каспаза-12).

Все сигнальные пути апоптоза пересекаются, ведущая роль одного из них определяется интенсивностью первоначального сигнала, инициирующего гибель клетки.

Филогенетически древние сигнальные пути апоптоза, не связанные с каспазами, открыты в митохондриях, так, перемещение фактора AIF (Apoptosis Inducing Factor) из межмембранного пространства митохондрий в ядро приводит к конденсации хроматина и фрагментации ДНК. Белки рибосом митохондрий DAP3 и PDCD9 инициируют апоптоз [6]. Локальное повышение экспрессии проапоптозного белка Bcl-x(s) приводит к потере митохондриального потенциала  $\Delta\Psi$  и апоптозу независимо от других сигнальных путей.

## 2. Взаимодействие протеаз разных каталитических классов в апоптозе

Протеазы (К.Ф.3.4.XX) — это гидролазы пептидных связей. В реализации программы гибели клетки принимают участие протеазы всех известных каталитических классов (табл. 1), выступая в роли вторичных мессенджеров или эффекторов апоптоза.

Протеазы разных классов взаимодействуют между собой, взаимно активируя друг друга протеолитическим расщеплением [19]. Сериновая протеаза гранзим В (К.Ф. 3.4.21.79) катализирует и активирует каспазы-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10, преимущественно расщепляя последовательность IXXD на С-конце большой субъединицы [11, 13, 14, 30]. Гранзим В-зависимый и перфорин-зависимый апоптоз сопровождается митохондриальными изменениями (генерацией реактивных метаболитов кислорода, падением митохондриального мембранного потенциала  $\Delta\Psi$ , выходом цитохрома *c* в цитозоль и т.д.), при этом одновременно и независимо от митохондрий активируется каспаза-3, расщепляющая каспазу-1, что инициирует несколько сигнальных путей апоптоза.

Лизосомные кислые аспаргатные протеазы — катепсины В и D, участвуют в регуляции Fas-зависимых сигнальных путей апоптоза. Церамид, образуемый в этом сигнальном пути, специфически связывает прокатепсин D (52 кДа), катализируя его аутокаталитический протеолиз, в результате образуется активный катепсин D (К.Ф. 3.4.23.5) в виде двух изоформ p48 и p32 [28]. Каспазы-11 и -1 процессируют катепсин В (К.Ф. 3.4.22.1), катализирующий распад ядра клетки. Катепсин I активирует каспазу-11 и другие провоспалительные каспазы. Субстратами активированной каспазы-3 на поздних стадиях апоптоза являются тканевые трансглутаминазы, катализирующие  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое формирование неразстворимых блоков внутриклеточных белков.

Многие белки имеют двойную специфичность к действию каспаз и кальпаина (кальмодулин-зависимая протеинкиназа, АДФ-рибозилтрансфераза,  $\alpha$ - и  $\beta$ -фодрин, кальпаастатин). Эффекты кальпаинов наиболее выражены при индукции апоптоза перекисью водорода. В клетках D283 медуллобластомы человека имеется дефект митохондриального окисления, и при этих обстоятельствах экзогенный С2-церамид вызывает типичные апоптозные нарушения, ассоциированные с активацией кальпаина, независимо от митохондриального дыхания.

В большинстве сигнальных путей апоптоза каспазы активируются последовательно, создавая протеолитические каскады, специфичные для первичного стимула, и усиливает сигналы апоптоза. Эти протеолитические каскады пересекаются, что позволяет клетке адекватно реагировать на изменившиеся обстоятельства или ускорять разборку структур, если сигнал апоптоза необратим. Для пар каспаз-3/-6, -3/-9 и -12/-6 показано наличие циклов амплификации, когда одна каспаза активирует другую, предшествующую ей в сигнальном пути, что многократно усиливает первоначальный сигнал и позволяет быстро элиминировать структурные компоненты клетки.

## 3. Каспазы и их роль в апоптозе

### Классификация каспаз

Каспазы (Cysteine ASPartate — specific proteASE — CASPASE) — это внутриклеточные протеазы, обладающие консервативной цистеиновой последовательностью в активном сайте, которая определяет связывание субстрата и его гидролиз после аспартата в аминокислоте в положении P1. Каспазы (КФ 3.4.22.X) имеют активированный цистеин внутри высококонсервативного активного сайта, включающего пентапептид QACRG. В настоящее время все известные каспазы пронумерованы согласно последовательности их открытия (табл. 2).

Таблица 1

Протеазы разных классов, участвующие в апоптозе

Каталитический класс протеаз	Механизм действия	Примеры
Сериновые	Ковалентно связывают поляризованные боковые цепи с серином	Гранзимы А, В, Н, К и М; Эластаза; Катепсины L, S
Цистеиновые	Ковалентно ввязывают поляризованные боковые цепи с цистеином	Каспазы; Кальпаины; Катепсин В
Треониновые	Ковалентно ввязывают поляризованные боковые цепи с треонином	26S протеасомы
Аспаргатные	Молекулы воды связывают поляризованные ферментом аспаргат-содержащие боковые цепи	Катепсин D
Металлопротеазы	Молекулы воды связывают поляризованные ферментом молекулы цинка	Матриксные металлопротеазы

В зависимости от гомологичности последовательностей или варибельности региона P<sub>2-4</sub> субстрата, каспазы классифицируются на три подсемейства или группы (табл. 3).

Подсемейство ICE включает видоспецифичные изоформы каспазы-1, а также каспазы, соответствующие ей в N-концевом домене. Каспаза-13 (ERICE — Evolutionary Related IL-1 $\beta$  Converting Enzyme) входит в подсемейство ICE на основании филогенетического анализа. Подобно другим членам подсемейства ICE, каспаза-13 принимает участие в рецепторном типе апоптозе (TNF-R1) и активируется каспазой-8. Активная форма каспазы-13 обнаружена в мононуклеарных клетках быка, клетках MCF-7 карциномы молочной железы, клетках 293h эмбриональной почки. Каспазы, имеющие последовательность WEHD, играют роль в активации цитокинов при апоптозе [15]. Каспазы, содержащие последовательности DEXD и IVL/EXD, проводят сигналы от рецепторов апоптоза. При этом в P4 регионе субстратов, расщепляемых при апоптозе, не обнаруживаются гидрофобные аминокислоты.

Недавно при проведении сравнительного генетического анализа были идентифицированы 3 новые каспазы

— каспаза-16, каспаза-17 и каспаза-18 [16]. Каспаза-16 оказалась подобной каспазе-14 по гомологичности последовательностей варибельного региона и консервативной для большинства млекопитающих, включая человека. Каспаза-17 оказалась гомологичной каспазе-3, она имеет консервативные последовательности с каспазами рыб, лягушек, кур, но не с каспазами плацентарных млекопитающих. Каспаза-18 подобна каспазе-8 и имеет консервативные последовательности с каспазами кур и опоссумов, но не с млекопитающими, у которых есть плацента. Гены каспаз-17 и -18 были потеряны у человека в процессе эволюции.

#### Структура каспаз

Каспазы синтезируются в виде неактивного профермента, состоящего из четырех доменов: N-концевого домена (продомена или N-терминального полипептида); большой субъединицы; малой субъединицы и связующего региона между субъединицами.

