

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
ИНСТИТУТ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ И  
НЕЙРОФИЗИОЛОГИИ

*На правах рукописи*

Яковлев Александр Александрович

Плейотропные протеазы в функционировании мозга: каспаза-3 и катепсин В

03.01.04 – биохимия

Диссертация  
на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научный консультант:  
доктор биологических наук, профессор  
Наталья Валерьевна Гуляева

Москва – 2016

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|   |     |
|---|-----|
| ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ: .....  | 4   |
| ВВЕДЕНИЕ.....   | 6   |
| ЧАСТЬ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....  | 13  |
| Каспазы в механизмах апоптотической клеточной гибели.....   | 13  |
| Роль каспазы-3 в нейродегенеративных заболеваниях.....  | 19  |
| Неапоптотическая роль каспазы-3 .....   | 22  |
| Неапоптотическая роль каспазы-3 в онтогенезе .....  | 25  |
| Неапоптотическая роль каспазы-3 в нейрональной пластичности .....                                       | 30  |
| Участие каспазы-3 в пролиферации и выживании клеток .....   | 51  |
| Участие каспазы-3 в дифференцировке .....   | 59  |
| Регуляция активности каспазы-3 .....  | 84  |
| Взаимодействие каспазы-3 с другими протеолитическими системами .....                                    | 92  |
| ЧАСТЬ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....   | 108 |
| ЧАСТЬ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....  | 116 |
| 1. ИССЛЕДОВАНИЕ НЕАПОПТОТИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ КАСПАЗЫ-3, СВЯЗАННЫХ С РЕАЛИЗАЦИЕЙ ФЕНОМЕНОВ ПЛАСТИЧНОСТИ..... | 116 |
| Роль каспазы-3 в дифференцировке клеток нейробластомы .....   | 116 |
| Участие каспазы-3 в долговременной пластичности гиппокампа .....  | 129 |
| Однократное введение морфина вызывает активацию каспазы-3 в мозге .....                                 | 132 |
| 2. ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПАРТНЕРОВ КАСПАЗЫ-3 В СИТУАЦИЯХ, НЕ СВЯЗАННЫХ С АПОПТОЗОМ ..... | 143 |
| Выявление партнеров каспазы-3 с помощью кросс-линкеров.....   | 143 |
| Специфичность взаимодействия каспазы-3 с ее партнерами в разных фракциях клеток головного мозга.....    | 149 |
| 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕАЗ МОЗГА, СПОСОБНЫХ РАСЩЕПЛЯТЬ СУБСТРАТ КАСПАЗЫ-3.....                             | 156 |
| Влияние pH на расщепление субстрата каспазы-3 протеазами мозга .....                                    | 156 |
| Идентификация протеаз, обладающих DEVDазной активностью в мозге .....                                   | 158 |
| Секреция протеазы, обладающей DEVDазной активностью.....  | 166 |
| Идентификация секретируемой протеазы.....   | 171 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....  | 182 |
| Регуляция активности каспаз в клетке .....  | 182 |

|   |     |
|---|-----|
| «Каспазо-катепсиновая мимикрия»: в какой степени измеряемая в мозге<br>активность принадлежит каспазе-3?..... | 189 |
| ВЫВОДЫ.....   | 192 |
| БЛАГОДАРНОСТИ.....  | 194 |

### ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ:

- Ac-DEVD-AMC – N-ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп-7-амино-4-метилкумарин
- Ac-DEVD-CHO – N-ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп-CHO
- Ac-IETD-AMC – N-ацетил-Иле-Глу-Вал-Асп-7-амино-4-метилкумарин
- Ac-LEHD-AMC – N-ацетил-Лей-Глу-Гис-Асп-7-амино-4-метилкумарин
- AMPA –  $\alpha$ -аминометилизоксазолпропионовая кислота
- APAF1 – фактор, активирующий апоптотические пептидазы
- CAD – каспазо-активируемая ДНКаза
- CARD – домен рекрутирования каспаз
- CD95 (Fas или APO-1) – один из рецепторов смерти
- CD95-L (Fas-L) – лиганд рецептора CD95
- DED – домен эффектора смерти
- DMEM – среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко
- DMP – диметил пимелимидат
- DSP – дитиобис-(сукцинимидил пропионат)
- EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид
- EGS – этиленгликоль бис-(сукцинимидил-сукцинат)
- GSH – глутатион,  $\gamma$ -глутамил-цистеинил-глицин
- ICAD – ингибитор каспазо-активируемой ДНКазы
- MALDI-TOF – масс-спектрометрия с ионизацией лазерной десорбцией при содействии матрицы с время-пролетным масс-анализатором
- NMDA – N-метил-D-аспартат
- PBS – забуференный фосфатом физраствор
- PMA – тетрадеcanoилфорбол ацетат
- Suc-LLVY-AMC – N-сукцинил-Лей-Лей-Вал-Тир-7-амино-4-метилкумарин
- Suc-LY-AMC – N-сукцинил-Лей-Тир-7-амино-4-метилкумарин
- TNF – фактор некроза опухоли

Z-DEVD-FMK – N-бензилоксикарбонил-Асп-Глу-Вал-Асп-фторметил-кетон

Z-FA-FMK – N-бензилоксикарбонил-Фен-Ала-фторметилкетон

Z-RR-AMC – N-бензилоксикарбонил-Арг-Арг-7-амино-4-метилкумарин

AMC – 7-амино-4-метилкумарин

БСА – бычий сывороточный альбумин

дАТФ – дезоксиаденозинтрифосфат

ПААГ – полиакриламидный гель

ПАРП – поли (АДФ-рибозил)полимераза

СА-074 – N-[L-3-транс-(пропилкарбамоил)-оксиран-2-карбонил]-L-изолейцил-L-пролин

ДП - долговременная потенция

ДД – долговременная депрессии

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

В последние две декады исследованию протеиназ головного мозга уделялось большое внимание в связи с их апоптотической функцией. Действительно, для целого ряда протеиназ, в частности, ферментов семейства цистеиновых протеиназ, каспаз, была показана их ключевая роль в гибели нервных клеток (Troy & Salvesen, 2002). Одна из самых исследованных каспаз, каспаза-3, является активным исполнителем программы апоптоза в головном мозге в пренатальном и раннем постнатальном периодах онтогенеза, когда происходит гибель значительной части нейронов (Urase et al, 2003), однако, ингибирование каспазы-3 во взрослом организме приводит к нарушению пластических процессов и снижению адаптивных возможностей мозга (Dash et al, 2000). Плейотропность функций этого фермента в мозге является существенным препятствием не только для понимания механизмов участия фермента в реализации нормальной нейропластичности, но и для направленного изменения активности фермента в мозге для практических целей. До сих пор механизм переключения между апоптотической и неапоптотической функциями каспазы-3 остается неизвестным. Выявление механизмов регуляции функций каспазы-3 в норме и при патологии позволит направленно их корректировать, предотвращая каспазо-зависимую гибель нейронов в патологических ситуациях (например, при нейродегенерации) или стимулируя ее (например, при канцерогенезе).

Каспаза-3 мозга является типичным плейотропным ферментом. При развитии церебральных патологий этот фермент опосредует как гибель нервных клеток, так и компенсаторные процессы, необходимые для выживания нейронов и нормального функционирования мозга в целом. Совершенно очевидно, что реализация противоположных функций каспазы-3 основана на расщеплении различных субстратов фермента (потенциально около 35 000 белков, в которых обнаружена соответствующая консенсусная

последовательность аминокислот (Earnshaw et al, 1999)). Поэтому попытки направленно влиять на процессы гибели и выживания нервных клеток, связанные с реакциями, катализируемыми каспазой-3, могут быть успешными только при идентификации ключевых субстратов фермента. И именно поэтому потерпели сокрушительный провал попытки блокирования каспазы-3 в мозге для лечения церебральных патологий, несмотря на ряд положительных эффектов, описанных в первую очередь в клеточных культурах и моделях на животных.

Каспаза-3 является основной каспазой млекопитающих, отвечающей за подавляющее большинство протеолитических событий при апоптозе (McStay et al, 2008) и является основным исполнителем внутриклеточной апоптотической программы в клетках головного мозга (Troy & Salvesen, 2002). В отличие от подробно исследованного участия каспазы-3 в апоптотических процессах, систематическое исследование участия каспазы-3 в исполнении неапоптотических функций в головном мозге до сих пор не проведено. В том числе, ранее не проводилось выявления субстратов – молекулярных партнеров каспазы-3 в мозге в условиях его нормального функционирования.

В начале 2000-х годов появился ряд обзоров, подытоживающих немногочисленные на тот момент свидетельства о функции каспаз в нормально функционирующем организме, в частности, в мозге (Algeciras-Schimmich et al, 2002). С тех пор в этой области проведен ряд обсуждаемых ниже значимых экспериментов, но реального прорыва не произошло. Очевидно, это связано с методическими трудностями идентификации конкретных субстратов, расщепление которых можно поставить в зависимость от определенной функции.

Мы предполагаем, что каспаза-3 не только принимает участие в подавляющем большинстве сценариев апоптоза в головном мозге, но и необходима для реализации важных неапоптотических процессов, таких, без которых невозможно выживание и функционирование нейронов. Выявление

дополнительных функций основного апоптотического фермента головного мозга поможет лучше понять патогенез различных заболеваний, биохимическую основу формирования нейрональных сетей в онтогенезе, приблизит науку к решению проблем, связанных с раком. Кроме того, крайне важным является вопрос о регуляции ферментативной активности белка, выполняющего несколько разных функций. Решение этой не столь часто встречающейся биохимической задачи позволит глубже понять механизмы «включения» и «выключения» разных функций одного и того же белка, а может и выявить новый класс белков со сходным механизмом переключения функций. Выявление плеiotропности каспазы-3 приблизит нас к пониманию механизмов адаптации клетки и организма в целом. Возможно, часть функций каспазы-3 связана с нейропластичностью, и выявление таких функций поможет понять функционирование мозга в целом.

### **Цель исследования**

С использованием моделей *in vivo* и *in vitro* исследовать функциональную роль в мозге плеiotропных протеаз, в частности, каспазы-3 и катепсина В.

### **Задачи исследования**

1. Исследовать неапоптотические функции каспазы-3, связанные с реализацией феноменов пластичности:
  - а) Исследовать участие протеаз в цАМФ-зависимой дифференцировке нейробластомы.
  - б) Исследовать влияние ингибитора каспазы-3 на долговременную пластичность в гиппокампе.
  - в) Исследовать участие каспазы-3 в реализации эффектов опиатов в мозге.



2. Исследовать спектр внутриклеточных партнеров каспазы-3 в норме и при индукции апоптоза стауроспорином на первичных культурах мозжечка.

3. Исследовать регионарную специфичность внутриклеточных взаимодействий каспазы-3 в мозге.

4. Исследовать возможность расщепления субстрата каспазы-3 другими протеазами (катепсином В, протеасомой) и влияние рН на расщепление субстрата каспазы-3 этими протеазами.

5. Исследовать возможность секреции нейронами фермента, обладающего каспазной активностью и его идентификация.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Каспаза-3 в головном мозге обладает плеiotропными свойствами: наряду с участием в апоптозе этот фермент вовлечен в нейропластичность, в частности, в дифференцировку клеток и долговременную потенцию.

2. Катепсин В и протеасома могут расщеплять субстрат каспазы-3. При снижении рН происходит переключение катепсина В на субстрат каспазы-3. Катепсин В секретируется из клетки, и секретируемая форма катепсина В может расщеплять субстрат каспазы-3 во внеклеточном пространстве.

3. Широкая субстратная специфичность протеаз мозга и способность разных ферментов расщеплять один и тот же субстрат являются основой плеiotропности протеаз и могут опосредовать формирование механизма локальной протеолитической регуляции функциональных и пластических изменений в головном мозге.

### **Научная новизна**

Впервые показано, что каспаза-3 принимает участие в цАМФ-зависимой дифференцировке клеток нейробластомы, причем ни каспаза-8, ни каспаза-9,

являющиеся основными активаторами каспазы-3 в каноническом апоптотическом каскаде не принимают участия в этом процессе. Также показано, что каспаза-3 не принимает участие в дифференцировке этих же клеток по протеинкиназа-С-зависимому пути.

Для выявления молекулярных партнеров каспазы-3 в различных функциональных состояниях был разработан метод с использованием кросс-линкеров, с помощью этого метода показано, что партнеры каспазы-3 различаются в норме и при индукции апоптотической гибели стауроспорином. С использованием этого же метода показано, что партнеры каспазы-3 различаются в разных отделах головного мозга.

Показано вовлечение каспазы-3 в реализацию феномена долговременной потенциации на срезах гиппокампа, так как ингибитор каспазы-3 блокирует этот феномен. Впервые установлено, что после однократной инъекции морфина активность каспазы-3 повышается только в стволе мозга, а других отделах мозга остается без изменений.

Впервые показано, что субстрат каспазы-3 могут расщеплять катепсин В и протеасома, причем интенсивность расщепления зависит от рН среды. Впервые показано, что обладающий активностью по отношению к субстрату каспазы-3 катепсин В секретируется нейронами в стрессовых для клетки состояниях. Полученные результаты позволили сформулировать новую концепцию регуляции плеiotропных ферментов в головном мозге.

### **Теоретическое и практическое значение**

Полученные результаты позволяют взглянуть на каспазу-3 как на фермент, на разных уровнях регулирующий нейропластичность. Вопреки сложившемуся мнению, каспаза-3 оказалась задействована в ряде процессов, не связанных с апоптозом. Этот результат имеет большое теоретическое и практическое значение. Показано, что фермент, как бы функционально

специфичен он ни был на первый взгляд, может иметь ряд других, не менее важных функций, при этом собственно функция фермента во многом зависит от контекста, т.е. множества других одновременно происходящих событий внутри клетки. Кроме того, полученные результаты позволяют говорить о том, что функция фермента во многом определяется доступностью субстратов этого фермента, от природы которых и будет зависеть реализуемая ферментом функция. В случае каспазы-3, и, вероятно, других плейотропных ферментов, разнообразие функций может быть поразительным, от быстрой реализации клеточной гибели, до вовлечения в процессы обучения и памяти. С другой стороны, участие каспазы-3 в реализации ряда неапоптотических функций ставит под вопрос терапевтическое ингибирование каспазы-3 при нейродегенеративных патологиях, в первую очередь, при инсульте. Именно поэтому ингибирование каспазы-3, даже показывая на определенном этапе развития патологии несомненные положительные эффекты, в долгосрочной перспективе всегда имеет негативный эффект. Только после изучения молекулярных механизмов исполнения каспазой-3 своих функций в разных физиологических состояниях можно будет реализовать задачу подавления одних функций этого фермента, не затрагивая при этом другие.