Активация каспаз начинается с протеолитического расщепления во внутреннем сайте между доменами, что приводит к высвобождению малой субъединицы по Asp-Xaa, затем связующего региона и большой субъединицы, и удалению продомена. Большая и малая субъеди-

Таблица 2

#### Список каспаз, известных к настоящему времени

Каспазы	Синонимы	Авторы, открывшие каспазы
Каспаза-1	ICE (IL-1 $\beta$ -converting enzyme)	Cerretti, 1992, Thornberry, 1992
Каспаза-2	Nedd2, ICH-1	Kumar, 1994, Wang, 1994
Каспаза-3	CPP32, YAMA, apopain, IRP,	Fernandes-Alnemri, 1994, Tewari, 1995, Nicholson, 1995
Каспаза-4	ICE(rel)II, TX, ICH-2	Munday, 1995, Kamens, 1995, Faucheu, 1995
Каспаза-5	ICE(rel)III, TY	Munday, 1995
Каспаза-6	Mch2	Fernandes-Alnemri, 1995
Каспаза-7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	Fernandes-Alnemri, 1995, Duan, 1996, Lippke, 1996
Каспаза-8	MACH, FLICE, CAP4, Mch5	Boldin, 1996, Muzio, 1996
Каспаза-9	ICE-LAP6, Mch6	Srinivasula, 1996, Duan, 1996
Каспаза-10	Mch4, FLICE2	Fernandes-Alnemri, 1996
Каспаза-11	ICH-3	Van de Craen, 1997, Wang, 1996
Каспаза-12		Van de Craen, 1997
Каспаза-13		Humke, 1998
Каспаза-14		Van de Craen, 1998, Hu, 1998
Каспаза-15		Eckhart et al., 2005
Каспаза-16		Eckhart et al., 2006
Каспаза-17		Eckhart et al., 2006
Каспаза-18		Eckhart et al., 2006
	CED-3 ( <i>C. elegans, vulgaris</i> )	Yuan, 1993
	drICE, DCP-1 ( <i>Dr. melagomaster</i> )	Fraser, Evan, 1997, Song, 1997

Таблица 3

#### Классификация каспаз

Классификация каспаз			
Согласно гомологии последовательностей:		Согласно варибельности региона P <sub>2</sub> –P <sub>4</sub> субстрата:	
Подсемейство	Каспазы	Группы (фрагменты последовательностей)	Каспазы
ICE	1, 4, 5, 13, 11, 12	I (-WEHD-)	1, 4, 5, 15
CED3/ CPP32	3, 6, 7, 8, 9, 10, 15	II (-DEXD-)	3, 2, 7
ICH-1/ Nedd2	2	III (-IVL/EXD-)	6, 8, 9, 10

ницы из двух прокаспаз собираются в единый комплекс. Активная форма каспазы — это тетрамер, в котором связь осуществляется двумя малыми субъединицами, окруженными двумя большими субъединицами. Два каталитических сайта формируется из аминокислот большой и малой субъединиц [82, 84].

Особенность активации каспазы определяется аутокаталитическими свойствами и местом в протеолитическом каскаде, где каспазы функционально разделяются на *иницирующие* и *эффекторные*. Иницирующие каспазы обладают продоменом большой молекулярной массы, структурно сходным с белковым модулем, связывающим их со специфическими активаторами. Каспазы-3, -6, -7 и -14 имеют короткие продомены и функционируют как эффекторы. Каспазы распознают сайты субстратов, комплементарные их собственным последовательностям аутокатализа. Оптимальный сайт для распознавания иницирующей каспазы присутствует и в последовательностях эффекторных каспаз.

В продоменах иницирующих каспаз обнаружено три типа модулей: **CARD** (**C**aspase **A**ssociated **R**ecruitment **D**omain), **DED** (**D**eath **E**ffector **D**omain) и **BIR** (**B**aculovirus **I**nhibitor **A**poptosis **P**rotein **R**epeat) [32].

Белки, содержащие модули CARD, разделяются на 4 подгруппы: NOD, VIMP, Decoy и адаптеры. Во взаимодействии с каспазами существенную роль играют две группы — NOD и адаптеры. К подгруппе NOD относятся:

- Araf-1 (образует комплексы с цитохромом c, Bcl-X<sub>L</sub>, прокаспазой-9 и -8);
- Nod1/CRAD4h (образует комплексы с прокаспазой-9);
- Iraf/CARD12h (образует комплексы с прокаспазой-1, Nod2);
- DEFCAP/CARD7 (образует комплексы с прокаспазойми -1, -2, -9, Araf-1);
- белки DARK, Nod2, СПТА и другие.

В подгруппу адаптеров входят белки:

- RAIDD/CRADD (образует комплексы с прокаспазойми-2 и -3);
- адаптеры, имеющие структуру CARD/DD. Например, белок R18-2 образует комплексы с прокаспазой-1 и входит в состав сигнального комплекса рецепторов апоптоза);
- Bcl-10 (формирует комплексы с адаптерными белками рецепторов апоптоза);
- ASC (образует комплексы с прокаспазой-1, CARD12).

Белки, несущие модули DED, подразделяются на типы *адаптерный* и *DEDD*. К *адаптерному* типу относятся все белки сигнального комплекса рецепторов апоптоза и ингибиторный белок FLIP, они имеют по два DED домена и функционируют в олигомерной форме, что позволяет одновременно взаимодействовать со вторичными мессенджерами нескольких сигнальных путей. Белки *DEDD* типа связаны с сигнальным комплексом рецепторов апоптоза и непосредственно передают сигнал в ядро клетки [32].

Белки, несущие модули BIR, связывают каспазы с физиологическими ингибиторами, а также с убиквитин-зависимым протеолизом. Модуль BIR-2 — это фрагмент ингибиторного белка IAP. Взаимодействие модулей приводит к образованию комплекса BIR3/CARD/RING-finger, причем последовательность RING-finger осуществляет связь с убиквитин-зависимой лигазой. Этот тип связей показан для каспаз-3, -7 и -9 [32].

#### Активные сайты и субстраты каспаз

Все каспазы обладают сходной аминокислотной последовательностью (а.к.о.) в активном сайте, критическом для связывания и гидролиза субстрата. В активном сайте каспазы-1 находятся Cys<sup>285</sup> и His<sup>237</sup>, в которых водород связан с тиохемиацеталем в комплексе фермент — субстрат, а также Gly<sup>238</sup>, стабилизирующий супероксид-

Таблица 4

#### Молекулярные формы и активные центры каспаз

Каспазы	Активный центр	Проферменты M (Да)	Активные формы каспаз	Продомен	Лocus в геноме человека
Каспаза-1	QACRG	45159 (p45)	p20, p10	Д	11q22.2-q22.4
Каспаза-2	QACRG	48855	p19, p12/14	Д	7q34-q35
Каспаза-3	QACRG	31594	p17, p12	К	4q33-q35.1
Каспаза-4	QACRG	43262	p20, p10	Д	11q22.2-q22.3
Каспаза-5	QACRG	47814	p20, p10	Д	11q22.2-q22.3
Каспаза-6	QACRG	33409	p18, p11	К	4q25
Каспаза-7	QACRG	34276	p20, p11	К	10q25.1-q25.2
Каспаза-8	QACQG	55391	p18, p10	Д	2q33-q34
Каспаза-9	QACGG	46322	p35, p10	Д	1p36.1-p36.3
Каспаза-10	QACQG	58878	p23/17, p12	Д	2q33-q34
Каспаза-11	QACRG	43000	p20, p10	Д	12q12
Каспаза-12	QACRG	60000	p40, p55, p37, p46, p43	Д	11q22.3
Каспаза-13*	QACRG	43000	p25	Д	—
Каспаза-14	QACRG	30000	p18, p11, p20, p8	К	19p13.1
Каспаза-15*	QACRG	32000	p30, p10	Д	—
Каспаза-16**					
Каспаза-17**					
Каспаза-18**					

Примечание. \* — бычий гомолог; \*\* в настоящее время дополнительная информация отсутствует

ные интермедиаты, образующиеся в результате реакции. Arg<sup>179</sup>, Gln<sup>283</sup>, Arg<sup>341</sup> и Ser<sup>347</sup> формируют связывающий карман для карбоксильной стороны цепи в P1 сайте. Именно последовательность из четырех аминокислот в P1 сайте, которая связывается с консервативным сайтом в малой субъединице фермента, определяет высокую специфичность каспаз в выборе субстратов.

Характеристики прокаспаз и субъединиц их активных форм приведены в табл. 4.

Участие каспаз в рецепторных путях апоптоза — это важная сигнальная функция протеаз. Передача сигналов апоптоза от рецепторов на плазматической мембране представляет собой комплекс событий, в которых можно выделить общие ключевые моменты для всех рецепторов. Апоптоз инициируется при распознавании рецепторов семейства TNF- $\alpha$ , Fas-R, TGF- $\beta$ , рецепторов DR1, DR2, DR3, DR4, DR5, а также TRAIL-R2 и др.

Общие сигнальные последовательности, такие, как домены DD, DED, CARD, обеспечивают распознавание сигнальных белков. Соответствующие домены имеются в структуре каспаз и распознаются ими. Сигнал к апоптозу проводится через протеины TRADD, FADD/MORT-1, RIP, содержащие DD домены, а также адаптерные белки TRAF, DAXX и ядерный фактор транскрипции NF- $\kappa$ B. На всех этапах передачи сигналов от плазматической мембраны к ядру клетки каспазы принимают непосредственное участие.

Субстратами каспаз являются структурные белки, в том числе белки цитоскелета, фокальные киназы, ферменты репликации ДНК, ферменты сплайсинга РНК, белки клеточного цикла, апоптозные белки про-IL-1 $\beta$ , про-IL-18, PAK-2 (p21-ассоциированная киназа), протеинкиназы C (PKC)  $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\epsilon$  и другие белки. Примеры субстратной специфичности каспаз приведены в табл. 5.

#### Взаимодействие церамида с каспазами в сигнальных путях апоптоза

Большинство сигнальных путей, ассоциированных с каспазами, регулируются церамидом — сфинголипидом, выполняющим многочисленные функции в клетке. Подробно роль церамида в проведении сигналов апоптоза

обсуждается в следующих главах. Взаимодействие каспаз и церамида представляет собой комплексный процесс, в котором можно выделить несколько ключевых моментов. Во-первых, взаимодействие церамида и каспаз показано при всех известных формах апоптоза, которое носит комплексный характер и вовлекает разные пулы церамидов. Все известные к настоящему времени сигнальные пути с участием каспаз пересекаются с церамид — зависимыми сигнальными путями.

Во-вторых, при независимой активации каспаз и сфингомиелинового цикла (в результате которого появляется сигнальный пул церамида) образуются вторичные мессенджеры, повышающие активность обоих сигнальных путей. Взаимодействие каспаз и церамида в сигнальных путях создает амплифицирующие петли, усиливающие первоначальный сигнал. Это показано в опухолевых клетках для каспазы-8, каспазы-9, каспазы-3. В эффекторной фазе апоптоза сигнальные пути церамида и каспаз ускоряют процесс разборки клетки.

В-третьих, ингибиторы каспаз регулируют проведение церамид-зависимых сигналов. Ингибитор каспаз Ac-YVAD-fmk предотвращает активацию кислой сфингомиелиназы и распад сфингомиелина с образованием церамида при связывании Fas-рецепторов. Ингибитор каспазы-8 z-IETD-fmk блокирует образование церамида и реализацию программы апоптоза.

Ингибиторы сфингомиелинового цикла также частично ингибируют активность каспазы-3. Активация негативных регуляторов церамида, таких, как РКС и диацилглицерин, снижает активность каспаз. Церамид, синтезированный *de novo*, индуцирует фосфорилирование белка, регулирующего альтернативный сплайсинг мРНК каспазы-9, что снижает уровень белка каспазы-9 $\beta$ , которая, в отличие от других изоформ, обладает анти-апоптозной активностью. Ингибитор синтеза церамида фумонизин В1 блокирует этот процесс [8].

Таким образом, изучение механизма взаимодействия церамида с каспазами при развитии апоптоза носит не только фундаментальный характер, но имеет прикладное значение, позволяя в перспективе подойти к разработке новых противоопухолевых препаратов.

Таблица 5

Субстраты каспаз

Каспазы	Субстраты
Каспаза-1	про-IL-1 $\beta$ , про-IL-18, прокаспазы-1,-3,-4, PARP
Каспаза-2	PARP
Каспаза-3	PARP, ДНК-протеинкиназа, PKC $\delta$ , R $\beta$ протеин, DFF, актин, фодрин, MDM2, UI-70
Каспаза-4	про-IL-1 $\beta$ , прокаспазы-1, про-IL-16
Каспаза-5	Ламины А, В1/В2, С; UI-70, PARP
Каспаза-6	Ламины А, В, С; PARP, NuMa; прокаспазы-3, -12
Каспаза-7	PARP, прокаспазы-3, -6, -7, -9, -14; кинектин, EMAP II
Каспаза-8	PARP, прокаспазы-3
Каспаза-9	Прокаспазы-3 и -7
Каспаза-10	Прокаспазы-3 и -7 <i>in vivo</i> , все прокаспазы <i>in vitro</i>
Каспаза-11	Прокаспазы-3 и -1
Каспаза-12	Прокаспазы-3 и -9, кальпаин
Каспаза-13	PARP
Каспаза-14	Ферменты активации кератиноцитов



#### 4. Сфинголипиды — регуляторы сигналов апоптоза

##### Структура сфинголипидов

Сфинголипиды — это класс липидов, имеющих общее структурное основание — сфингозин. Сфинголипиды входят в состав всех клеток, поддерживают структурную и функциональную организацию ядра, органелл, плазматической мембраны, обеспечивают передачу информации от плазматической мембраны к ядру клетки, позволяют ей адаптироваться к стрессу. Участие сфинголипидов в физиологических и патофизиологических процессах зависит от особенностей химической структуры (длины алкильной цепи, положения и числа двойных связей, наличия гидроксильных групп и т.д.) [10].

«Простые» сфинголипиды — это сфингозин, сфинганин, фитосфингозин, церамид. Фосфаты сфингозина, сфинганина, церамида, а также сфингомиелин, лизосфингомиелин (сфингозинфосфохолин) и церамидфосфотаноламин относятся к фосфосфинголипидам.

Производные сфингозина, образуемые ацетилированием аминокислоты основания, называются церамидами. Церамид (N-Acyl-Sphingosine), синтезированный *de novo*, является ключевой молекулой синтеза комплексных сфинголипидов (сфингомиелинов, сфингофосфолипидов, сфингогликолипидов, ганглиозидов, цереброзидов, сульфатидов).

В клетке эукариот существуют несколько пулов церамида с различной длиной N-ацильной боковой цепи (C14:0 — C36:0), формируемой насыщенными или полиненасыщенными жирными кислотами (ЖК), в которые встраиваются гидроксильные группы в  $\alpha$  или  $\omega$  атоме углерода. Они имеют двойное обозначение, включающее характеристику простого сфинголипида и ЖК: например, N-пальмитоилсфингозин обозначается как d18:0/16:0 [10]. Наличие двух неопределяемых ЖК в молекуле церамида приводит к более выраженному проапоптотическому действию. Сигнальные пути апоптоза регулируются сфинголипидами, среди которых церамид представляет наибольший интерес. Молекула C16-церамида, участвующего практически во всех сигналах апоптоза, представлена на рисунке.

##### Роль ферментов синтеза сфинголипидов *de novo* в регуляции апоптоза

Серин-пальмитоилтрансфераза (Ser-PT, КФ 2.3.1.50) катализирует первую ступень синтеза сфинголипидов *de novo* — конденсирование L-серина с пальмитиновой кислотой и пальмитоил-коэнзимом-A (Co-A), что приводит к формированию 3-кетодигидросфингозина (3-кетосфинганина) [25]. Ser-PT имеет форму гетеродимера или гетеротримера, каталитический центр расположен между двумя мембраносвязанными субъединицами SPT1 и SPT2 и включает а.к.о. каждой из них. В настоящее время обнаружено 4 изоформы Ser-PT, каждая содержит общую SPT1 субъединицу, вторую субъединицу SPT2, а также может включать третью малую субъединицу ssSPT $\alpha$  или ssSPT $\beta$  [24].