### **Апробация работы**

Материалы работы представлены на 6 отечественных и 4 зарубежных симпозиумах, в том числе на XX съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова, Москва, 2007, на конференции «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга», Санкт-Петербург, 2008, на международном конгрессе «Molecular Mechanisms of Neurological and Psychiatric Disorders», Мартин, Словакия, 2009, на конференции «Актуальные вопросы нейробиологии, нейроинформатики и

когнитивных исследований», Москва, 2010, на симпозиуме 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Сан-Диего, США, 2010, на всероссийской конференции с международным участием «Механизмы регуляции физиологических систем организма в процессе адаптации к условиям среды», Санкт-Петербург, 2010, на научно-практической конференции с международным участием «Нейрохимические подходы к исследованию функционирования мозга», Ростов-на-Дону, 2011, на конференции 8th FENS Forum of Neuroscience, Барселона, Испания, 2012, на конференции 9th FENS Forum of Neuroscience, Милан, Италия, 2014, на II всероссийской конференции с международным участием «Гиппокамп и память: норма и патология», Пущино, 2012.

Результаты работы обсуждены на межлабораторном семинаре 24 февраля 2016 года.

## ЧАСТЬ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Каспазы – семейство цистеиновых протеаз, расщепляющих полипептидную цепочку после остатка аспарагиновой кислоты. Открытые двадцать лет назад, каспазы привлекают внимание исследователей прежде всего в связи с участием в реализации программы апоптотической клеточной гибели. Ниже приведены основные результаты исследований каспаз за это время с акцентом на исследования в головном мозге, после чего представлены доказательства того, что каспазы также обладают широким спектром неапоптотических функций.

### **Каспазы в механизмах апоптотической клеточной гибели**

В настоящее время доказано, что центральную роль в запуске и развитии процесса апоптоза играют протеазы семейства каспаз (Earnshaw et al, 1999; Fuchs & Steller, 2011; Thornberry, 1997; Thornberry & Lazebnik, 1998; Yuan & Yankner, 2000). Неоднократно подтвердилось высказанное мнение (Thornberry & Lazebnik, 1998), что при апоптозе действуют довольно характерные, специфические протеазы семейства каспаз. Еще одной функцией протеаз этого семейства является участие в воспалении. К настоящему времени в различных клетках млекопитающих обнаружено 14 каспаз (у человека 12 из них), образующих ферментативный каскад, подобно ферментативному каскаду свертывающей системы крови или системы комплемента (Hengartner, 2000; Pop & Salvesen, 2009; Wolf et al, 1999).

Каспазы имеют высокую степень гомологии по своей аминокислотной последовательности, сходны по структуре и по субстратной специфичности (Grutter, 2000; Hengartner, 2000; McStay et al, 2008; Pop & Salvesen, 2009; Thornberry, 1997). Они синтезируются в виде проферментов (30-80 кДа), которые содержат 3 домена: N-концевой домен, большую субъединицу

(обычно более 20 кДа) и малую субъединицу (около 10 кДа). В клетке прокаспазы могут существовать в виде димеров, которые во время активации подвергаются протеолитическому отщеплению N-концевого домена, отличающегося наименьшей аминокислотной гомологией и наибольшей вариабельностью размера между разными каспазами, и образуют гетеротетрамер двух больших и двух малых субъединиц.

Каспазы можно довольно условно разделить на апоптотические (каспазы -3, -6, -7, -8 и -9 у млекопитающих) и каспазы, принимающие участие в воспалении (каспазы -1, -4, -5, -12 у человека и каспазы -1, -11, -12 у мыши). Каспазы -2, -10 и -14 не так просто классифицировать по этой схеме, так как они зачастую принимают участие и в апоптозе, и в воспалении. Среди апоптотических каспаз различают эффекторы, т. е. ферменты, непосредственно гидролизующие белки клетки (каспазы -3, -6, -7), и инициаторы – каспазы, которые принимают апоптотический сигнал и передают его на эффекторные каспазы (к инициаторным относятся каспазы -8 и -9) (Pop & Salvesen, 2009; Poreba et al, 2013).

Эффекторные прокаспазы не имеют в своем составе характерных доменов, необходимых для белок-белковых взаимодействий, и активируются только после протеолитического расщепления и последующей димеризации. В отличие от них, инициаторные прокаспазы имеют в составе своего N-концевого продомена участки, необходимые для белок-белковых взаимодействий (Taylor et al, 2008). Взаимодействие таких участков на инициаторных прокаспазах с белками-адапторами приводит к димеризации прокаспаз и их последующей активации. Прокаспазы-1, -2, -4, -5 и -9 содержат домен CARD (домен рекрутирования каспаз), а прокаспазы-8 и -10 содержат домен DED (домен эффектора смерти) (Taylor et al, 2008).

Каждый молекулярный каскад, приводящий клетку к апоптозу, характеризуется вовлечением определенного набора инициаторных и эффекторных каспаз, белков-адапторов, расщепляемых каспазами субстратов

и т.д., всего десятки разных ключевых для данного сценария апоптоза белков. Все эти каскады можно разделить на две большие группы по одному характерному признаку, а именно, по тому, приходит ли сигнал для запуска апоптоза извне или генерируется внутри клетки. Соответственно, первый тип называется внешним, а второй внутренним путем индукции апоптоза.

Внешний путь индукции апоптоза, иначе этот путь называется рецепторным, запускается при связывании внеклеточного лиганда со своим рецептором на мембране клетки. Рецепторы такого типа называются рецепторами смерти. Рецепторы смерти принадлежат к надсемейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNF) и включают в себя рецептор TNF 1 (TNFR1), CD95 (иначе называемый Fas или APO-1), рецептор смерти 3 (DR3), связанный с TNF рецептор апоптоз-индуцирующего лиганда 1 (TRAIL-R1 или DR4), TRAIL-R2 (известный как DR5). Собственно лигандами этих рецепторов являются TNF, лиганд CD95 (CD95-L или Fas-L), TRAIL (Apo2-L), TNF-подобный лиганд 1A (TL1A).

Связывание лиганда с рецептором смерти вызывает связывание мономерной прокаспазы-8 через ее DED домен с комплексом DISC (индуцирующий гибель сигнальный комплекс), который представляет собой цитоплазматическую часть активированного рецептора смерти и один из адапторных белков, FADD (FAS-ассоциированный домен смерти) или TRADD (TNFR-ассоциированный домен смерти) (Juo et al, 1998). Связывание прокаспазы-8 с этим комплексом приводит к ее димеризации и активации. Клетки, в которых отсутствует каспаза-8, устойчивы к апоптозу, индуцируемому рецепторами смерти, так же, как и клетки, в которых отсутствуют адапторные белки FADD или TRADD (Chen et al, 2008; Kang et al, 2004; Varfolomeev et al, 1998; Yeh et al, 1998).

В результате активации каспазы-8 рецептором смерти запускается молекулярный каскад клеточной гибели, но какой именно каскад зависит от типа клеток. В клетках одного типа каспаза-8 непосредственно инициирует

апоптоз, расщепляя и активируя эффекторные каспазы, в первую очередь каспазу-3. В клетках другого типа для эффективной индукции клеточной смерти каспаза-8 должна вначале активировать внутренний путь активации апоптоза, о котором речь пойдет ниже (Samraj et al, 2006). Клетки упомянутых первого и второго типа различаются, в первую очередь, содержанием внутриклеточных ингибиторов апоптоза, белков семейства IAP. Белки этого семейства ингибируют эффекторные каспазы, но сами эти ингибиторы подавляются белками, высвобождающимися из митохондрий при активации апоптоза по внутреннему пути (Jost et al, 2009; Spencer et al, 2009).

Внутренний путь запуска апоптоза также называется митохондриальным, так как митохондрии играют в нем ключевую роль. Существует большое число способов активации этого пути, каждый из которых в том или ином смысле можно назвать клеточным стрессом. Среди этих способов депривация ростовых факторов, нарушение цитоскелета, повреждение ДНК, накопление поврежденных белков, и многие другие. В онтогенезе такой тип апоптоза может запускаться гормонами (Brenner & Mak, 2009). Инициаторной каспазой при индукции апоптоза по внутреннему пути является каспаза-9. Ее активация происходит в результате димеризации прокаспазы-9, а димеризация запускается связыванием прокаспазы-9 с адапторным белком APAF1 (фактор, активирующий апоптотические протеазы) (Shiozaki et al, 2002).

Прокаспазы-9 и адапторный белок APAF1 находятся в цитоплазме клетки в виде неактивных мономеров. Если клетка испытывает стресс, то нарушается целостность мембран митохондрий, и в цитоплазму клетки поступает цитохром с. Цитохром с связывается с белком APAF1, что приводит к конформационным изменениям этого белка. В результате этих изменений с комплексом цитохром-АРАF1, связывается дезоксинуклеотид дАТР, что приводит ко второму конформационному изменению комплекса. Семь субъединиц цитохром-АРАF1-дАТР олигомеризуются в комплекс,



называемый апоптосомой. Апоптосома связывает прокаспазу-9 через CARD, что приводит к активации каспазы-9 (Acehan et al, 2002).

Клетки, лишённые цитохрома с, не способны активировать каспазы после индукции апоптоза по митохондриальному пути. При этом функции цитохрома с как транспортера электронов и активатора APAF1 не зависят друг от друга, так как опосредуются разными доменами в молекуле цитохрома с (Нао et al, 2005).

Ключевую роль играет надлежащее исполнение апоптотической программы при развитии мозга. Нейроны, которые не установили связи с соседями, должны умереть на ранних этапах развития организма. Мыши, дефицитные по каспазе-9, имеют избыточный размер мозга и большее, чем в норме, число нейронов (Kuida et al, 1998), так как не могут активировать апоптоз по митохондриальному пути. Кроме того, клетки животных, дефицитных по каспазе-9, устойчивы к индукции апоптоза ультрафиолетом и гамма излучением (Накем et al, 1998).

Существует еще один, очень специфический путь запуска апоптоза. Третий путь активации каспаз – при помощи сериновой протеазы гранзима В. Такой путь активации каспаз актуален в случае индукции апоптоза в клетке извне цитотоксическими Т-лимфоцитами, которые и секретируют эти ферменты (Kidd, 1998).

Суммируя, можно сказать следующее. Каспазы присутствуют в клетке конститутивно (даже в нейронах, которые не обновляются на протяжении всей жизни), что позволяет быстро индуцировать апоптоз. Один из путей активации каспаз связан с взаимодействием индуктора апоптоза со специфическими рецепторами на плазматической мембране и активацией каспазы-8, другой путь – активация каспазы-9 в результате активации апоптосомой (ДАТФ+АРАF1+цитохром с) (Pop & Salvesen, 2009).

Во всех сценариях апоптоза на последнем этапе происходит активация эффекторных каспаз. К эффекторным каспазам относятся кроме самой

изученной каспазы-3 также каспазы -6 и -7. Существенным отличием между разными эффекторными каспазами является их различная внутриклеточная локализация (Chandler et al, 1998), причем каспаза-3 локализована в цитоплазме, где происходят основные изменения при апоптозе, а каспаза-7 локализована в микросомальном компартменте. Еще одним отличием является чувствительность эффекторных каспаз к своим природным субстратам. Так, в клетке существуют субстраты, которые каспаза-3 и каспаза-7 расщепляют с примерно одинаковой эффективностью, но существует и другая группа субстратов, среди которых XIAP и гельзолин, которые расщепляются этими каспазами с существенно различной эффективностью (Walsh et al, 2008), причем в отношении большинства проверенных субстратов каспаза-3 является более эффективной, чем каспаза-7. Нокаут гена каспазы-3 приводит к существенному сокращению числа процессируемых после индукции апоптоза субстратов этого фермента, а в клетках MCF-7, в которых конститутивно отсутствует каспаза-3, характерный для апоптоза процессинг большинства белков вообще не происходит (Walsh et al, 2008). Также между эффекторными каспазами существуют и функциональные различия (Brentnall et al, 2013).

Таким образом, конечным эффектором в большинстве сценариев апоптоза является каспаза-3. Активацией именно этого фермента завершается инициаторная и начинается исполнительная стадия апоптоза. Именно каспаза-3 отвечает за апоптоз в том виде, в котором он виден в световой микроскоп. Этот фермент расщепляет огромное число внутриклеточных белков, что приводит к макроскопическим проявлениям апоптоза, таким как распад клетки на апоптотические тельца. Несмотря на то, что к эффекторным каспазам относятся кроме каспазы-3 также каспазы -6 и -7, основным исполнителем программы апоптоза в клетке является все же каспаза-3.

Среди молекулярных мишеней эффекторных каспаз идентифицированы сотни белков (на 2015 год строго идентифицированных более 700 белков, предполагаемых субстратов гораздо больше), деградация которых вызывает

развитие необратимых процессов, характерных для апоптоза (Fridman et al, 2013; Luthi & Martin, 2007; Yun et al, 2009). Это и цитозольные белки (Bcl-2, каспазы, белки цитоскелета и др.), и ядерные белки (ПАРП – поли (АДФ-рибозил)полимераза, ICAD, ламины, гистон H1, топоизомеразы, белки, отвечающие за сплайсинг мРНК, репликативный фактор С и др.) (Luthi & Martin, 2007).

Среди субстратов каспазы-3 ПАРП (Los et al, 2002; Nicholson et al, 1995) и ДНК-зависимая протеинкиназа (Han et al, 1996), два фермента, ответственные за репарацию поврежденной ДНК. Их инактивация в результате расщепления приводит к ингибированию репарации ДНК в клетке. Ядерные белки ламины являются субстратами каспазы-3 (Liu et al, 1997). Межнуклеосомальное расщепление ДНК, одна из основных характерных черт апоптотической клеточной гибели, происходит под действием фермента CAD (Enari et al, 1998). Однако в интактной клетке этот фермент находится в комплексе с ICAD и ингибируется (Enari et al, 1998), а каспаза-3 расщепляет этот ингибитор при апоптозе (Nagata, 2000). Отдельно стоит отметить, что расщепление каспазами может приводить как к активации, так и к инактивации субстрата.