Мутация C<sup>133</sup>W в субъединице SPT1 сопровождается апоптозом клеток мозга, вызванном конденсацией пальмитоил-Co-A и аланина, накоплением 1-дезоксисфинганина, повышением уровня маркера ER стресса GADD153 [21].

Активность Ser-PT повышается в астроцитах гипокампа в ответ на введения каинатов, что сопровождается на-

коплением церамидов C16:0, C18:0 и C20:0 и апоптозом [27]. При гипоксии в клетках нейробластомы SH-SY5Y транскрипционно повышается активность субъединицы SPT2, повышается концентрация церамида и апоптоз, сопровождаемый фрагментацией ДНК [35].

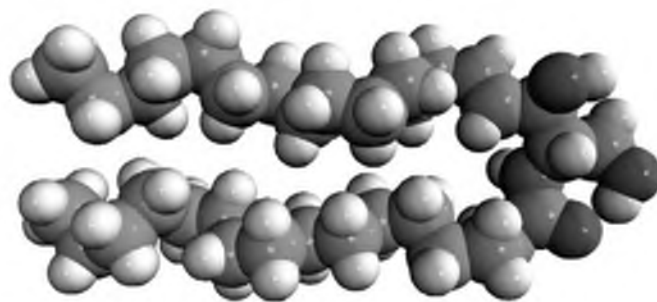
Экспрессия субъединицы SPT2 возрастает в нормальных перитонеальных макрофагах мышей и в клетках RAW264 в ответ на липополисахарид (ЛПС), что стимулирует синтез церамида и апоптоз. Трансфекция р65 субъединицы NF- $\kappa$ B повышает экспрессию SPT2 (связывающая сайты на промоторном регионе SPT2) и уровень церамида в клетке [9].

*Ацил-Co-A-зависимые церамидсинтазы* (CerSyn) катализируют соединение ацил-коэнзима-A (ацил-Co-A) со сфинганином и сфингозином с образованием церамида. В клетках млекопитающих обнаружено 6 церамидсинтаз, катализирующих образование церамидов с различной длиной N-ацил-боковой цепи (C14:0—C26:0), соответствующей субстратной специфичности ацил-Co-A [51]. Специфичность ацил-Co-A церамидсинтаз:

- CerSyn1 (C18-Co-A);
- CerSyn2 (C22-C24-Co-A);
- CerSyn3 (очень длинные ацил-Co-A (C26 и C36));
- CerSyn4 (C18-C20-Co-A);
- CerSyn5 (C16-Co-A);
- CerSyn6 (C16-Co-A).

При ультрафиолетовом (УФ) облучении, стрессе или действии противоопухолевых препаратов CerSyn1 перемещается из эндоплазматического ретикулума (ER) в комплекс Гольджи; этот процесс регулируется РКС и приводит к повышению уровня C18-церамида и индукции апоптоза. Стресс обуславливает протеолитическое расщепление и активацию CerSyn1, что регулируется а.к.о. на C-конце фермента [73].

Нокаут гена *CerSyn2* блокирует образование C22-C24 церамидов, что сопровождается нарушениями метаболизма сфинголипидов. При этом в фосфатидилэтаноламинах возрастает процент C18:1 и C18:2 жирных кислот (ЖК), снижается процент C18:0 и C20:4 ЖК, повышается активность нейтральной сфингомиелиназы-2, изменяется баланс ненасыщенных и насыщенных C26—C36 сфинголипидов, повышается процентное содержание C16-церамида. Уровень сфинганина возрастает в 50 раз, из него формируются дигидроцерамиды, дигидросфингомиелины, дигидроцерамидмоногексозы. Метаболизм сфинганина может далее идти двумя путями: он может быть десатурирован в церамид и далее в сфингомиелин или конвертирован в сфингозин и далее в сфингозин-1-фосфат [60, 61, 63].



Молекулярная структура C16-церамида (по данным Avanti Polar Lipids, Inc. <http://avantilipids.com/>)

CerSyn3 катализирует синтез  $\omega$ -гидроксилированных C26—C36 сфинголипидов в кератиноцитах эпидермиса, создающих барьерный липидный слой кожи [68].

Активация CerSyn4 и синтез *de novo* C18-церамида обнаружены при апоптозе  $\beta$ -клеток поджелудочной железы [81].

Для спонтанного апоптоза нейтрофилов необходима активность CerSyn2 и CerSyn5 и синтез *de novo* C16- и C24-церамидов [70]. При апоптозе клеток HeLa под действием радиации активируются CerSyn2, CerSyn5 и CerSyn6 [49].

УФ вызывает апоптоз, сопровождаемый повышением уровня церамида, дигидроцерамида, сфингомиелина и гексозилцерамида. Второй пик повышения уровня церамида связан с митохондриальными нарушениями, перемещением белков Bcl-2, Bax, активацией каспаз. Нокаут генов *CerSyn5* и *CerSyn6* обуславливает снижение накопления длинноцепочечных церамидов и повышение пермеабиллизации мембран клетки [53].

В предшественниках олигодендроцитов CerSyn6 расположена на внутренней мембране митохондрий, её активность и уровень C16-церамида супрессированы, что связано со сниженной способностью митохондрий захватывать  $Ca^{2+}$ . C16-церамид регулирует открытие пор, которое приводит ко входу  $Ca^{2+}$  и его накоплению в матриксе митохондрий [54]. В  $Ca^{2+}$ -независимых клетках активность церамидсинтаз при апоптозе регулируется белком Bax на пост-трансляционном уровне [72].

Природный ингибитор Co-A-зависимых церамидсинтаз — микотоксин фумонизин В1, продуцируемый микроскопическими плесневыми грибами *Fusarium moniliforme*, *F.proliferatum* и другими родственными видами, повышает в клетках концентрацию сфинганина и сфингозина (40:1) и уровень сфинганин-1-фосфата.

**Церамидазы** (К.Ф. 3.5.1.23) деацилируют церамид, катализируя гидролиз N-ацильных связей церамида с образованием сфингозина и жирной кислоты. Ацил-Co-A-независимая церамидсинтаза также обладает обратной функцией церамидазы. Церамидазы подразделяются на кислые, нейтральные и щелочные в зависимости от оптимума pH. У человека идентифицировано 6 генов церамидаз:

- один ген кислой церамидазы (*ASAH1*, оптимум pH 4,5);
- один ген нейтральной церамидазы (*ASAH2*, оптимум pH 7,0);
- три гена щелочной церамидазы (*ACER1*, *ACER2*, *ACER3*, оптимум pH 9,0).

У человека *кислая церамидаза* (*ASAH1*) лизосом гидролизует C10—C14-церамиды с насыщенными связями или C18:1-, C18:2-церамиды с ненасыщенными связями. Ингибирование *ASAH1* прерывает сигналы апоптоза, ассоциированные с лизосомами [62]. Повышение активности *ASAH1* стимулирует апоптоз клеток рака простаты [23, 43], но снижает апоптоз клеток рака молочной железы [66]. Фитоэстроген генистеин индуцирует экспрессию гена *ASAH1* и регулирует рост клеток MCF-7 рака молочной железы [45].