В мозге фундаментальным процессом, связанным с подавляющим большинством сценариев апоптоза, является активация каспазного протеолитического каскада (Leist & Nicotera, 1998; Yuan & Yankner, 2000). Показано, что каспазы формируют основную протеолитическую систему, участвующую в нейрональном апоптозе (Troy & Salvesen, 2002; Yuan & Yankner, 2000). Весьма существенна роль каспаз в развитии мозга (Kuida et al, 1998), показано вовлечение каспаз в процессы нейродегенерации (Yuan & Yankner, 2000).

### **Роль каспазы-3 в нейродегенеративных заболеваниях**

Основные фундаментальные исследования каспаз при апоптотической клеточной гибели проходили в конце прошлого века и были в целом завершены в начале века нынешнего. Молекулярные механизмы исполнения каспазами своих функций при апоптозе, регуляторы каспазного апоптотического каскада, эволюция протеаз этого семейства – все эти исследования в целом закончены, лишь немногие исследователи продолжают выявлять подробности и особенности каспазных механизмов при апоптозе (Danial & Korsmeyer, 2004; Elmore, 2007; Jin & El-Deiry, 2005). Основное внимание в настоящее время исследователями многих биологических направлений, от эволюционистов до нейробиологов, уделяется практическому использованию накопленных данных. В настоящее время акцент публикаций, связанных с каспазами, явно смещен в сторону поиска активаторов каспаз для борьбы с развитием рака в клетках самого разного типа. Не такая большая, но все же заметная, часть каспазных исследований посвящена, наоборот, поиску ингибиторов каспаз при различных видах дегенерации, в первую очередь, при нейродегенерации.

Исследователи пытаются, используя накопленные данные о механизмах взаимодействия каспаз с белками и о регуляции ферментативной активности каспаз в клетке, создать низкомолекулярные вещества с искомым спектром действия и с их помощью научиться управлять каспазным каскадом. Самая востребованная тема каспазных работ в мозге – создание и применение каспазных ингибиторов при нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, инсульт.

Среди каспаз мозга каспаза-3 является наиболее активной и часто активируемой протеазой, активация каспазы-3 играет центральную роль в апоптозе нейронов различного типа (Troy & Salvesen, 2002). У мутантных мышей с отсутствующим геном каспазы-3 мозг размером в два раза больше, чем нормальный (Kuida et al, 1996). Такая мутация приводит к летальному

исходу или в течение эмбриогенеза, или вскоре после рождения (Kuida et al, 1996).

Более десяти лет известно об активации протеаз семейства каспаз при болезни Альцгеймера (Shimohama et al, 1999). В мозге пациентов с болезнью Альцгеймера происходит значительное увеличение экспрессии прокаспазы-3 и активной формы каспазы-3 в синапсах, в частности во фракции постсинаптической плотности в гиппокампе (Louneva et al, 2008). А именно с нарушения работы синапсов начинается дегенерация при этой патологии.

Выраженность дегенерации дофаминергических нейронов в мозге пациентов с болезнью Паркинсона положительно коррелирует с экспрессией каспазы-3 (Hartmann et al, 2000). В модели болезни Паркинсона на животных инактивация гена каспазы-3 в специфических областях мозга снижает экспрессию каспазы-3, значительно улучшает локомоторную активность и предотвращает гибель дофаминергических нейронов (Liu et al, 2013).

При ишемии мозга экспрессия белка и мРНК каспазы-3, а также ферментативная активность каспазы-3 возрастают в поврежденных участках мозга (Chen et al, 1998). При этом ингибитор каспазы-3 существенно снижает гибель клеток. С помощью методов иммуногистохимии и гибридизации *in situ* показана активация каспазы-3 в мозге пациентов, умерших от инсульта (Qi et al, 2004).

Выше процитированы лишь некоторые из внушительного числа работ, посвященных роли каспазы-3 при болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и инсульте. Кроме того, каспаза-3 принимает активное участие в клеточной смерти при повреждении мозга при травме (Clark et al, 1999) и в модели лимбических судорог (Henshall et al, 2000). К настоящему времени во многих экспериментальных и клинических ситуациях показана роль каспазы-3. А именно, каспаза-3 тесно связана с реализацией подавляющего большинства сценариев клеточной гибели в головном мозге, а специфические ингибиторы

каспазы-3 предотвращают гибель нейронов *in vitro* и *in vivo* во многих ситуациях.

### **Неапоптотическая роль каспазы-3**

Несмотря на все вышесказанное о роли каспазы-3 при апоптозе уже довольно давно стали появляться работы о неапоптотической роли каспазы-3 (Eumin et al, 1999; Fernando et al, 2002; Mogi & Togari, 2003; Oomman et al, 2004; Zhou et al, 1998a). В настоящее время каспазу-3 рассматривают как не только как фермент, принадлежащий к группе апоптотических каспаз, передающих и реализующих сигнал клеточной гибели. Сейчас становится ясным, что некоторые протеиназы – не просто ферменты деградации, но и строго регулируемые сигнальные молекулы, контролирующие критические биологические процессы путем специфического ограниченного протеолиза. Мнение о том, что каспазы – не только убийцы (Los et al, 2001), находит подтверждение в результатах, полученных в последние годы и свидетельствующих о том, что каспазы участвуют в различных неапоптотических клеточных физиологических процессах. Каспаза-3 принимает участие в регуляции клеточного цикла (Eumin et al, 1999; Khalil et al, 2014; Yang et al, 2005; Zhou et al, 1998a), процессинге цитокинов (Zhang et al, 1998), дифференцировке миоцитов и нейробластов (Fernando et al, 2005; Fernando et al, 2002; Larsen et al, 2010) и клеток-предшественников при гематопозе (Di Vacco & Cotter, 2002), развитии волокон хрусталика (Ishizaki et al, 1998; Weil et al, 1999), пролиферации Т лимфоцитов (Alam et al, 1999; Kennedy et al, 1999) и многих других процессах. Иными словами, каспаза-3 имеет плеiotропные функции (D'Amelio et al, 2010; Fadeel et al, 2000; Sheng & Ertuerk, 2014), далеко не ограничивающиеся участием в реализации внутриклеточной апоптотической программы.

К настоящему времени накоплено не очень много данных о неапоптотической роли каспазы-3 в мозге. Однако, некоторые результаты,

полученные отечественными и зарубежными учеными, позволяют предположить, что каспаза-3, участвующая в гибели нейронов как в физиологических, так и в патологических ситуациях, может принимать участие в связанной с развитием мозга пластичности нейронов, а также в иных формах нейропластичности. Так, некоторые механизмы апоптотического сигналинга регулируют синаптическую пластичность и подвижность конусов роста (Gilman & Mattson, 2002). Показано, что ферменты апоптотического каскада активируются локально в синапсах, нейритах и конусах роста. Более того, введение панкаспазного ингибитора в первичную культуру эмбриональных нейронов гиппокампа приводит к значительному увеличению скорости роста аксонов и дендритов (Gilman & Mattson, 2002).

Локальная, быстрая активация каспазы-3 в конусах роста клеток сетчатки необходима для установления правильных нейрональных связей (Campbell & Holt, 2003). На этой модели также впервые показано, что каспаза-3 также может принимать участие в другом, отличном от каспазного каскаде, так как ее активация блокируется ингибитором протеасомы лактацистином и ингибитором калпаина LnLL, но не ингибитором цистеиновых катепсинов E64 (Campbell & Holt, 2003). В этой ситуации активация каспазы-3 пространственно ограничена конусом роста аксона (Campbell & Holt, 2003).

Группой японских ученых продемонстрирована различная экспрессия белков семейства каспаз в мозге крысы при развитии и старении, а также различная внутриклеточная локализация этих белков в мозге взрослых крыс (Shimohama et al, 2001a; b). Установлено, что уровень экспрессии каспазы-3 в мозге изменяется с возрастом, а в клетках головного мозга взрослых крыс этот фермент присутствует во всех внутриклеточных компартментах (Shimohama et al, 2001a; b). В ядре и в нейритах каспаза-3 в норме имеет уровень экспрессии лишь немного ниже, чем в цитоплазме (Shimohama et al, 2001b). Функциональная значимость такого распределения фермента пока неясна, однако авторы предположили, что каспаза-3, как и другие представители

семейства каспаз, в норме вовлечена не только в реализацию механизмов гибели нейронов, но и в синаптическую пластичность.

В самых первых работах, посвященных изучению каспаз при апоптозе, уже была показана различная субклеточная локализация каспазы-3 и каспазы-7 (Chandler et al, 1998). Оба эти фермента расщепляют полипептидную цепочку, распознавая консенсусную последовательность DEVD, и активируются в печени мышей после внутрибрюшинной инъекции антитела против белка Fas (Chandler et al, 1998). В печени мышей через 4 часа после инъекции наблюдается характерная для апоптоза морфологическая картина, и активируются обе протеазы, каспаза-3 и каспаза-7. Самое интересное, что каспаза-3 содержится в неактивной форме, а затем активируется только в цитозоле, а каспаза-7 в неактивной форме присутствует в цитозоле и микросомах, а ее активная форма обнаруживается только в митохондриальной и микросомальной фракции гепатоцитов этих животных (Chandler et al, 1998). Также в этой работе показано, что DEVDазная активность, пусть и не очень выраженная, присутствует в норме во всех исследованных субклеточных фракциях, но, видимо, не связана с наличием активной формы каспаз (Chandler et al, 1998).

Иммунореактивность активной каспазы-3 продемонстрирована в пролиферирующих областях мозга крыс в первые две недели постнатального развития (Yan et al, 2001). В этот период активная каспаза-3 локализована в основном в ядрах, причем в тех клетках, где не происходит фрагментации ДНК (Yan et al, 2001). Кроме того, данные электронной микроскопии позволяют предположить, что активная форма каспазы-3 находится в ядрах пролиферирующих клеток, которые затем дифференцируются и мигрируют в обонятельную луковицу (Yan et al, 2001). Авторы предположили, что активная каспаза-3 играет важную роль в таких клеточных процессах, как дифференцировка, миграция и пластичность нейронов.



В тельцах Хирано (включения в отростках нейронов поля CA1 гиппокампа) продемонстрировано наличие иммунореактивности фрактина – продукта расщепления актина каспазой-3 (Rossiter et al, 2000). Эти данные позволяют сделать предположение об участии каспазоподобной активности в нейрональных процессах, не связанных с острым апоптозом в нейрональном перикарии. Более того, некоторые данные свидетельствуют о вовлечении каспазы-3 в механизмы ишемической толерантности мозга. На модели ишемической толерантности *in vivo* было показано, что в прекондиционированной нервной ткани происходит активация каспазы-3 без признаков апоптоза, а на модели эксайтотоксической толерантности – блокада окислительного фосфорилирования *in vitro* (в нейрональной культуре) – ингибитор каспазы-3 блокирует вызванную ишемией защиту от NMDA (McLaughlin et al, 2003).

Приведенные данные являются первым свидетельством существования нейропротекторного пути, в котором опосредованные каспазой-3 события, обычно связываемые с апоптотической гибелью клеток, критичны для выживания клеток (McLaughlin et al, 2003). Таким образом, каспаза-3 может в некоторых ситуациях прямо выступать как антиапоптотический фермент.

### **Неапоптотическая роль каспазы-3 в онтогенезе**

Для нормального функционирования мозга особенно важное значение имеет правильное исполнение программы клеточной гибели в период раннего онтогенеза. В этот период развития происходит не только гибель целых нейронов, но и регулируемое отмирание нейрональных отростков. Наиболее интенсивный апоптоз в мозге происходит в период позднего пренатального и раннего постнатального онтогенеза (Yuan & Yankner, 2000), в последующие периоды апоптотические каскады в нейронах усиленно подавляются, так что нейроны могут выживать в течение всей жизни организма. Соответственно, периоды активной гибели молодых нейронов характеризуются повышенной

чувствительностью каспазы-3 к активации, а в последующие периоды активация каспазы-3 в зрелых нейронах существенно ограничена. Так, активация каспазы-3 в гомогенатах коры головного мозга крысы под действием типичных активаторов этого фермента, цитохрома с и дАТР, происходит наиболее интенсивно на 17-й эмбриональный день и в дальнейшем неуклонно падает, в 10 раз к 14-му постнатальному дню и практически исчезает к третьему месяцу жизни (Yakovlev et al, 2001). Такое существенное снижение общей способности к активации связано со снижением экспрессии мРНК проформы самой каспазы-3 и белка-активатора апоптотических протеиназ АРАF1, а также соответствующих белков, но не мРНК и белка каспазы-9 (Yakovlev et al, 2001). Интересно, что снижение уровня АРАF1 в зрелых нейронах сопровождается изменениями структуры хроматина, и чтобы увеличить экспрессию этого белка в зрелых нейронах, клетка должна не только экспрессировать соответствующие транскрипционные факторы, но и вынуждена выполнять перестройку хроматина (Wright et al, 2007). В культуре первичных нейронов сохраняется похожая динамика снижения способности активироваться каспазы-3 в зависимости от продолжительности жизни клеток в культуре, между первым и 14-м днем культивации происходит пятикратное снижение (Yakovlev et al, 2001).

После окончания периода раннего онтогенеза также происходит снижение экспрессии генов проапоптотических белков, активаторов каспазного каскада (Kole et al, 2011). Так, симпатические нейроны на 5-й постнатальный день погибают при депривации трофических факторов, индукции повреждения ДНК или под действием стресса в эндоплазматическом ретикулуме, а на 28-й постнатальный день становятся уже полностью нечувствительны к этим воздействиям (Kole et al, 2011). Эффект опосредован снижением экспрессии проапоптотических белков семейства Bcl-2 под действием миРНК (Kole et al, 2011).

Таким образом, в период раннего постнатального онтогенеза происходит существенное угнетение молекулярных механизмов, способных привести нейрон к гибели. Однако, на протяжении всей жизни нейрона ему необходимо сохранять способность к специфической перестройке аксонов для реализации феноменов нейрональной пластичности. В частности, аксон может быть полностью разрушен как при апоптозе, так и при аксональной дегенерации. Оказывается, частичное разрушение нейрона также происходит при участии каспазы-3.