*Нейтральная церамидаза* (*ASAH2*) — это интегральный мембранный белок II типа в плазматической мембране, каталитический домен локализован на поверхности клетки [78]. После процессинга N-концевого домена образуется секретлируемая изоформа *ASAH2* [77]. Профермент *ASAH2* в поздних эндосомах / лизосомах имеет функциональную di-Leu последовательность — сортировочный

сигнал везикулярного транспорта по эндосомным путям. Субстраты *ASAH2* — это C16—C22-церамиды или C26—C36-церамиды. Промотор гена *ASAH2* имеет функционально активный сайт связывания для фактора транскрипции HNF-4, что регулирует метаболизм сфинголипидов в клетках желудочно-кишечного тракта [46]. Проксимальный промоторный регион (200 т.п.н.) отвечает за экспрессию мРНК гена *ASAH2*, регулируется фактором транскрипции AP-1. Нокаунт субъединицы AP-1 с-Jun ингибирует активность этого участка, активация с-Jun повышает активность промотора гена *ASAH2* [55].

*Щелочная церамидаза* (*ACER*) катализирует обратимую реакцию, в которой N-ацил-связи церамида гидролизуются и снова синтезируются, прямая реакция эффективна при щелочных pH, а обратная — при нейтральных pH. *ACER* катализирует конденсацию сфингозина с насыщенными и ненасыщенными свободными жирными кислотами без кофакторов, при этом невозможен перенос жирной кислоты от ацил-Co-A на сфингозин. Имеются ограничения по стереоспецифичности для обратной реакции, в которой участвует только D-эритро-сфингозин, а не L- или D,L-трео-формы [39].

*Щелочная церамидаза-1* человека (*ACER1*) локализована в ER, катализирует гидролиз C24:0—C36-церамидов, но более эффективно церамидов с ненасыщенными связями (C18:1, C20:1, C24:1) [29].

*Щелочная церамидаза-2* человека (*ACER2*) — это  $Ca^{2+}$ -зависимый фермент, имеет 7 трансмембранных доменов, N-концы требуются для активности фермента и его локализации в комплексе Гольджи и ориентированы в люмен, а C-концы — в цитозоль. Мутация в первых а.к.о. N-конца *ACER2* обуславливает его локализацию в ER при сохранении каталитической активности. Активность *ACER2* регулируется сигнальными белками в клетке. Значительная эктопическая экспрессия *ACER2* приводит к повышению уровня сфингозина, фрагментации комплекса Гольджи и апоптозу [29,74].

*Щелочная церамидаза-3* человека (*ACER3*) катализирует гидролиз церамидов с ненасыщенными очень длинными основаниями (ULC) *in vivo*; координирует пролиферацию и выживание клеток вместе с *ACER2*. *In vitro*, *ACER3* гидролизует C(18:1)-, C(20:1)- и C(20:4)-церамиды, дигидроцерамиды, фитоцерамиды. Нокаунт гена *ACER3* приводит к повышению экспрессии ингибитора клеточного цикла p21<sup>CIP1/WAF1</sup> и остановке пролиферации. Нокаунт гена *ACER3* при депривации сыворотки ингибирует апоптоз, повышает экспрессию *ACER2*, снижает уровень церамидов со средней длиной цепи, повышает концентрацию сфингозина и сфингозин-1-фосфата [29]. *ACER3* — это белок ER и комплекса Гольджи, где он регулирует обмен церамида и его участие в сигнальных путях. Сфингозин, образованный из церамида, может быстро фосфорилироваться сфингозинкиназой с образованием сфингозин-1-фосфата, который модулирует сигнальные пути церамида в клетке [33].

*Церамид регулирует апоптоз, взаимодействуя с сигнальными белками*

Сфингомиелиновый цикл — это гидролиз сфингомиелина плазматической мембраны, катализируемый сфингомиелиназой, с образованием биологически-активных молекул (церамида, сфингозина и их фосфатов), дающих начало собственным сигнальным путям. Церамид, синте-

зированный *de novo*, и керамид, образованный при гидролизе сфингомиелина плазматической мембраны, — это функционально различные пулы. Оба пула керамиды являются вторичным мессенджером сигнальных путей фактора некроза опухолей альфа (TNF- $\alpha$ ), ионизирующей радиации, противоопухолевых препаратов [12].

При проведении сигнала апоптоза эндогенный керамид участвует в каспазо-зависимых типах апоптоза [76], а также проводит сигналы, не сопряженные с каспазами [57], активирует факторы транскрипции (NF- $\kappa$ B, AP-1 и другие), модулирует каналы митохондрий. Церамиды взаимодействуют с ферментами, адаптерами, сигнальными белками (апоптозными, стресс-зависимыми, белками цитоскелета и т.д.), Ser/Thr фосфатазами, имеющими, как минимум, один гидрофобный домен. Мишенями керамидов являются изоформы протеинкиназы C (PKC), катепсин D [20].

C1-домен киназы Ras содержит сайт связывания керамиды, который предотвращает перемещение Ras к плазматической мембране [85, 89]. В сигнальном пути IL-1 $\beta$  керамид специфически связывает протеинкиназу c-Raf, что вызывает активацию MAPK киназного каскада [31, 69]. В керамид — зависимых сигналах апоптоза участвует фактор Bcl-2 [64].

Мишенью керамиды является протеинфосфатаза 2A (PP2A) — гетеротримерный белок, состоящий из каталитической C-субъединицы и структурной A-субъединицы, которые формируют каталитический комплекс, а также регуляторной B-субъединицы, экспрессия которой является индуцированной и определяется состоянием клетки и особенностями ткани. Каталитическая субъединица PP2A имеет сайт связывания для C18-керамиды [59, 60], что регулирует сигнальные пути апоптоза, ассоциированные с PP2A, в частности, с участием киназы DAPK (Death Associated Protein Kinase) [83]. В этом сигнальном пути также принимают участие реактивные метаболиты кислорода (ROS) и Ca<sup>2+</sup> [56].

Активация PPA2 сопряжена с перемещением сигнального белка tBid от рецептора Fas-R в митохондрии. Одновременно фосфорилируется белок Вах и перемещается в митохондрии [22]. В мембране митохондрий в физиологических условиях изоформа B56 $\alpha$  B-субъединицы PP2A ассоциирована с белком Bcl-2. PP2A дефосфорилирует анти-апоптозные белки семейства Bcl-2. Церамид вызывает транслокацию B56 $\alpha$  к мембране митохондрий, что повышает активность PP2A, при этом фосфорилируется Bcl-2 и потенцируется керамид-зависимый апоптоз. Церамид регулирует сигналы анти-апоптозных белков Bcl-2 и Bcl-x<sub>L</sub> [17].

При связывании PP2A с керамидом повышается распад с-Мус за счет его PP2A-зависимого фосфорилирования по Ser<sup>62</sup> [52]. Церамид контролирует активность с-Jun [65]. Сигнальные пути с участием керамиды и PP2A обнаружены во многих опухолевых клетках, включая клетки РС3 рака простаты [3]. В этих клетках одновременно изменяются сигналы, передаваемые PKB/Akt на mTOR и далее на регуляторы клеточного цикла [38]. С6-керамид потенцирует дефосфорилирование Akt в сигналах, передаваемых на второй комплекс киназы mTOR — mTORC2 [90]. При апоптозе, вызванном С2-керамидом, показано участие белка — скавенджера I4-3-3 [48, 61], который также регулируется протеинфосфатазой-2-эпсилон (PP2 $\epsilon$ ) [41]. PP2 $\epsilon$  — это интегральный белок ER, дефосфорилирует транспортный белок керамиды CERT, что повышает его связывание с мембранами ER [67].

Представленный выше текст позволяет понять основные механизмы, связанные с особым типом гибели клеток, называемым «апоптоз». Несмотря на разнообразие морфологических процессов, отражающих течение апоптоза в различных типах клеток, существуют общие закономерности для молекулярных и морфологических событий, связанных с апоптозом. Наша работа позволяет понять, каким образом в клетке при апоптозе пересекаются сигнальные пути, обусловленные фосфорилированием белков, с сигнальными путями, зависимыми от сфинголипидов. Это еще раз подтверждает взаимодействие разнообразных метаболических путей в клетке, многоуровневый характер их регуляции и единый контроль, что обеспечивает клетке выполнение её физиологических функций и полное исчезновение в конце жизненного цикла. Апоптоз обеспечивает постоянное обновление клеток и тканей организма, поддержание гомеостаза, восстановление функциональной активности после стресса или патологического процесса.

Роль сфинголипидов в развитии и регуляции апоптоза остается всё ещё мало изученной, несмотря на многочисленные работы. Это связано, прежде всего, с разнообразием молекул сфинголипидов, сложной системой их метаболизма и многоуровневым контролем выполнения функций, а также участием сфинголипидов практически во всех физиологических и патофизиологических процессах в клетке. В продолжение нашей статьи, в следующей части, будет показано, каким образом керамид может регулировать сигналы апоптоза, и какие существуют средства для внешнего воздействия на этот процесс.

### Список литературы

1. Ambrose L., Morel A., Warrens A. Neutrophils express CD52 and exhibit complement-mediated lysis in the presence of alemtuzumab // *Blood*. — 2009. — Vol. 114, №14. — P. 3052–3055.
2. Bertolotto M., Dallegri F., Dapino P. et al. Sulphasalazine accelerates apoptosis in neutrophils exposed to immune complex: Role of caspase pathway // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* — 2009. — Vol. 36, №11. — P. 1132–1135.
3. Bhardwaj A., Singh S., Srivastava S. et al. Modulation of protein phosphatase 2A activity alters androgen-independent growth of prostate cancer cells: therapeutic implications // *Mol. Cancer Ther.* — 2011. — Vol. 10, №5. — P. 720–731.
4. Bilyy R., Nemesh L., Antonyuk V. et al. Apoptosis-related changes in plasma membrane glycoconjugates of peripheral blood lymphocytes in rheumatoid arthritis // *Autoimmunity*. — 2009. — Vol. 42, №4. — P. 334–336.
5. Caruso R., Fedele F., Finocchiaro G. et al. Neutrophil-tumor cell phagocytosis (cannibalism) in human tumors: an update and literature review // *Exp. Oncol.* — 2012. — Vol. 34, №3. — P. 306–311.
6. Cavdar K., Ranasinghe A., Burkhart W. et al. A new face of apoptotic death-associated protein 3 and PDCD9 are mitochondrial ribosomal proteins // *FEBS Lett.* — 2001. — Vol. 492. — P. 166–170.
7. Cerretti D., Kozlovsky C., Moslay B. et al. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme // *Science*. — 1992. — Vol. 256. — P. 97–100.
8. Chalfant C., Rattman K., Pinkerman R. et al. De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase-9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells: Dependence on protein phosphatase-1 // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277, №15. — P. 12587–12595.
9. Chang Z., Lee S., Kim H. et al. Endotoxin activates de novo sphingolipid biosynthesis via nuclear factor kappa B-mediated upregulation of Sptlc2 // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* — 2011. — Vol. 94, №1–2. — P. 44–52.
10. Chen Y, Liu Y, Allegood J. et al. Imaging MALDI mass spectrometry of sphingolipids using an oscillating capillary nebulizer matrix application system // *Methods Mol. Biol.* — 2010. — Vol. 656. — P. 131–146.