Первые гипотезы о вовлеченности каспаз в реализацию процессов локального разрушения аксонов появились практически одновременно с доказательствами вовлеченности каспаз в нейродегенеративные процессы (Mattson & Duan, 1999). Можно выделить несколько положений, ставших основой для гипотезы о вовлечении каспаз в локальные, не затрагивающие ядро и перинуклеарное пространство, процессы в нейроне: (1) апоптотические каскады инициируются на уровне синапсов; (2) антиапоптотические процессы также происходят в синапсах; (3) апоптотические сигнальные каскады играют важную роль в реализации феноменов синаптической пластичности (Mattson & Duan, 1999). Одним из первых свидетельств локальной активации каспазы-3 было то, что в нейронах гиппокампа при депривации трофических факторов активация каспазы-3 происходила в аксонах (Mattson et al, 1998). Также локально, но на этот раз в дендритах, активируется каспаза-3 при действии стауроспорина или амилоидного пептида (Duan et al, 1999). Независимо от того, в каком компартменте, в аксоне или дендритах, каспаза-3 была первоначально активирована, в дальнейшем «волна» активации каспазы-3 распространяется в сторону ядра (Duan et al, 1999; Mattson et al, 1998). Однако, даже при невысоком уровне активации каспазы-3 в локальных компартментах в нейронах, этот фермент расщепляет AMPA рецептор глутамата, ограничивая приток кальция в клетку (Chan et al, 1999). Более того, локальное действие физиологических концентраций глутамата на дендриты приводит к локальной

активации каспазы-3 в этом компартменте (Mattson et al, 1998). Таким образом, в нейронах каспаза-3 может быть активирована локально в аксонах или дендритах, и ее активация может иметь значение для реализации феноменов пластичности.

Одним из важных пластических изменений, которые требуют структурных перестроек клетки, является обрезка аксонов (Wang et al, 2012). Происходящие в раннем онтогенезе обрезка аксонов и апоптоз нейронов определяют формирование нейрональных цепей в зрелом мозге, причем в обоих этих процессах принимают участие каспазы (Nikolaev et al, 2009). Оказывается, процесс аксональной дегенерации сенсорных нейронов через 48 ч после депривации фактора роста нервов проходит с участием каспазы-6 и проапоптотического белка Вах, но не каспазы-3 (Nikolaev et al, 2009). При этом дегенерация самих нейронов происходит при участии каспазы-3 (Nikolaev et al, 2009).

Необходимость каспазы-6 для аксональной дегенерации подтверждена и на мышцах, нокаутных по гену каспазы-6 (Simon et al, 2012). Но, оказывается, эффективно активировать каспазу-6 способна лишь каспаза-3, но не другие каспазы (Simon et al, 2012). При этом каспаза-3 все же необходима для дегенерации аксонов сенсорных нейронов при депривации трофических факторов, но не для дегенерации аксонов в результате повреждения, так называемой валлеровской дегенерации (Cusack et al, 2013; Simon et al, 2012). Каскад биохимических реакций, приводящий к активации каспазы-6 в аксоне, включает в себя активацию проапоптотического белка Вах, затем активацию каспазы-9, затем каспазы-3, и после этого каспазы-6 (Cusack et al, 2013; Simon et al, 2012). При этом для активации каспазы-6 достаточно небольшого количества каспазы-3, столь малого, что, возможно, не все экспериментаторы смогли его обнаружить (Simon et al, 2012). Результаты экспериментов *in vitro* подтверждаются экспериментами *in vivo* на мутантных по генам каспазы-3 и каспазы-6 мышцах (Simon et al, 2012).

Понятно, что для достижения некоторых специальных целей структурной пластичности в аксоне могут быть активированы каспазы, но почему активация этих ферментов не затрагивает сому, как тело клетки защищено от гибели в таком случае, остается во многом невыясненным вопросом. В этом вопросе в последнее время также появились новые интересные наблюдения. Так, каспазы-3, -6 и -9 активируются в аксонах сенсорных нейронов при депривации трофических факторов, и белок Вах и цитохром с принимают участие в каспазной активации (Cusack et al, 2013). При этом ингибирование протеасомы вдовое увеличивает дегенерацию аксонов и практически десятикратно увеличивает число каспаза-3-позитивных тел нейронов, что говорит о том, что в теле клетки протеасома отвечает за инактивацию каспаз (Cusack et al, 2013). Еще одним белком, ограничивающим активность каспаз в теле клеток, является белок XIAP, так как нокаут по гену этого белка многократно усиливает активацию каспазы-3 в соме нейронов (Cusack et al, 2013). В процессе онтогенеза чувствительность к депривации трофических факторов также меняется. Так, у незрелых нейронов локальная депривация аксонов фактора роста нервов локально вызывает аксональную дегенерацию, а полная депривация всей клетки вызывает апоптоз. У зрелого нейрона полная депривация не вызывает ни гибели клеток, ни аксональной дегенерации, тогда как локальная депривация аксона приводит к дегенерации аксона (Cusack et al, 2013).

В некоторых работах роль каспазы-3 в дегенерации аксонов после депривации трофических факторов предстает даже более значительной, чем роль каспазы-6 (Unsain et al, 2013). При этом каспаза-9 при любом экспериментальном подходе играет роль в активации каспазного каскада при аксональной дегенерации. При этом белок XIAP играет роль основного сдерживающего фактора для каспаз в процессе аксональной дегенерации в результате депривации трофических факторов, и в его отсутствие дегенерация, опосредованная каспазами, усиливается как минимум двукратно (Unsain et al,

2013). Необходимым условием для начала дегенерации аксонов является снижение уровня XIAP, причем это снижение опосредуется протеасомой (Unsain et al, 2013). При всей важности XIAP для сценария дегенерации аксонов при депривации трофических факторов, этот белок не влияет на валлеровскую дегенерацию (Unsain et al, 2013). Таким образом, в аксоне действуют молекулярные механизмы, как сдерживающие, так и стимулирующие каспазо-зависимую аксональную дегенерацию. Среди низкомолекулярных регуляторов этого процесса можно назвать, в частности, NAD<sup>+</sup>, который, действуя локально на митохондрии аксона, способен сдерживать дегенерацию аксона (Magnifico et al, 2013).

### **Неапоптотическая роль каспазы-3 в нейрональной пластичности**

В связи со всем изложенным неудивительно, что постепенно начинают появляться данные, свидетельствующие о том, что наряду с вовлеченностью в процессы клеточной гибели, каспаза-3 может играть важную роль в модуляции синаптической пластичности и при отсутствии гибели клеток. Это может выражаться в участии каспазы в структурных перестройках и длительных функциональных изменениях нейронов. Обнаружено, что апоптотические биохимические каскады могут быть локально активированы в синаптических окончаниях и нейритах и такая активация может приводить к локальным функциональным и морфологическим изменениям. Высказано предположение (Mattson & Duan, 1999), что локальная активация ферментов семейства каспаз может происходить в синаптических терминалях в ответ на различные стимулы. Вполне возможно, что «апоптотические каскады» функционируют в континууме, в котором низкие уровни активации играют важную роль в адаптивных ответах на действие стрессорных факторов, в то время как высокие уровни активации опосредуют синаптическую дегенерацию и гибель клеток (Mattson et al, 1998).

Апоптотические синаптические каскады, участвующие в нейрональной пластичности, включают активацию каспаз (Mattson & Duan, 1999), которые в свою очередь могут расщеплять субъединицу GluR1 ионотропных глутаматных рецепторов (Chan et al, 1999; Meyer et al, 2002) и таким образом модифицировать синаптическую пластичность. Мэттсон с соавт. (Mattson & Duan, 1999; Mattson et al, 1998) рассматривают каспазы в основном как апоптотические ферменты, что вызывает целый ряд противоречий, в частности, авторы обсуждают феномен «синаптического апоптоза», что противоречит принятому определению апоптоза, в котором обязательными участниками являются события в ядре клетки. Стоит разрешить это противоречие следующим способом: сказать, что каспазы – ферменты, функционирующие как в нормальных, так и в гибнущих нейронах, но в этих двух ситуациях они выполняют разные функции.

Показано непосредственное расщепление субъединицы GluR1 AMPA рецептора глутамата и подавление вызванных AMPA токов каспазой-3 (Chan et al, 1999; Glazner et al, 2000; Lu et al, 2002; Meyer et al, 2002). Глутаматные рецепторы играют важную (возможно, стоит сказать – важнейшую) роль в процессах долговременной потенциации (ДП) и долговременной депрессии (ДД), именно в тех процессах, которые в настоящее время принято считать молекулярной и клеточной основой научения и памяти (Lamprecht & LeDoux, 2004; Lynch, 2004). Впервые было получено экспериментальное подтверждение участия каспазы-3 в ДП (Gulyaeva et al, 2003). Под действием необратимого, проникающего в клетки, специфического ингибитора каспазы-3 происходит нарушение ДП. Срезы гиппокампа крысы инкубировали с ингибитором каспазы-3 Z-DEVD-FMK или с неактивным пептидом Z-FA-FMK в течение 30 мин. Пептиды не влияли на базальные показатели синаптической пластичности и кратковременную пластичность в поле CA1 гиппокампа. Однако через 2.6 ч и инкубации срезов с Z-DEVD-FMK ДП была достоверно снижена по сравнению с ДП в срезах, обработанных контрольным

пептидом. Через 3.5 ч ДП была полностью заблокирована. Величина ДП в срезах с Z-DEVD-FMK зависела от времени после инкубации, что позволяет авторам предполагать вовлеченность в молекулярные механизмы ДП субстратов каспазы-3 или продуктов протеолиза белков каспазой-3. Эти результаты – первое прямое доказательство того, что каспаза-3 необходима для феномена долговременной синаптической пластичности. Важно отметить, что ингибитор каспазы-3 специфически влиял именно на длительную пластичность, не оказывая эффекта на базальную синаптическую трансмиссию и кратковременную пластичность (Gulyaeva et al, 2003). Все эти данные свидетельствуют о роли каспаз в модуляции возбудимости нейронов в физиологических условиях.

Каспаза-3 вовлечена в реализацию феноменов нейропластичности у улитки (Bravarenko et al, 2006). У этих животных также присутствует протеаза, аналогичная каспазе-3 млекопитающих, стимулируемая стауроспорином. Этот аналог каспазы-3 с помощью нескольких подходов идентифицирован в центральной нервной системе улитки, а его ингибирование предотвращает развитие долговременной сенситизации, особой формы синаптической пластичности у этих животных (Bravarenko et al, 2006). Данная работа является первым свидетельством вовлечения каспазы-3 (в данном случае ее аналога) в нейропластичность у беспозвоночных.

Представленные выше данные, полученные на моделях *in vitro*, весьма убедительны с точки зрения вовлеченности каспазы-3 в феномены пластичности в нервной системе. Имеются также результаты экспериментов *in vivo*, подтверждающие эту концепцию. Например, Даш с соавт. (Dash et al, 2000) сообщили о том, что введение ингибиторов каспазы-3 в гиппокамп блокирует долговременную пространственную память у крыс. Этот факт органично встраивается в предположение о том, что опосредованные каспазой клеточные события в нейронах гиппокампа могут быть критическими для сохранения долговременной пространственной памяти. Введение в мозг



ингибитора каспазы-1 улучшает память, предположительно из-за того, каспаза-1 подавляет нейрогенез (Gemma et al, 2007; Gemma et al, 2005). На гиппокампальных срезах ингибитор каспазы-1 усиливает долговременную потенциацию (Lu et al, 2006).

Долговременная потенциация и долговременная депрессия являются основой реализации пластичности нервных клеток (Malenka & Bear, 2004). При стимуляции определенных аксонов в головном мозге с помощью высокочастотного электрического раздражения развивается феномен так называемой долговременной потенциации, ДП, когда увеличивается эффективность синаптической передачи в тех синапсах, где происходило раздражение. Противоположный эффект имеет долговременная депрессия, ДД, когда после низкочастотного электрического раздражения снижается эффективность синаптической передачи. ДП и ДД имеют место в глутаматергических синапсах и опосредованы различными подтипами глутаматных рецепторов: NMDA, AMPA, каинатными и метаботропными (Malenka & Bear, 2004). В частности, низкочастотная стимуляция NMDA рецепторов вызывает интернализацию AMPA рецепторов, и при последующей стимуляции синапса ответ клетки снижается за счет того, что снижается содержание AMPA рецепторов на мембране и уменьшается опосредованный этими рецепторами ток кальция в клетку.

Оказывается, каспазы необходимы для выработки ДД в гиппокампе за счет участия в процессе интернализации AMPA рецепторов (Li et al, 2010b). Так ингибиторы каспазы-3 DEVD-FMK и каспазы-9 LEHD-FMK блокируют выработку ДД, но не влияют на ДП (Li et al, 2010b). Ингибиторы каспазы-1 YVAD-FMK и каспазы-8 WEHD-FMK, также как и ингибитор катепсинов FA-FMK, не влияют ни на ДД, ни на ДП, а ингибитор калпаина LLY-FMK предотвращает и то, и другое (Li et al, 2010b). Ингибиторы апоптоза, белок Bcl-xL, ингибирующий высвобождение проапоптотических факторов из митохондрий, и белок XIAP, прямой ингибитор каспаз-3 и -9, блокируют ДД,

но не ДД, тогда как селективный ингибитор каспаз-1 и -8 CrmA не влияет на ДД и ДП (Li et al, 2010b). Оверэкспрессия белков Vcl-xL и XIAP вызывает увеличение амплитуды сигнала, опосредованного AMPA рецептором, но не изменяет амплитуду сигнала, опосредованного NMDA рецептором. Мыши, нокаутные по гену каспазы-3, не способны выработать ДД, при этом экспрессия других белков, связанных с долговременными изменениями синапса (субъединиц AMPA и NMDA глутаматных рецепторов), у этих животных не изменяется.