11. Chinnaiyan A., Hanna W., Orth K. et al. Cytotoxic T-cell derived granzyme B activates the apoptotic protease ICE-LAP3 // *Curr. Biol.* — 1996. — Vol. 6. — P. 897–899.
12. Corre I., Niaudet C., Paris F. Plasma membrane signaling induced by ionizing radiation // *Mutat. Res.* — 2010. — Vol. 704, №1–3. — P. 61–67.
13. Duan H., Chinnaiyan A., Hudson P. et al. ICE-LAP3, a novel mammalian homologue of the *Caenorabditis elegans* cell death protein Ced-3 is activated during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis // *J. Biol. Chem.* — 1996. — Vol. 271. — P. 1621–1625.
14. Duan H., Orth K., Chinnaiyan A. et al. ICE-LAP6, a novel member of the ICE/Ced-3 gene family, is activated by he cytotoxic T cell protease granzyme B // *J. Biol. Chem.* — 1996. — Vol. 271. — P. 16720–16724.
15. Eckhart L., Ban, J., Fisher H., Tschachler E. Caspase-14: analysis of gene structure and mRNA expression during keratinocyte differentiation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2000. — Vol. 277. — P. 655–659.
16. Eckhart L., Ballaun C., Hermann M. et al. Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire // *Mol. Biol. Evol.* — 2008. — Vol. 25, №5. — P. 831–841.
17. El-Assaad W., El-Sabban M., Awaraji C. et al. Distinct sites of action of Bcl-2 and Bcl-xL in the ceramide pathway of apoptosis // *Biochem. J.* — 1998. — Vol. 336, Pt 3. — P. 735–741.
18. Elliott M., Chekeni F., Trampont P. et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance // *Nature.* — 2009. — Vol. 461, №7261. — P. 282–286.
19. Fabbi M., Marimpietri D., Martini S. et al. Tissue transglutaminase is a caspase substrate during apoptosis. Cleavage causes loss of transamidating function and is a biomedical marker of caspase-3 activation // *Cell Death Differ.* — 1999. — Vol. 6. — P. 992–1001.
20. Fischbeck A., Leucht K., Frey-Wagner I. et al. Sphingomyelin induces cathepsin D-mediated apoptosis in intestinal epithelial cells and increases inflammation in DSS colitis // *Gut.* — 2011. — Vol. 60, №1. — P. 55–65.
21. Gable K., Gupta S., Han G. et al. A disease-causing mutation in the active site of serine palmitoyltransferase causes catalytic promiscuity // *J. Biol. Chem.* — 2010. — Vol. 285, №30. — P. 22846–22852.
22. Garibal J., Hollville E., Renouf B. et al. Caspase-8-mediated cleavage of Bid and protein phosphatase 2A-mediated activation of Bax are necessary for Verotoxin-1-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma cells // *Cell Signal.* — 2010. — Vol. 22, №3. — P. 467–475.
23. Gouaze-Andersson V., Flowers M., Karimi R. et al. Inhibition of acid ceramidase by a 2-substituted aminoethanol amide synergistically sensitizes prostate cancer cells to N-(4-hydroxyphenyl) retinamide // *Prostate.* — 2011. — Vol. 71, №10. — P. 1064–1073.
24. Han G., Gupta S., Gable K. et al. Identification of small subunits of mammalian serine palmitoyltransferase that confer distinct acyl-CoA substrate specificities // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2009. — Vol. 106, №20. — P. 8186–8191.
25. Hanada K., Nishijima M., Fujita T., Kobayashi S. Specificity of inhibitors of serine palmitoyltransferase (SPT), a key enzyme in sphingolipids biosynthesis, in intact cell. A novel evaluation system using a SPT-defective mammalian cell mutant // *Biochem. Pharmacol.* — 2000. — Vol. 59, №10. — P. 1211–1216.
26. Havlioglu N., Wang J., Fushimi K. et al. An intronic signal for alternative splicing in the human genome // *PLoS One.* — 2007. — Vol. 2, №11. — P. e1246.
27. He X., Guan X., Ong W. et al. Expression, activity, and role of serine palmitoyltransferase in the rat hippocampus after kainate injury // *J. Neurosci. Res.* — 2007. — Vol. 85, №2. — P. 423–432.
28. Heinrich M., Wickel M., Schneider-Brachert W. et al. Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide // *EMBO J.* — 1999. — Vol. 18. — P. 5252–5263.
29. Hu W., Xu R., Sun W. et al. Alkaline ceramidase 3 (ACER3) hydrolyzes unsaturated long-chain ceramides, and its down-regulation inhibits both cell proliferation and apoptosis // *J. Biol. Chem.* — 2010. — Vol. 285, №11. — P. 7964–7976.
30. Humke E.W., Ni J., Dixit V.M. ERICE, a novel FLICE-activatable caspase // *J. Biol. Chem.* — 1998. — Vol. 273. — P. 15702–15707.
31. Huwiler A., Brunner J., Hummel R. et al. Ceramide-binding and activation defines protein kinase c-Raf as a ceramide-activated protein kinase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1996. — Vol. 93, №14. — P. 6959–6963.
32. Inohara N., Nunez G. The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens // *Oncogene.* — 2001. — Vol. 20, №44. — P. 6473–6481.
33. Jana A., Pahan K. Sphingolipids in multiple sclerosis // *Neuromolecular. Med.* — 2010. — Vol. 12, №4. — P. 351–361.
34. Kamachi M., Aramaki T., Tanimura S. et al. Activation of protein phosphatase causes alternative splicing of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): potential effect on immune surveillance // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2007. — Vol. 360, №1. — P. 280–285.
35. Kang M., Ahn K., Kim S. et al. Hypoxia-induced neuronal apoptosis is mediated by de novo synthesis of ceramide through activation of serine palmitoyltransferase // *Cell. Signal.* — 2010. — Vol. 22, №4. — P. 610–618.
36. Kartal M., Saydam G., Sahin F., Baran Y. Resveratrol triggers apoptosis through regulating ceramide metabolizing genes in human k562 chronic myeloid leukemia cells // *Nutr. Cancer.* — 2011. — Vol. 63, №4. — P. 637–644.
37. Kerr J.F.K., Wyllie A.H., Currie A.H. Apoptosis, a basic biological phenomenon with wider implications in tissue kinetics // *Br. J. Cancer.* — 1972. — Vol. 26. — P. 239–245.
38. Kim S., Kim H., Chun Y., Kim M. Ceramide produces apoptosis through induction of p27(kip1) by protein phosphatase 2A-dependent Akt dephosphorylation in PC-3 prostate cancer cells // *J. Toxicol. Environ. Health A.* — 2010. — Vol. 73, №21–22. — P. 1465–1476.
39. Kita K., Okino N., Ito H. Reverse hydrolysis reaction of a recombinant alkaline ceramidase of *Pseudomonas aeruginosa* // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2000. — Vol. 1485, №2–3. — P. 111–112.
40. Kleinegris M., Koek G., Mast K. et al. Ribavirin-induced externalization of phosphatidylserine in erythrocytes is predominantly caused by inhibition of aminophospholipid translocase activity // *Eur. J. Pharmacol.* — 2012. — Vol. 693, №1–3. — P. 1–6.
41. Kostecky B., Saurin A., Purkiss A. et al. Recognition of an intra-chain tandem 14-3-3 binding site within PKCepsilon // *EMBO Rep.* — 2009. — Vol. 10, №9. — P. 983–989.
42. Leffler J., Herbert A., Norstrom E. et al. Annexin-II, DNA, and histones serve as factor H ligands on the surface of apoptotic cells // *J. Biol. Chem.* — 2010. — Vol. 285, №6. — P. 3766–3776.
43. Liu X., Cheng J., Turner L. et al. Acid ceramidase upregulation in prostate cancer: role in tumor development and implications for therapy // *Expert. Opin. Ther. Targets.* — 2009. — Vol. 13, №12. — P. 1449–1458.
44. Liu X., Yang Z., Pan X. et al. Crotonaldehyde induces oxidative stress and caspase-dependent apoptosis in human bronchial epithelial cells // *Toxicol. Lett.* — 2010. — Vol. 195, №1. — P. 90–98.
45. Lucki N., Sewer M. Genistein stimulates MCF-7 breast cancer cell growth by inducing acid ceramidase (ASAHI) gene expression // *J. Biol. Chem.* — 2011. — Vol. 286, №22. — P. 19399–19409.
46. Maltesen H., Troelsen J., Olsen J. Identification of a functional hepatocyte nuclear factor 4 binding site in the neutral ceramidase promoter // *J. Cell. Biochem.* — 2010. — Vol. 111, №5. — P. 1330–1336.
47. Marques-da-Silva C., Burnstock G., Ojcius D., Coutinho-Silva R. Purinergic receptor agonists modulate phagocytosis and clearance of apoptotic cells in macrophages // *Immunobiology.* — 2011. — Vol. 216, №1–2. — P. 1–11.
48. Megidish T., Cooper J., Zhang L. et al. A novel sphingosine-dependent protein kinase (SDK1) specifically phosphorylates certain isoforms of 14-3-3 protein // *J. Biol. Chem.* — 1998. — Vol. 273, №34. — P. 21834–21845.
49. Mesicek J., Lee H., Feldman T. et al. Ceramide synthases 2, 5, and 6 confer distinct roles in radiation-induced apoptosis in HeLa cells // *Cell. Signal.* — 2010. — Vol. 22, №9. — P. 1300–1307.
50. Minarik J., Scudla V., Ordeleva M. et al. Prognostic significance of apoptotic index in multiple myeloma patients treated by conventional therapy and novel agents, thalidomide and bortezomib // *Eur. J. Haematol.* — 2009. — Vol. 83, №6. — P. 528–534.
51. Mizutani Y., Mitsutake S., Tsuji K. et al. Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function // *Biochimie.* — 2009. — Vol. 91, №6. — P. 784–790.
52. Mukhopadhyay A., Saddoughi S., Song P. et al. Direct interaction between the inhibitor 2 and ceramide via sphingolipid-protein binding is involved in the regulation of protein phosphatase 2A activity and signaling // *EB J.* — 2009. — Vol. 23, №3. — P. 751–763.
53. Mullen T., Jenkins R., Clarke C. et al. Ceramide synthase-dependent ceramide generation and programmed cell death: involvement of salvage pathway in regulating postmitochondrial events // *J. Biol. Chem.* — 2011. — Vol. 286, №18. — P. 15929–15942.
54. Novgorodov S., Chudakova D., Wheeler B. et al. Developmentally regulated ceramide synthase 6 increases mitochondrial Ca<sup>2+</sup> loading capacity and promotes apoptosis // *J. Biol. Chem.* — 2011. — Vol. 286, №6. — P. 4644–4658.