Механизм выработки ДД непосредственно связан с участием каспазы-3 в интернализации AMPA рецептора, так как ингибирование каспазы-3, а также нокаут по генам Vcl-xL, XIAP и каспазы-3 предотвращает интернализацию AMPA рецепторов (Li et al, 2010b). Особый интерес вызывает динамика активации каспазы-3 в процессе структурных изменений в синапсе. Активация каспазы-3 при индукции долговременной депрессии начинается сразу после индукции, выходит на максимум, в два раза превышающий контрольный уровень, через 30 мин и медленно снижается до контрольного уровня за несколько часов (Li et al, 2010b). Активация каспазы-3 при гибели нейронов, вызванной стауроспорином, начинается лишь через два часа после индукции, но за последующие два часа возрастает до уровня, в 17 раз выше контрольного, и остается значительно повышенной в течение последующих часов (Li et al, 2010b). При индукции долговременной депрессии в цитозоле появляется, а затем исчезает цитохром c, причем динамика этого процесса очень похожа на каспазную.

Некоторая ясность достигнута в вопросе молекулярных механизмов вовлечения каспазы-3 в ДД. Оказывается, что экспрессия устойчивой к расщеплению каспазой-3 мутантной формы протеинкиназы Akt1 полностью подавляет индукцию ДД (Li et al, 2010b). Протеинкиназа Akt1, как предполагается, фосфорилирует субъединицы AMPA рецепторов, а каспаза-3 косвенным образом подавляет это фосфорилирование (Li et al, 2010b). Кроме

того, показано, что протеинкиназа Akt1 является одним из основных регуляторов эндоцитоза в нейронах после интенсивной нейрональной активности (Smillie & Cousin, 2012). Конститутивно активная изоформа Akt1 полностью предотвращает эндоцитоз в нейронах после нейрональной активности (Smillie & Cousin, 2012). Каспаза-3 расщепляет Akt1, причем Akt1 теряет свою активность (Li et al, 2010b).

Изучение молекулярных механизмов вовлечения каспазы-3 в ДД было продолжено. К настоящему времени также получены данные о том, как именно каспаза-3 вовлечена в интернализацию AMPA рецепторов (Han et al, 2013). Был установлен субстрат каспазы-3 в этом процессе, белок Gap43, расщепление которого каспазой нарушает интернализацию AMPA рецепторов и нарушает выработку ДД (Han et al, 2013). Авторами показано, что мутантный по сайту расщепления каспазой-3 (устойчивый к расщеплению этой протеазой) Gap43 ингибирует ДД и нарушает интернализацию AMPA рецепторов. Белок Gap43 локализован в постсинаптических уплотнениях и в мембране постсинаптических нейронов, и активация каспазы-3 и все регуляторные процессы, с этим связанные, видимо, также происходят в отростках клеток (Han et al, 2013). Таким образом, расщепление белков Akt1 и Gap43 каспазой-3 необходимо для ДД.

Особенную роль каспаза-3 играет и при ДП, но не на этапе выработки, а на этапе подавления, что с электрофизиологической точки зрения как раз перекликается с известной ролью каспазы-3 в выработке ДД (Jo et al, 2011). Установлено, что олигомерные формы  $\beta$ -амилоида подавляют выработку ДП и недавно был прояснен механизм, по которому это происходит (Jo et al, 2011). Оказывается, эффекты  $\beta$ -амилоида на выработку ДП устраняются в клетках, оверэкспрессирующих известный каспазный ингибитор, XIAP, и в тех клетках, где каспазы заблокированы с помощью синтетического ингибитора каспаз, Z-VAD-FMK (Jo et al, 2011). Более того,  $\beta$ -амилоид не влияет на выработку ДП в клетках, где отсутствует ген каспазы-3. Если в обычные

клетки вводить дополнительно белок Akt1, амилоид в этих клетках по-прежнему способен подавлять выработку ДП, но если в клетки вводить мутантную, устойчивую к расщеплению каспазой-3 форму Akt1, то клетки становятся нечувствительны к эффектам амилоида (Jo et al, 2011). Таким образом, под действием амилоида каспаза-3 расщепляет и инактивирует киназу Akt1, которая в норме ингибирует другую киназу, GSK3 $\beta$ , а та, в свою очередь, и опосредует угнетение выработки ДП под действием амилоида (Jo et al, 2011).

Активация каспазы-3 под действием амилоида происходит, вероятно, по классическому митохондриальному пути (Hu et al, 2015), хотя и не во всех работах это удалось показать (Jo et al, 2011). Как бы то ни было, амилоид вызывает повышение активности проапоптотического белка Вах, каспазы-3 и киназы GSK3 $\beta$ , и это повышение снимается ингибированием кальциевых каналов (Hu et al, 2015). Таким образом, опосредованный амилоидом ток кальция в клетку вызывает активацию каспазы-3, что, в свою очередь приводит к подавлению выработки ДП (Hu et al, 2015).

Одним из современных инструментов изучения роли того или иного белка в процессах жизнедеятельности является создание и исследование мышей с измененным геном исследуемого белка. Простейшим случаем изменения гена является его удаление, нокаут, и такого рода исследования были сделаны с геном каспазы-3 (Lo et al, 2015). Конечно, как и во всех других случаях удаления гена, у животных в процессе индивидуального развития часть эффекта удаления гена была скомпенсирована изменением экспрессии других генов, но, тем не менее, эффект удаления гена каспазы-3 можно обнаружить и у взрослых животных (Lo et al, 2015).

В большом исследовании, проведенном на мышах, нокаутных по гену каспазы-3, были обнаружены специфические изменения поведения мышей, затрагивающие механизмы контроля внимания (Lo et al, 2015). Полученные методами генетической инженерии мутанты не отличались от контрольных по

неврологическим рефлексам, моторным функциям и моторному обучению или по выработке реакции условного избегания, но проявляли повышенную двигательную активность (Lo et al, 2015). Более глубокие нарушения поведения у мутантных мышей были обнаружены при исследовании внимания. В частности, животных обучали распознавать короткие вспышки света в одной из пяти норок и просовывать нос в эту норку для получения вознаграждения. Мыши, мутантные по гену каспазы-3 обучались такому навыку так же, даже чуть лучше, чем контрольные, хотя и демонстрировали повышенную двигательную активность (Lo et al, 2015). Однако при тестировании через некоторое время после выработки навыка мутантные мыши демонстрировали снижение точности реакции по сравнению с контролем. Более того, разнообразные небольшие помехи при выполнении теста не мешали контрольным животным, но снижали эффективность выполнения задачи мутантными по каспазе-3 мышами (Lo et al, 2015). В целом, анализ поведения мутантных мышей позволяет сделать вывод о том, что у этих животных нарушен контроль внимания, а их поведение напоминает синдром дефицита внимания и гиперактивности человека (Lo et al, 2015).

Одной из характерных особенностей реакции здоровых животных в ответ на изменившиеся условия внешней среды является адаптивное изменение поведения, причем адаптация нарушается при ряде заболеваний, включая и синдром дефицита внимания и гиперактивности. Проверить адаптивность изменения поведения животных в меняющихся условиях среды можно в простом поведенческом тесте. Когда мышей тренировали искать погруженную под воду платформу в водном лабиринте Морриса, с этой задачей мутантные по каспазе-3 мыши справлялись столь же эффективно, как и контроли, что говорит о нормальном пространственном обучении и памяти у этих животных (Lo et al, 2015). Однако, при изменении положения подводной платформы, контрольные животные быстро учатся искать платформу в новом месте, а мутанты продолжают искать ее в старом, тратят

заметно больше времени на обучение, при этом скорость плавания мутантов не отличается от контрольного уровня (Lo et al, 2015). Таким образом, мутантные по каспазе-3 мыши демонстрируют неэффективное подавление ранее выработанного поведения, то есть у этих животных снижены адаптивные возможности пространственного обучения. В дополнительных экспериментах показано, что непространственное обучение и переучивание у мутантов не страдает (Lo et al, 2015).

Можно заключить, что мутантные мыши также хорошо, как и контрольные, обучаются в тестах на запоминание, но они сильно уступают контрольным, когда приходится переучиваться. Трудности с переучиванием у этих животных возникают и в других тестах. Так, исследовательская активность у мутантных животных выше, чем у контролей, это выражается в повышенной двигательной активности при помещении мышей в новую обстановку (Lo et al, 2015). Более того, контрольные мыши демонстрируют угасание исследовательского поведения по мере привыкания к новой обстановке, тогда как нокауты по каспазе-3 по-прежнему продолжают исследовать обстановку в течение большего времени (Lo et al, 2015). Таким образом, у мутантов хуже происходит процесс привыкания. Если предъявлять нокаутным животным новые объекты, то они также демонстрируют к ним постоянный повышенный интерес, даже при последующих многократных предъявлениях, тогда как контрольные животные быстро привыкают к новому и на повторные предъявления уже знакомых объектов реагируют слабее (Lo et al, 2015). При этом распознавание и запоминание объектов у мутантов не страдают.

Интересным направлением исследований роли каспазы-3 в поведении животных является выяснение молекулярных и клеточных механизмов вовлечения каспазы-3 в реализацию того или иного поведения. Одним из маркеров активации нейронов является экспрессия генов раннего ответа, в частности гена *c-fos*. Небольшой уровень активации гена *c-fos* (и увеличение

экспрессии белка c-Fos) наблюдается в мозге животных в состоянии покоя, но при помещении животных в новые условия, уровень c-Fos значительно увеличивается в нескольких отделах мозга (Lo et al, 2015). Самое интересное, что у нокаутов по каспазе-3 при помещении в новые условия в зубчатой извилине гиппокампа активация c-fos происходит существенно интенсивнее, чем у контрольных животных (Lo et al, 2015). В зубчатой извилине в этой ситуации число c-Fos-позитивных клеток у нокаутов примерно в два раза выше, чем у контроля, тогда как в энторинальной коре, отделе мозга, ответственном за обработку сенсорных сигналов разной модальности, и стриатуме, регулирующем двигательную активность, число c-Fos-позитивных клеток у нокаутов не отличается от контрольного (Lo et al, 2015). При этом число c-Fos-позитивных клеток в зубчатой извилине положительно коррелирует с исследовательской активностью у нокаутов и отрицательно у контроля (Lo et al, 2015).

Поддержание гомеостаза в синапсе, в частности, поддержание частоты прохождения нервных импульсов внутри определенного диапазона, необходимо для правильной обработки информации в мозге. Нарушения в системе поддержания синаптического гомеостаза являются составной частью таких заболеваний как шизофрения (Dickman & Davis, 2009; Dickman et al, 2012), синдром ломкой X-хромосомы (Soden & Chen, 2010), расстройства аутистического спектра (Qiu et al, 2012; Toro et al, 2010). Важным элементом синаптического гомеостаза является ослабление силы связи в синапсе при многократных предъявлениях новых стимулов. Оказывается, нейроны гиппокампа мышей, нокаутных по гену каспазы-3, либо нейроны в присутствии ингибитора каспазы-3, продолжают работать с неизменной интенсивностью даже при увеличении частоты прохождения нервных импульсов, тогда как нейроны контрольных животных адаптируются к увеличению частоты электрических сигналов и снижают интенсивность работы примерно на 20-25 % (Lo et al, 2015). При продолжительном

раздражении нейроны контрольных животных снижают экспрессию субъединиц GluA1 (GluR1) и GluA2 (GluR2) AMPA рецепторов глутамата (пример адаптации поведения на синаптическом уровне) на примерно те же самые 20-25 %, тогда как экспрессия этих белков в нейронах у нокаутов по каспазе-3 остается неизменной, то есть нейроны нокаутов по каспазе-3 не могут подстроиться под изменяющиеся условия внешней среды (Lo et al, 2015).

Связь каспазы-3 с уровнем AMPA рецепторов в гиппокампе мышей подтверждает сделанные заключения о роли этого фермента процессах пластичности. Так, у необученных животных, нокаутных по каспазе-3, общий уровень субъединиц AMPA, белков GluA1 и GluA2, не отличается от контрольного. Но как только животные либо обучаются, либо приобретают поведенческий навык, связанный с пространственной памятью, уровень белков GluA1 и GluA2 в гиппокампе нокаутных по каспазе-3 мышей оказывается на 10-20 % выше, чем в контроле (Lo et al, 2015).

Данные о вовлечении каспазы-3 в процессы нейрональной пластичности, прежде всего, на феноменологическом уровне, появились относительно давно (Bravarenko et al, 2006; Dash et al, 2000; Gulyaeva et al, 2003; Kudryashov et al, 2002), однако в настоящее время можно уже можно говорить о молекулярных механизмах, связывающих каспазу-3 и пластичность нервных клеток. В первую очередь, каспаза-3 расщепляет и/или принимает участие в интернализации/деактивации/эндоцитозе субъединиц AMPA рецепторов глутамата (Glazner et al, 2000; Han et al, 2013; Li et al, 2010b; Lo et al, 2015; Lu et al, 2002). С этим связано и поведенческое проявление нехватки каспазы-3 в мозге у нокаутных по каспазе-3 мышей, заключающееся в дефиците внимания, гиперактивности и импульсивности (Lo et al, 2015). В частности, у таких животных страдает адаптивная регуляция поведения, способность подстраиваться под меняющиеся условия внешней среды (Lo et al, 2015). У нокаутных мышей не происходит подавления ранее выработанных



навыков, даже когда изменившиеся условия внешней среды этого требуют. Сходным образом при фармакологическом ингибировании каспазы-3 у певчих птиц не происходит привыкания к изменившейся активности отделов мозга, ответственных за пение (Huesmann & Clayton, 2006). Сделанные заключения в будущем могут быть существенно дополнены, так как каспаза-3 в мозге является повсеместно экспрессируемым ферментом и может быть задействована в других процессах его нормального функционирования.

Что может быть общего у всех перечисленных процессов (проявлений пластичности мозга на самых разных уровнях у разных видов животных), кроме уже упомянутого расщепления каспазой-3 AMPA рецепторов глутамата? Возможно, у всех этих процессов есть одна общая черта, которая и определяет активацию каспазы-3 во всех этих процессах. А именно, оказывается, у самых обычных мышей в процессе заложенного природой поведения, исследования нового окружения, индуцируются двухцепочечные разрывы ДНК (Suberbielle et al, 2013). Эти разрывы происходят во многих отделах мозга, хотя и более сильно выражены в вовлеченной в пространственное обучение и память зубчатой фасции гиппокампа, и репарируются в течение 24 часов.

С помощью сенсорной или оптогенетической стимуляции мозга можно увеличить число двухцепочечных разрывов ДНК, причем именно в тех областях мозга, которые увеличивают активность в результате соответствующей стимуляции (Suberbielle et al, 2013). Важно отметить, что в модели болезни Альцгеймера на мышах (трансгенез белка предшественника амилоида человека) в мозге наблюдается увеличенное число таких разрывов ДНК до начала исследовательской активности, также как и еще более увеличенное число разрывов ДНК и большее время их репарации после исследовательского поведения (Suberbielle et al, 2013). Число разрывов ДНК возвращается к контрольному уровню при подавлении абберрантной нейрональной активности и при фармакологическом улучшении памяти на

этих животных. В модели *in vitro* установлено, что число разрывов ДНК уменьшается при блокировании натриевых каналов, синаптических или экстрасинаптических NMDA и AMPA рецепторов глутамата (Suberbielle et al, 2013). В норме примерно у 10% клеток можно детектировать разрывы ДНК, тогда как после обучения уже 30-40% клеток имеют повреждения в ДНК (Suberbielle et al, 2013). Появление разрывов в ДНК является следствием именно активности нейронов, а не стресса, как можно было бы предположить (Flint et al, 2007; Suberbielle et al, 2013).

Таким образом, активность нейронов сама по себе может вызывать повреждения ДНК, хотя фермент, эндонуклеаза, ответственная за этот процесс, еще не идентифицирована. В качестве одного из вариантов эндонуклеазы, участвующей в повреждении ДНК, можно предложить каспазо-активируемую ДНКазу (CAD) (Unsain & Barker, 2015). В настоящий момент вовлечение этого фермента в процессы нейрональной пластичности является лишь одним из возможных вариантов, но именно этот вариант вполне заслуженно претендует на то, чтобы объяснить вовлечение каспазы-3 в столь различные процессы в мозге (Larsen & Megeney, 2010; Larsen et al, 2010).

Известный хемоконвульсант, каиновая кислота, вызывает не только гибель клеток гиппокампа, но и запускает ряд процессов, необходимых для перестройки нейронов и их сетей (Tzeng et al, 2013). При этом дегенерация, вызванная однократной инъекцией каиновой кислоты, не зависит от активации каспазы-3, тогда как изменение структуры нейритов после инъекции зависит от активной каспазы-3 (Tzeng et al, 2013). Ингибирование каспазы-3 после инъекции каината предотвращает всплеск нейрогенеза и активацию микроглии, но не астроглиоз (Tzeng et al, 2013). Каспаза-3 активирует в этой ситуации протеинфосфатазу кальцинейрин А, которая может опосредовать изменения в отростках нервных клеток и в глиальных клетках. В другой модели эксайтотоксичности, введении NMDA в мозг, показано, что активированная каспаза-3 локализована в глиальных клетках,

подвергающихся активным перестройкам цитоскелета (расщепление GFAP и наработка виментина), но не в гибнущих клетках (Acarin et al, 2007). Таким образом, каспаза-3 активируется в результате повреждающего эксайтотоксического воздействия в мозге, но первыми эффектами ее активации являются структурные и функциональные изменения клеток, и лишь затем, при увеличении силы и продолжительности повреждающего воздействия каспаза-3 вовлекается в клеточную гибель (Acarin et al, 2007; Tzeng et al, 2013).

В головном мозге не столь редко происходит элиминирование синапсов, например, в процессе развития в раннем онтогенезе или при нейродегенеративных заболеваниях. Считается, что элиминирование синапсов связано с феноменом долговременной депрессии, процесса, в котором каспаза-3 играет значительную роль (Li et al, 2010b). Так, показано, что после выработки долговременной депрессии происходит уменьшение размеров дендритных шипиков вплоть до их полного элиминирования (Nagerl et al, 2004; Zhou et al, 2004). С другой стороны, после активации NMDA рецептора каспаза-3 кратковременно и локально активируется, что необходимо для интернализации AMPA рецепторов (Li et al, 2010b). Оказалось, что, действительно, каспаза-3 принимает участие в локальном элиминировании синапсов (Ertuerk et al, 2014). С помощью современных оптогенетических методов удастся активировать каспазу-3 локально, либо в теле нейрона, либо в его отростках (Ertuerk et al, 2014). Причем если активировать каспазу-3 в теле нейрона, то происходит гибель клетки, а если активировать ее только в отростках, то активность так и остается ограниченной отростком, гибели клетки не происходит, зато происходит уменьшение размеров шипика и ретракция дендритов (Ertuerk et al, 2014). При этом за 9 часов локальной активации каспазы-3 в отростках активность каспазы-3 повышается двукратно, плотность шипиков падает трехкратно, а длина отростков сокращается на 10 мкм (Ertuerk et al, 2014). Инактивация гена

каспазы-3, а также фармакологическое ингибирование этого фермента, полностью предотвращают описанные эффекты.

Сдерживать распространение процесса активации каспазы-3 из отростков в сому нейрона помогает протеасомальная система. Так, при активации каспазы-3 в отростке при одновременном ингибировании протеасомы в клетке, через 12 часов активность каспазы-3 в соме нейрона многократно возрастает и примерно половина клеток умирает (Ertuerk et al, 2014). Похожие результаты получаются и при ингибировании IAP (Ertuerk et al, 2014). Показана и функциональная роль локальной активации каспазы-3 в дендритах. А именно, удаление каспазы-3 при помощи генетических методов, или ингибирование этого фермента с помощью ингибиторов, блокирует уменьшение размеров шипиков после ДД и приводит к разбуханию шипиков (Ertuerk et al, 2014). При этом нокаутные по гену каспазы-3 мыши в гиппокампе имеют увеличенную примерно в 1.5 раза плотность шипиков и измененный паттерн активности нейронов (Ertuerk et al, 2014). Таким образом, каспаза-3 необходима для поддержания гомеостаза в области синаптического контакта и самым непосредственным образом принимает участие в нейрональной пластичности. Локальность активации каспазы-3 в отростках и нераспространение активности этого фермента в тело клетки обеспечивается протеасомальной системой.

Изменения морфологии нейронов неизбежно происходят при росте и образовании нейрональных отростков. Хорошо известно, что молекулы клеточной адгезии запускают процессы внутриклеточных перестроек, но долгое время оставалось непонятным, как сигнал от этих молекул преобразуется во внутриклеточные процессы. Оказывается, такого рода сигналинг опосредуется каспазами (Westphal et al, 2010). Каспаза-8 связана с нейрональной молекулой клеточной адгезии (NCAM) в норме, а в клетках при отсутствии NCAM активность каспазы-3 и каспазы-8 значительно снижена (Westphal et al, 2010). Кроме того, активность именно этих каспаз, но не

каспазы-9 или каспазы-10 локализована в липидных рафтах, там же, где запускается опосредованный молекулами клеточной адгезии сигналинг. Активация NCAM в конусах роста нейритов приводит к значительной локальной активации каспазы-3, и каспаза-3 расщепляет внутриклеточный структурный белок  $\alpha$ II спектрин локально внутри конуса роста (Westphal et al, 2010). Более того, в норме активация NCAM вызывает образование и увеличение длины нейритов, но если во время активации NCAM заблокировать каспазы-3 или -8, то образования и роста нейритов не происходит (Westphal et al, 2010).

Современный уровень развития научной техники позволяет следить за активностью нейронных сетей и ростом индивидуальных нейронов в мозге животных. Такая экспериментальная возможность позволяет изучать нейрональную пластичность в режиме реального времени в живом мозге с беспрецедентной точностью. В частности, так можно изучать связь между сигналами внешнего мира и структурными и функциональными особенностями нейронов мозга. В одном из таких экспериментов была показана связь между зрительной стимуляцией и дендритогенезом в головном мозге животных (Chen et al, 2012). Интересен молекулярный механизм, лежащий в основе этой связи. Так, блокирование NMDA рецепторов изменяло некоторые аспекты структурной пластичности нейрона, такие как число отростков, в ответ на зрительную стимуляцию. Установлен транскрипционный фактор, ответственный за ответ клетки на зрительную стимуляцию, это белок MEF2 (Chen et al, 2012). При этом концентрация MEF2 падает в несколько раз после индукции структурных изменений, а ответственными за это падение концентрации являются каспазы-3 и -9 (Chen et al, 2012). Таким образом, каспаза-3 участвует в запуске пластических изменений в ответ на зрительную стимуляцию, расщепляя транскрипционный фактор MEF2.

С помощью современных методов прижизненной детекции было показано, что каспаза-3 участвует в быстрых перестройках отростков ганглионарных клеток сетчатки во время созревания мозга (Campbell & Okamoto, 2013). Активация каспаз происходит быстро в течение пяти минут после образования нового отростка клетки в месте образования этого отростка. Каспаза-3 активна только во вновь образованных отростках, но не в более старых устоявшихся отростках клеток и не в теле клеток (Campbell & Okamoto, 2013). Локально вместе с каспазой-3 увеличивается активность каспазы-9 и киназы p38 MAPK. Выключение гена каспазы-3 приводит к образованию более долго живущих отростков и пресинаптических окончаний (Campbell & Okamoto, 2013). Субстраты каспаз в этой ситуации не установлены, но, скорее всего, ими являются какие-то белки цитоскелета.

Обрезка дендритов является одним из важных механизмов синаптической пластичности. С помощью этого механизма устраняются неправильно установленные или избыточные связи между нейронами. Оказывается, локализованная в дендритах каспазная активность определяет обрезку дендритов при моделировании нейрональных сетей у дрозофилы (Williams et al, 2006). Активность строго локализована в дендритах, а при ее появлении в соме клетке происходит клеточная гибель (Williams et al, 2006). Регуляция активности каспаз при структурных изменениях нейронов опосредована убиквитин-протеасомальной системой (Kuo et al, 2006).

Аналог каспаз в нематоде, протеаза CED-3, принимает участие в регенерации аксонов (Pinan-Lucarre et al, 2012). Удивительно, но при удалении этой протеазы скорость регенерации поврежденных аксонов падает двукратно (Pinan-Lucarre et al, 2012). У мутантных животных с неактивной протеазой CED-3 увеличивается время от повреждения до начала репарации, то есть CED-3 принимает участие в инициации процесса репарации (Pinan-Lucarre et al, 2012). Конкретных мишеней протеазы в этом процессе пока не выявлено. Другие апоптотические белки также могут принимать участие в росте

нейритов. Так, есть указания на то, что белок VAX необходим для роста дендритов гиппокампальных нейронов (Park et al, 2015). В отличие от более менее изученных механизмов участия белков апоптотического каскада в локальной деградации белков при селективной дегенерации отростков, молекулярные механизмы участия апоптотических белков в росте и регенерации отростков нейронов остаются практически неисследованными.

Постсинаптический аппарат нервно-мышечного синапса, как и других синапсов в организме, содержит большое число молекул рецептора нейромедиатора ацетилхолина (так называемый кластер ацетилхолиновых рецепторов), связанных с внутриклеточными, трансмембранными и экстраклеточными белками. Среди этих белков обязательно присутствуют структурные белки, обеспечивающие упорядоченное распределение компонентов синапса, и сигнальные белки, обеспечивающие передачу сигнала от рецептора. В процессе развития организма активность пресинаптического нейрона определяет, образуется ли между пре- и постсинаптической клетками стабильная синаптическая связь. В частности, в процессе созревания и дифференцировки нервно-мышечных синапсов происходит устранение избыточных синапсов, и наоборот, образование плотных скоплений рецепторов в работающих синапсах. Формирование таких кластеров ацетилхолиновых рецепторов является ключевым событием для возникновения нервно-мышечного синапса. Создание кластеров рецепторов и поддержание рецепторов в одном кластере опосредовано рецепторной тирозинкиназой MuSK, за активацию которой отвечает выделяемый аксонами моторных нейронов гликопротеин агрин (Kummer et al, 2006).

Генетические исследования позволили выяснить, что во время раннего онтогенеза постсинаптическая кластеризация ацетилхолиновых рецепторов в мышечной клетке запускается без всякого участия со стороны нервной клетки. Затем, однако, растущие нервные волокна высвобождают гликопротеин агрин, который активирует тирозинкиназу MuSK, что приводит к образованию в

данном месте нервно-мышечного контакта новых кластеров и поддержанию работы уже образованных. В то же время, нейроны выделяют вещества, которые вызывают разрушение кластеров ацетилхолиновых рецепторов, если они не иннервированы. Выяснилось, что сигналом к разрушению кластеров является сам ацетилхолин, тогда как агрин противостоит такому действию ацетилхолина (Kummer et al, 2006; Yang et al, 2011).

Оказывается, в процессе устранения нефункциональных кластеров ацетилхолиновых рецепторов принимает участие каспаза-3 (Wang et al, 2014). Стимуляция мышечной клетки в течении 30 мин приводит к примерно трехкратному увеличению активности каспазы-3, причем этот эффект предотвращается введением ингибиторов каспазы-3 и каспазы-9, но не каспазы-8 (Wang et al, 2014). Агрин также способен частично предотвращать активацию каспазы-3. Активная каспаза-3 в миотрубках мышцы в период позднего пренатального онтогенеза локализована вместе с неиннервированными кластерами ацетилхолиновых рецепторов (Wang et al, 2014). Вызванное активацией ацетилхолиновых рецепторов двукратное сокращение общего числа кластеров рецепторов предотвращается введением ингибитора каспазы-3 (Wang et al, 2014). Схожий по выраженности эффект выявляется и при генетическом удалении каспазы-3 (Wang et al, 2014). Доля неиннервированных кластеров среди общего числа кластеров на постсинаптических клетках составляет около 10% в контроле и возрастает в два раза при выключении гена каспазы-3, при этом число пресинаптических образований не изменяется (Wang et al, 2014).

В этой физиологической ситуации был идентифицирован субстрат каспазы-3. Субстратом оказался белок Dvl1, партнер киназы MuSK (Wang et al, 2014). Блокирование расщепления этого белка стабилизирует кластеры ацетилхолиновых рецепторов (Wang et al, 2014). Агрин, в свою очередь ингибирует активность каспазы-3 посредством активации белка HSP90 (Wang et al, 2014).