55. O'Neill S., Houck K., Yun J. et al. AP-1 binding transcriptionally regulates human neutral ceramidase // Arch. Biochem. Biophys. — 2011. — Vol. 511, №1–2. — P. 31–39.
56. Park J., Kim M., Kim Y., Woo J. Ceramide induces apoptosis via caspase-dependent and caspase-independent pathways in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue // Arch. Toxicol. — 2011. — Jan 23. — №1.
57. Park M., Mitchell C., Zhang G. et al. Vorinostat and sorafenib increase CD95 activation in gastrointestinal tumor cells through a Ca<sup>2+</sup>-de novo ceramide-PP2A-reactive oxygen species-dependent signaling pathway // Cancer Res. — 2010. — Vol. 70, №15. — P. 6313–6324.
58. Patwardhan G., Liu Y. Sphingolipids and expression regulation of genes in cancer // Prog. Lipid Res. — 2011. — Vol. 50, №1. — P. 104–114.
59. Pewzner-Jung Y., Brenner O., Braun S. et al. A critical role for ceramide synthase 2 in liver homeostasis: II. Insights into molecular changes leading to hepatopathy // J. Biol. Chem. — 2010. — Vol. 285, №14. — P. 10911–10923.
60. Pewzner-Jung Y., Park H., Laviad E. et al. A critical role for ceramide synthase 2 in liver homeostasis: I. Alteration in lipid metabolic pathways // J. Biol. Chem. — 2010. — Vol. 285, №14. — P. 10902–10910.
61. Pozuelo-Rubio M. Proteomic and biochemical analysis of 14-3-3-binding proteins during C2-ceramide-induced apoptosis // FEBS J. — 2010. — Vol. 277, №16. — P. 3321–3342.
62. Proksch D., Klein J., Arenz C. Potent inhibition of Acid ceramidase by novel B-13 analogues // J. Lipids. — 2011. — Vol. 2011. — P. 971618.
63. Rao R., Yuan C., Allegood J. et al. Ceramide transfer protein function is essential for normal oxidative stress response and lifespan // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2007. — Vol. 104, №27. — P. 11364–11369.
64. Renert A., Leprince P., Dieu M. et al. The proapoptotic C16-ceramide-dependent pathway requires the death-promoting factor Bfl in colon adenocarcinoma cells // J. Proteome Res. — 2009. — Vol. 8, №10. — P. 4810–4822.
65. Reyes J., Robayana I., Delgado P. et al. c-Jun is a downstream target for ceramide-activated protein phosphatase in A431 cells // J. Biol. Chem. — 1996. — Vol. 271, №35. — P. 21375–21380.
66. Ruckhaberle E., Holtrich U., Engels K. et al. Acid ceramidase 1 expression correlates with a better prognosis in ER-positive breast cancer // Climacteric. — 2009. — Vol. 12, №6. — P. 502–513.
67. Saito S., Matsui H., Kawano M. et al. Protein phosphatase 2Cepsilon is an endoplasmic reticulum integral membrane protein that dephosphorylates the ceramide transport protein CERT to enhance its association with organelle membranes // J. Biol. Chem. — 2008. — Vol. 283, №10. — P. 6584–6593.
68. Sandhoff R. Very long chain sphingolipids: tissue expression, function and synthesis // FEBS Lett. — 2010. — Vol. 584, №9. — P. 1907–1913.
69. Santana P., Llanes L., Hernandez I. et al. Interleukin-1 beta stimulates sphingomyelin hydrolysis in cultured granulose cells: evidence for a regulatory role of ceramide on progesterone and prostaglandin biosynthesis // Endocrinology. — 1996. — Vol. 137. — P. 2480–2489.
70. Seumois G., Fillet M., Gillet L. et al. De novo C16- and C24-ceramide generation contributes to spontaneous neutrophil apoptosis // J. Leukoc. Biol. — 2007. — Vol. 81, №6. — P. 1477–1486.
71. Singh P., Goel H., Husain M. et al. Tubular cell HIV-entry through apoptosed CD4 T cells: A novel pathway // Virology. — 2012. — Vol. 434, №1. — P. 68–77.
72. Siskind L., Mullen T., Romero-Rosales K. et al. The BCL-2 protein BAK is required for long-chain ceramide generation during apoptosis // J. Biol. Chem. — 2010. — Vol. 285, №16. — P. 11818–11826.
73. Sridevi P., Alexander H., Laviad E. et al. Stress-induced ER to Golgi translocation of ceramide synthase 1 is dependent on proteasomal processing // Exp. Cell. Res. — 2010. — Vol. 316, №1. — P. 78–91.
74. Sun W., Jin J., Xu R. et al. Substrate specificity, membrane topology, and activity regulation of human alkaline ceramidase 2 (ACER2) // J. Biol. Chem. — 2010. — Vol. 285, №12. — P. 8995–9007.
75. Sun Y., Zhang T., Gao P. et al. Targeting glucosylceramide synthase downregulates expression of the multidrug resistance gene MDR1 and sensitizes breast carcinoma cells to anticancer drugs // Breast Cancer Res. Treat. — 2010. — Vol. 121, №3. — P. 591–599.
76. Suzuki A., Iwasaki M., Kato M., Wagai N. Sequential operation of ceramide synthesis and ICE cascade in CPT-11 initiated apoptotic death signaling // Exp. Cell. Res. — 1997. — Vol. 233. — P. 41–47.
77. Tani M., Iida H., Ito M. O-Glycosylation of mucin-like domain retains the neutral ceramidase on the plasma membranes as a type II integral membrane protein // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278. — P. 301–308.
78. Tani M., Ito M., Igarashi Y. Ceramide/sphingosine/sphingosine-1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space // Cell Signal. — 2007. — Vol. 19, №2. — P. 229–237.
79. Thornberry N., Bull H., Calaycay J. et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes // Nature. — 1992. — Vol. 356. — P. 768–774.
80. Tsuruyama T., Okamoto S., Fujimoto Y. et al. Histology of intestinal allografts: lymphocyte apoptosis and phagocytosis of lymphocytic apoptotic bodies are diagnostic findings of acute rejection in addition to crypt apoptosis // Am. J. Surg. Pathol. — 2012. — Sep. 28.
81. Veret J., Coant N., Berdyshev E. et al. Ceramide synthase 4 and de novo production of ceramides with specific N-acyl chain lengths are involved in gluco-lipototoxicity-induced apoptosis of INS-1 beta-cells // Biochem. J. — 2011. — Vol. 438, №1. — P. 177–189.
82. Walker N., Talanian R., Brady K. et al. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)2 homodimer // Cell. — 1994. — Vol. 78, №2. — P. 343–352.
83. Widau R., Jin Y., Dixon S. et al. Protein phosphatase 2A (PP2A) holoenzymes regulate death-associated protein kinase (DAPK) in ceramide-induced anoikis // J. Biol. Chem. — 2010. — Vol. 285, №18. — P. 13827–13838.
84. Wilson K., Black J., Thomson J. et al. Structure and mechanism of interleukin-1 beta-converting enzyme // Nature. — 1994. — Vol. 370, №6487. — P. 270–275.
85. Yin X., Zafullah M., Lee H. et al. A ceramide-binding C1 domain mediates kinase suppressor of ras membrane translocation // Cell. Physiol. Biochem. — 2009. — Vol. 24, №3–4. — P. 219–230.
86. Yivgi-Ohana N., Eifer M., Addadi Y. et al. Utilizing mitochondrial events as biomarkers for imaging apoptosis // Cell. Death Dis. — 2011. — Vol. 2. — P. e166.
87. Yoshida S., Minematsu N., Chubachi S. et al. Annexin V decreases PS-mediated macrophage efferocytosis and deteriorates elastase-induced pulmonary emphysema in mice // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. — 2012. — Vol. 303, №10. — P. L852–L860.
88. Yuan J., Shalam S., Ledoux S. et al. The C.elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta converting enzyme // Cell. — 1993. — Vol. 75. — P. 641–652.
89. Zhou M., Horita D., Waugh D. et al. Solution structure and functional analysis of the cysteine-rich C1 domain of kinase suppressor of Ras (KSR) // J. Mol. Biol. — 2002. — Vol. 315, №3. — P. 435–446.
90. Zhu Q., Wang Z., Ji C. et al. C6-ceramide synergistically potentiates the anti-tumor effects of histone deacetylase inhibitors via AKT dephosphorylation and a-tubulin hyperacetylation both *in vitro* and *in vivo* // Cell. Death Dis. — 2011. — Vol. 2, №1. — P. e117.

## General concept of the role of sphingolipids in the signaling pathways of an apoptosis

Martinova E.A.

Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8, Baltiyskaya str., 125315, Moscow, Russia, e-mail: e.a.martinova@gmail.com

*This review gives the general concept of the main mechanisms of the programmed cell death called «apoptosis». The role of sphingolipids in the progress and regulation of an apoptosis is not well studied in spite of the numerous publications. It depends on a variety of sphingolipid molecules participating in the apoptotic pathways, the complicated system of their metabolism, the multilevel control of the implementation of functions as well as on a participation of sphingolipids in the majority of the lipid-dependent physiological and pathophysiological processes into cells and tissues. This review presents the some known cross-talking between ceramides and the apoptotic pathways as well as some possible tools for its regulation.*

**Key words:** sphingolipids, ceramides, apoptosis