Современные представления о вовлечении каспазы-3 в процессы структурной и функциональной пластичности в нейрональных отростках представлены на рис. 1. Каспаза-3 активируется по классическому апоптотическому сценарию с участием цитохрома с и каспазы-9, после чего осуществляет протеолиз и участвует в интернализации AMPA рецепторов глутамата. При таком сценарии активность каспазы-3 не распространяется в тело клетки, а остается ограниченной отростками. Такая тонкая пространственная регуляция активности каспазы-3 осуществляется за счет активности ингибиторов этого фермента – протеасомы, XIAP и Bcl-xL. Основная функция ингибиторов каспазы-3 в этой ситуации – не дать распространиться активности этого фермента в тело клетки, что является принципиальной особенностью регуляции активности каспазы-3 не только в процессах внутри нейрональных окончаний, но и, видимо, особенностью регуляции активности этого фермента вообще. Эта особенность заключается в том, что активность каспазы-3 во многих физиологических ситуациях достаточно высока, чтобы расщеплять одни субстраты, но недостаточно высока, чтобы расщеплять многие другие (как при апоптозе). За такое сдерживание каспазы-3 отвечают ингибиторы этого фермента, локализованные в четко определенных компартментах. Например, в отростках, протеасома и XIAP подавляют активность каспазы-3 в теле клетки, а Bcl-xL несколько ограничивает активность каспазы-3 в отростках.

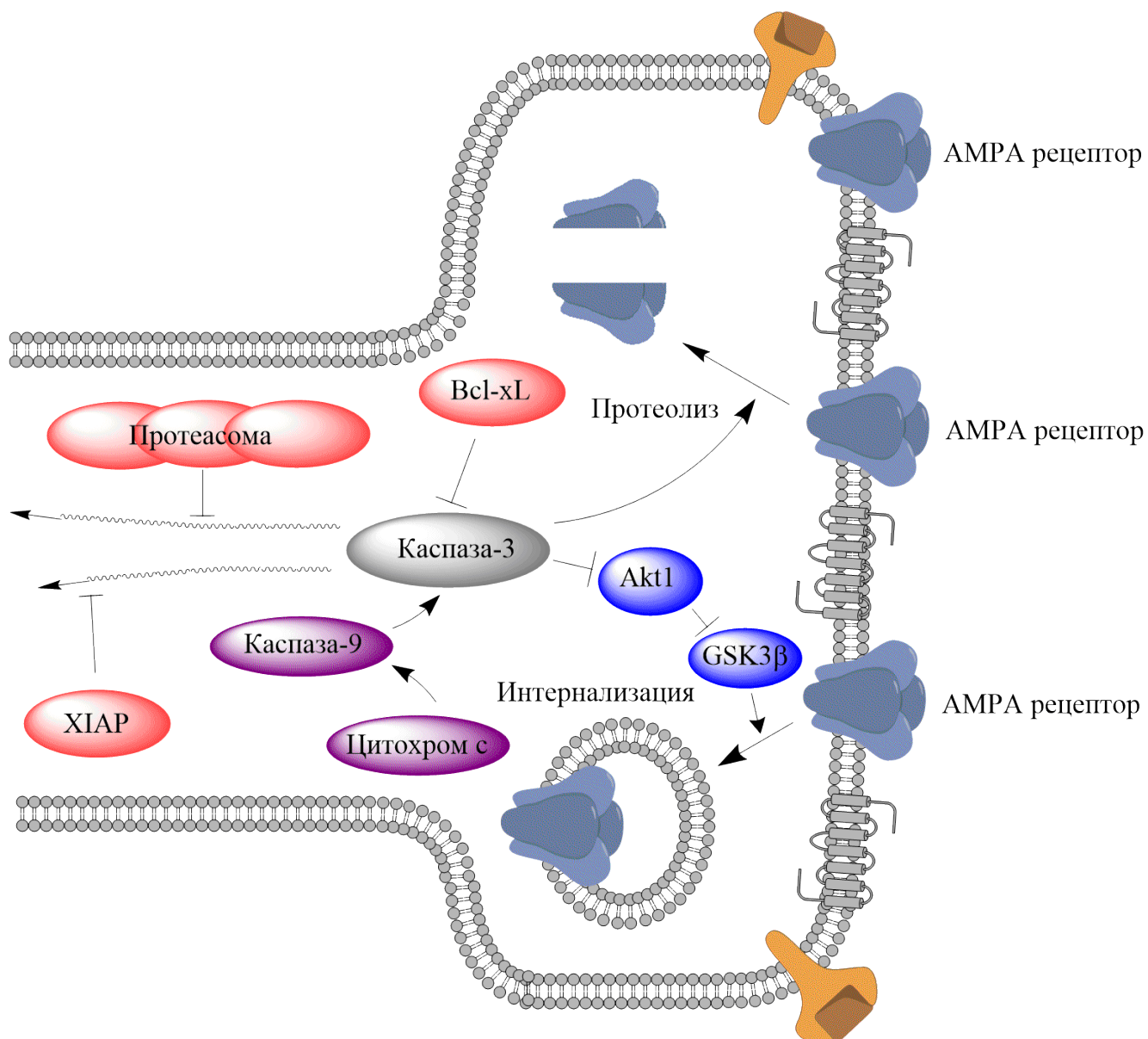


Рис. 1. Вовлечение каспазы-3 в структурно-функциональные изменения в отростках нейронов (по данным литературы).

Вовлечение каспазы-3 в процессы пластических перестроек связано с расщеплением каспазой протеинкиназы Akt, хотя этим и не ограничивается. Центральную позицию среди субстратов каспазы-3, важных для нейропластичности, эта протеинкиназа занимает в силу своей роли в функционировании клеток вообще и нейронов в частности (Dudek et al, 1997). Этот фермент хорошо известен как активатор сигналов пролиферации и выживания, но, оказывается, для синаптической пластичности важна другая

его функция, поддержание целостности синапса. Но во время адаптации нейрона к изменяющимся условиям именно Akt мешает синаптическим перестройкам, и расщепление его каспазой-3 обеспечивает необходимые изменения. Каспаза-3 расщепляет и другие белки в нейрональных отростках, хотя во многом неясно, насколько эти субстраты принципиальны для исполнения каспазой-3 своей функциональной роли. Среди этих субстратов представители разных классов, хотя можно предположить, что структурные белки (актин, спектрин, тубулин) наиболее важны для исполнения каспазой-3 своих функций.

### **Участие каспазы-3 в пролиферации и выживании клеток**

Одной из очевидно неапоптотических ролей ферментов семейства каспаз в клетке является участие этих ферментов в пролиферации. Участие каспаз в пролиферации довольно подробно описано в литературе. В основном это работы по взаимодействию каспаз с киназами, киназными ингибиторами и циклинами. Стоит отметить несколько интересных работ. На культуре клеток HeLa показано, что введение каспазного ингибитора вызывает задержку митоза, а ключевым белком, расщепляемым каспазой-3 при запуске митоза в этих клетках, является белок BubR1 (Kim et al, 2005). Схожие результаты получены при анализе экспрессии белков семейства каспаз и каспазной активности в течение клеточного цикла на клетках этой клеточной линии (Hsu et al, 2006).

Существует еще несколько клеточных процессов, не связанных с апоптозом, но, по-видимому, близких к процессу пролиферации, в реализации которых принимают участие каспазы. Моделирование внеклеточного матрикса в основном осуществляется протеазами семейства матричных металлопротеиназ. Оказывается, каспазы из апоптотических миоцитов способны расщеплять внеклеточный матрикс, причем каспазы преимущественно связаны с мембраной клеток (Cowan et al, 2005). При

индукции апоптоза раковые клетки вместо смерти могут приобретать способность к инвазии, при этом каспазные ингибиторы и миРНК каспазы-3 способны частично предотвращать этот эффект (Mukai et al, 2005).

Одной из благоприятных для организма в целом особенностей апоптотической клеточной гибели является отсутствие воспаления после устранения клеток. Оказывается, каспазы принимают самое непосредственное участие в предотвращении воспаления в результате гибели клеток (White et al, 2014). Так, в стволовых гематопозитических клетках одной из стадий апоптоза является опосредованное белками ВАХ и ВАК высвобождение митохондриальной ДНК в цитоплазму. Это, в свою очередь, запускает транскрипцию гена и последующие синтез и секрецию интерферона  $\beta$ , способного вызвать воспаление в организме (White et al, 2014). Каспазы в этой ситуации предотвращают секрецию интерферона  $\beta$ , в частности, удаление каспазы-3 приводит к примерно десятикратному увеличению секреции интерферона  $\beta$  гибнущими клетками (White et al, 2014). При этом интерферон  $\beta$  индуцирует пролиферацию стволовых гематопозитических клеток, а каспазы предотвращают этот эффект. Таким образом, каспазы, в том числе каспаза-3, предотвращают воспаление, вызываемое гибнущими клетками, в организме. Еще одним механизмом снижения воспаления после гибели клеток является расщепление и инактивация каспазой-3 провоспалительного цитокина интерлейкина-33 (IL-33) (Luethi et al, 2009).

В некоторых типах клеток каспаза-3 выступает регулятором целого ряда жизненно важных процессов. Так, в эритроидных стволовых клетках каспаза-3 вовлечена в дифференцировку, регуляцию клеточного цикла, пролиферацию и выживаемость (Boehm et al, 2013). Ингибирование каспазы-3 в этих клетках приводит к апоптозу (Boehm et al, 2013).

Каспаза-3, также как и каспаза-7, способна выступать в роли ключевого регулятора регенерации ткани (Li et al, 2010a). В частности, в нескольких моделях *in vitro* и *in vivo* показано, что одновременно с апоптозом каспаза-3

запускает сигналинг в окружающей ткани. Так, от сигналов, запускаемых каспазой-3 зависит пролиферация стволовых клеток, заживление кожи, регенерация печени (Li et al, 2010a). Все эти каскады запускаются благодаря расщеплению, и тем самым активации, каспазой-3 ключевого фермента регуляции воспаления, кальций-независимой фосфолипазы A2. Фосфолипаза A2 в результате активации начинает расщеплять фосфолипиды, а образуемая в результате арахидоновая кислота превращается в простагландин PGE2, который и запускает такие эффекты как пролиферация и регенерация ткани (Li et al, 2010a). В работе не показано прямое расщепление и активация каспазой-3 фосфолипазы A2, но показано, что все физиологические эффекты, вызванные нокаутом гена каспазы-3, устраняются с помощью экспрессии в нокаутированных клетках расщепленной и активированной формы фосфолипазы A2 (Li et al, 2010a).

По схожей схеме развивается пролиферация глиомы после смерти окружающих эндотелиальных клеток (Mao et al, 2013). Активация каспазы-3 в умирающих клетках приводит к активации кальций-независимой фосфолипазы A2 и последующему образованию и секреции PGE2 (Mao et al, 2013). Секретируемый PGE2 в свою очередь способен индуцировать пролиферацию клеток глиомы. Все описанные эффекты снимаются при блокировании каспазы-3 (Mao et al, 2013). По схожему сценарию развиваются события при индукции апоптоза в клетках других типов (Donato et al, 2014; Huang et al, 2011). В этих клетках каспаза-3 также стимулирует секрецию PGE2, необходимого для выживания окружающих клеток.

Высокой инвазивностью и устойчивостью к химической и радиотерапии характеризуется глиобластома. Оказывается, высокая способность к миграции и инвазивности определяется в этих клетках каспазой-3 (Gdynia et al, 2007). Ингибирование активности этого фермента с помощью пептидных ингибиторов или подавление экспрессии белка каспазы-3 снижает способность клеток глиобластомы к миграции (Gdynia et al, 2007). В этих

клетках каспаза-3 активна конститутивно и не зависит от индукции апоптоза, а результатом постоянной активности этого фермента является расщепление гельзолина, структурного белка клетки, ответственного за сборку-разборку актинового цитоскелета (Gdynia et al, 2007).

Одной из стратегий подавления опухоли является радиотерапия. Радиотерапия приводит к гибели опухолевых клеток, но, кроме этого, стимулирует ангиогенез внутри опухоли, что приводит к улучшению снабжения выживших опухолевых клеток питательными веществами и последующему восстановлению опухоли (в силу того, что опухолевые клетки очень зависимы от трофической поддержки окружающими тканями). Из общих соображений может показаться, что каспаза-3 участвует в устранении опухолевых клеток и ее стимуляция необходима для успешной борьбы со злокачественными новообразованиями, но, оказывается, наоборот, активация каспазы-3 помогает росту опухоли за счет стимулирующего влияния на внутриопухолевый ангиогенез (Feng et al, 2015). Гибнущие по каспазо-зависимому механизму опухолевые клетки стимулируют пролиферацию и миграцию окружающих эндотелиальных клеток, а также выживание этих клеток в дальнейшем. Инактивация каспазы-3 в этом процессе подавляет ангиогенез в месте развития опухоли и замедляет опухолевый рост (Feng et al, 2015). Эффект опосредован фактором роста эндотелия сосудов (VEGF), созревание и секрецию которого запускает каспаза-3. Можно предположить, что в этой ситуации каспаза-3 активирует протеинкиназу C дельта (PKCдельта) и протеинкиназу Akt, которые являются хорошо известными индукторами VEGF (Feng et al, 2015).

Каспазо-зависимая стимуляция клеточного роста обнаружена и в модели пролиферации опухолевых клеток (Cheng et al, 2015). В умирающих клетках происходит совершенно ожидаемая активация каспаз-3 и -7, но, одновременно с расщеплением классических апоптотических субстратов, каспазы активируют PKCдельта, которая, в свою очередь активирует протеинкиназы

Akt и p38 MAPK (Cheng et al, 2015). Активация этих киназ внутри умирающих клеток каким-то образом (вероятно, через секрецию ростовых факторов) обеспечивает выживание окружающих клеток (Cheng et al, 2015).

Протеинкиназа Akt является эффектором фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и принимает участие в пролиферации и выживании клеток самых разных типов (Parcellier et al, 2008). Стресс самой разной модальности вызывает активацию Akt, но у мышей, нокаутных по гену каспазы-3, активация Akt выражена меньше в 1.5-3 раза (Khalil et al, 2012). Ингибирование каспазы-3 с помощью ингибитора Q-VD-OPh также снижает активацию Akt. Таким образом, отсутствие каспазы-3 казалось бы само по себе способствует лучшему выживанию клеток после стресса, так как отсутствует фермент, ответственный за реализацию программы клеточной гибели. С другой стороны, так как каспаза-3 активирует Akt, отсутствие каспазы-3 может ухудшить выживание клеток. Поэтому в клетках разных типов при отсутствии каспазы-3 процессы, связанные с выживанием могут быть как активированы, так и подавлены. Оказывается, доля гибнущих по апоптотическому сценарию в результате облучения ультрафиолетом кератиноцитов снижается в нокаутных по каспазе-3 мышах примерно в два раза по сравнению с контролем, но доля гибнущих по некротическому сценарию возрастает пятикратно (Khalil et al, 2012). В итоге ультрафиолетовое облучение кератиноцитов нокаутных по каспазе-3 мышей приводит к увеличению гибели этих клеток, суммарно апоптотической и некротической, примерно в 1.7 раза по сравнению с мышами дикого типа (Khalil et al, 2012). Напрашивается парадоксальный вывод – каспаза-3 предохраняет кератиноциты от гибели под действием ультрафиолетового облучения.

Доксорубин вызывает гибель клеток по каспазо-зависимому и каспазо-независимому сценариям в клетках разных типов, в том числе в кардиомиоцитах. В кардиомиоцитах нокаутных по каспазе-3 мышей апоптотическая гибель после инъекции доксорубина в полтора раза

превосходит контрольный уровень (Khalil et al, 2012). Долговременное выживание нокаутных по каспазе-3 мышей не отличается от выживания контролей, но после инъекции доксорубина нокауты выживают значительно хуже, через семь недель после инъекции доксорубина в живых не осталось ни одной нокаутной мыши, а в контроле на этом сроке после инъекции доксорубина была жива половина животных (Khalil et al, 2012). Таким образом, каспаза-3 в этой экспериментальной ситуации не только не является основным исполнителем апоптотической программы, но и является исполнителем программы выживания клеток. В целом, можно заключить, что каспаза-3 активирует протеинкиназу Akt в клетках разных типов, и это необходимое условие увеличения выживаемости клеток.

Отдельный интерес представляет вопрос, с помощью каких молекулярных механизмов каспаза-3 запускает в клетках процесс выживания, в частности, как каспаза-3 активирует белок Akt. Одним из механизмов может быть расщепление каспазой-3 белка p120 RasGAP. Дело в том, что при низкой активности каспазы-3 расщепляет RasGAP на его аминоконцевой фрагмент, называемый просто N фрагмент, и его карбоксиконцевой фрагмент, называемый просто C фрагмент (Yang et al, 2004; Yang & Widmann, 2001; 2002). Фрагмент C сам по себе способен вызывать апоптоз, но эта возможность в клетке полностью подавляется N фрагментом (Yang & Widmann, 2001; 2002). В принципе, в некоторых моделях на клеточных культурах, N фрагмент способен полностью ингибировать апоптоз, индуцированный активацией каспазы-9. При увеличении активности каспазы-3 примерно пятикратно в клетке происходит дальнейшее расщепление этим ферментом белка RasGAP, на этот раз N фрагмент расщепляется на фрагменты N1 и N2 (Yang & Widmann, 2001; 2002). Образовавшиеся фрагменты способны значительно усиливать апоптоз, но эти фрагменты не могут образоваться сразу из исходной молекулы RasGAP, и при низком уровне активности каспазы-3 сначала образуются N и C фрагменты (Yang & Widmann, 2001; 2002).



Антиапоптотический N фрагмент белка p120 RasGAP активирует малую ГТФазу Ras, которая, в свою очередь, активирует фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K), которая активирует киназу Akt (Yang et al, 2004; Yang & Widmann, 2002). При этом N фрагмент блокирует вызванную Akt активацию транскрипционного фактора NFκB (Yang et al, 2004; Yang & Widmann, 2002). При низкой активности каспазы-3, то есть когда N фрагмент не расщепляется на фрагменты N1 и N2, запуск каскада каспаза-3/RasGAP/Ras/Akt способен защитить клетку от гибели при небольшой активации каспазы-9 (Yang et al, 2004; Yang & Widmann, 2002).

Похоже, каспаза-3 расщепляет белок RasGAP в числе первых своих субстратов. Так, при индукции апоптоза на разных типах клеток несколькими способами (индукция Fas-зависимого апоптоза, воздействие цитотоксических препаратов цисплатин и доксорубин, облучение ультрафиолетом), расщепление RasGAP на N и C фрагменты происходит до расщепления ПАРП и фодрина (Yang et al, 2004). Более того, при низком уровне активации каспазы-3 апоптотическая программа не запускается, но расщепление RasGAP на N и C фрагменты происходит, причем именно в неапоптотических клетках (Yang et al, 2004). Ингибиторы каспазы-3 предотвращают расщепление RasGAP.

Важно отметить, что в клетках, экспрессирующих не способный к расщеплению RasGAP, запускается апоптоз, тогда как в обычных клетках образуется N фрагмент RasGAP, защищающий клетки от апоптоза (Yang et al, 2004). Таким образом, каспаза-3 при некотором небольшом уровне повреждающих воздействий, защищает клетку от гибели за счет ограниченного протеолиза RasGAP и, в конце концов, активации Akt. Среди каспаз только каспаза-3, но не каспаза-6 или -7, способна расщеплять RasGAP (Khalil et al, 2012).

При таких совершенно различных способах участия каспаз в клеточном сигналинге зачастую остается неясным, как происходит регуляция

активности каспаз и как каспазы регулируют различные внутриклеточные события. Среди факторов, способных осуществлять такую регуляцию, в литературе встречаются: доступность субстратов, различный процессинг субстратов, активность антиапоптотических факторов, посттрансляционные изменения каспазы-3 или ее субстратов, якорные белки, связывающие ферменты или их субстраты в определенных внутриклеточных компартментах.

Можно предложить дополнительные варианты. Это альтернативный сплайсинг, или временный, индуцибельный, или постоянный. Например, клетка может экспрессировать разные формы каспазы-8, причем некоторые изоформы имеют антиапоптотическую функцию (Miller et al, 2006). Каспаза-3 может иметь функции, не связанные с каталитической активностью фермента. Такой особенностью обладает, например, катепсин D (аспаратная протеаза), каталитически неактивная форма которого может запускать апоптоз (Beaujouin et al, 2006; Laurent-Matha et al, 2005).

Неапоптотическая роль каспазы-3 в мозге исследована меньше, чем в других органах и тканях животных. Это в первую очередь связано с тем, что уровень активности каспазы-3 в нервной системе значительно ниже, чем в других органах организма, и этот факт останавливает многих исследователей. Методические подходы, использованные для идентификации субстратов каспазы-3 в неапоптотических состояниях, не отличаются разнообразием. Это или коиммунопреципитация каспазы-3 с внутриклеточным белком-субстратом, или двухмерный электрофорез с выявлением расщепленных каспазой-3 фрагментов белка-субстрата.

В настоящее время многое известно о роли каспаз вне апоптоза. Однако в целом эта область остается описательной и феноменологической. Безусловно, ситуация изменится, если станут известны механизмы регуляции каспаз в клетке и идентифицированы субстраты каспаз в разных физиологических состояниях. Тем не менее, неапоптотическая роль каспазы-

3 довольно хорошо исследована для одного из важных процессов клеточной физиологии, дифференцировки.

### **Участие каспазы-3 в дифференцировке**

Апоптоз является универсальным феноменом, представленным во всех изученных многоклеточных организмах, от кораллов до приматов, и входит в число важнейших процессов, определяющих тканевый гомеостаз (Ameisen, 2002). Во всех известных сценариях апоптоза, он представляет собой обширную сеть биохимических реакций, затрагивающих так или иначе, все системы клетки. Хорошо известно, что апоптоз характеризуется несколькими отличительными чертами, такими как изменение мембран митохондрий, образование пузырьков из плазматической мембраны, реорганизация цитоскелета, фрагментация ДНК, конденсация ядра. И все эти черты являются типичными для апоптоза у многих организмов. Как правило, верно и обратное: наличие этих черт, даже не всех, а только части из них, свидетельствует об апоптозе. Однако, существуют и исключения, когда многие характерные черты апоптоза присутствуют, а гибели нет. Одним из таких исключений является дифференцировка.

Многоклеточные формы жизни возможны только благодаря специализации составляющих организм клеток, соответственно дифференцировка возникла в эволюции вместе с образованием многоклеточных организмов. Но и апоптоз, скорее всего, возник в это же время (Ameisen, 2002). Более того, насколько бы ни был различен исход апоптоза и дифференцировки, оба эти процесса имеют много общих морфологических черт (Fernando & Megeneu, 2007). Первая бросающаяся в глаза общая черта – разрушение ядра. Как при апоптозе, так и при терминальной дифференцировке клеток разных типов, таких как эритроциты, кератиноциты, клетки хрусталика, происходит необратимое разрушение ядра (Garrido & Kroemer, 2004).

Одно из первых свидетельств общности не только морфологических черт, но и биохимических механизмов дифференцировки и апоптоза было получено на эритроидных клетках (Zermati et al, 2001). Эритроциты в процессе созревания проходят несколько последовательных стадий, на последней из которых происходит потеря ядра. Было показано, что активация каспаз -2, -3 и -9 сопровождает стадию энуклеации, а панкаспазный ингибитор Z-VAD-FMK полностью предотвращает созревание эритроидных предшественников (Zermati et al, 2001). На стадии созревания эритроцитов происходит характерное для апоптоза расщепление ПАРП, при этом не происходит характерного для апоптоза расщепления ICAD. Кроме того, в эритроблестах происходит расщепление ламина В, белка ядерного цитоскелета, то же самое происходит и при апоптозе, и расщепление белка ацинус, связанного с конденсацией хроматина, однако при апоптозе этот белок не расщепляется. Панкаспазный ингибитор способен предотвращать все перечисленные протеолитические события (Zermati et al, 2001).

Интересна регуляция апоптоза и дифференцировки в клетках этого типа. Гормон эритропоэтин стимулирует дифференцировку и пролиферацию эритробластов, при этом предотвращает апоптоз этих клеток (Krantz, 1991). Механизм подавления апоптоза эритропоэтином связан со способностью этого гормона увеличивать экспрессию антиапоптотического белка Bcl-xL (Gregory et al, 1999; Motoyama et al, 1999), а депривация эритропоэтина приводит к активации каспаз и апоптозу (Gregoli & Bondurant, 1999). Транскрипционный фактор GATA-1 необходим для как для индуцированного эритропоэтином увеличения экспрессии Bcl-xL (Gregory et al, 1999; Motoyama et al, 1999), так и для экспрессии генов, вовлеченных в дифференцировку эритроидных предшественников (Pevny et al, 1991). В отсутствие этого транскрипционного фактора дифференцировка предшественников не происходит, и эти клетки погибают (Pevny et al, 1991). Более того, GATA-1 подвергается расщеплению именно каспазой-3 (De Maria et al, 1999). Таким

образом, возникает предположение, что каспазы должны играть роль негативных регуляторов дифференцировки эритробластов, но выясняется прямо противоположное участие каспаз в этом типе дифференцировки (Zermati et al, 2001).

Анализ биохимических путей апоптоза и дифференцировки у эритробластов позволяет сделать несколько интересных наблюдений. Дифференцировка клеток этого типа происходит под действием эритропоэтина, который с одной стороны вызывает увеличение экспрессии транскрипционного фактора GATA-1 и антиапоптотического белка Bcl-xL, с другой, активацию каспаз. В отсутствие эритропоэтина дифференцировка не происходит, и каспазы расщепляют транскрипционный фактор GATA-1 и вызывают гибель, но не дифференцировку. Кроме GATA-1 субстратами каспаз при гибели эритробластов являются PARP, ICAD, ламин B. Воздействие эритропоэтина вызывает дифференцировку, каспазы при этом процессе также активируются, но изменяется спектр каспазных субстратов. При дифференцировке, как и при апоптозе, каспазы расщепляют PARP и ламин B, но не расщепляют ни ICAD, ни GATA-1 (Zermati et al, 2001). Морфологически клетка в обоих случаях теряет ядро, но либо дифференцируется, либо погибает.

Ключевую роль при дифференцировке и при гибели эритробластов играет хорошо известный шаперон Hsp70, причем, оказывается, именно этот белок определяет, какие белки будут расщеплены каспазой-3 в той или иной ситуации (Ribeil et al, 2007). Если в клетках запускается терминальная дифференцировка под воздействием эритропоэтина, то Hsp70 транслоцируется в ядро клетки, а там локализуется и связывается с транскрипционным фактором GATA-1, предотвращая тем самым расщепление GATA-1 каспазой-3. В противоположной ситуации, когда эритробласты не получают эритропоэтин, Hsp70 выходит из ядра и каспаза-3 расщепляет GATA-1. Более того, если на фоне эритропоэтина вызвать

снижение содержания Hsp70 в эритроблестах, то происходит расщепление GATA-1 и клеточная гибель по апоптотическому сценарию, но если клетки экспрессируют устойчивую к расщеплению каспазой мутантную форму GATA-1, то гибели не происходит. Таким образом, шаперон Hsp70 может связываться с клеточными белками и защищать их от расщепления каспазой-3 (Ribeil et al, 2007). Интересно, что если Hsp70 каким-либо образом остается связанным в цитоплазме и не проникает в ядро, то повторяется сценарий гибели клетки с расщеплением GATA-1 каспазой-3. Такая ситуация имеет место *in vivo* при генетическом заболевании бета-талассемии (Arlet et al, 2014).

Таким образом, можно сделать вывод, что каспазы могут быть активированы в эритроблестах на всем протяжении жизни этих клеток. В отсутствие индуктора дифференцировки активные каспазы расщепляют критические для выживания эритробластов белки, что приводит к апоптозу, а при появлении такого индуктора каспазы меняют спектр своих субстратов и опосредуют процесс дифференцировки. Точные взаимосвязи между участниками этих процессов еще предстоит выяснить, но можно предположить схему вовлечения каспаз в апоптоз и дифференцировку эритробластов (рис. 2). Эритропоэтин вызывает транслокацию шаперона Hsp70 в ядро, где тот связывается с транскрипционным фактором GATA-1 и предотвращает его расщепление каспазой-3 на поздних стадиях дифференцировки. Если транслокации Hsp70 в ядро не происходит, то каспаза-3 расщепляет GATA-1 и эритробласт умирает по апоптотическому сценарию. Белки PARP и ламин В расщепляются каспазой-3 и при одном, и при другом сценарии. Таким образом, внутриклеточная компартиментализация является одним из важных факторов регуляции неапоптотической активности каспазы-3.

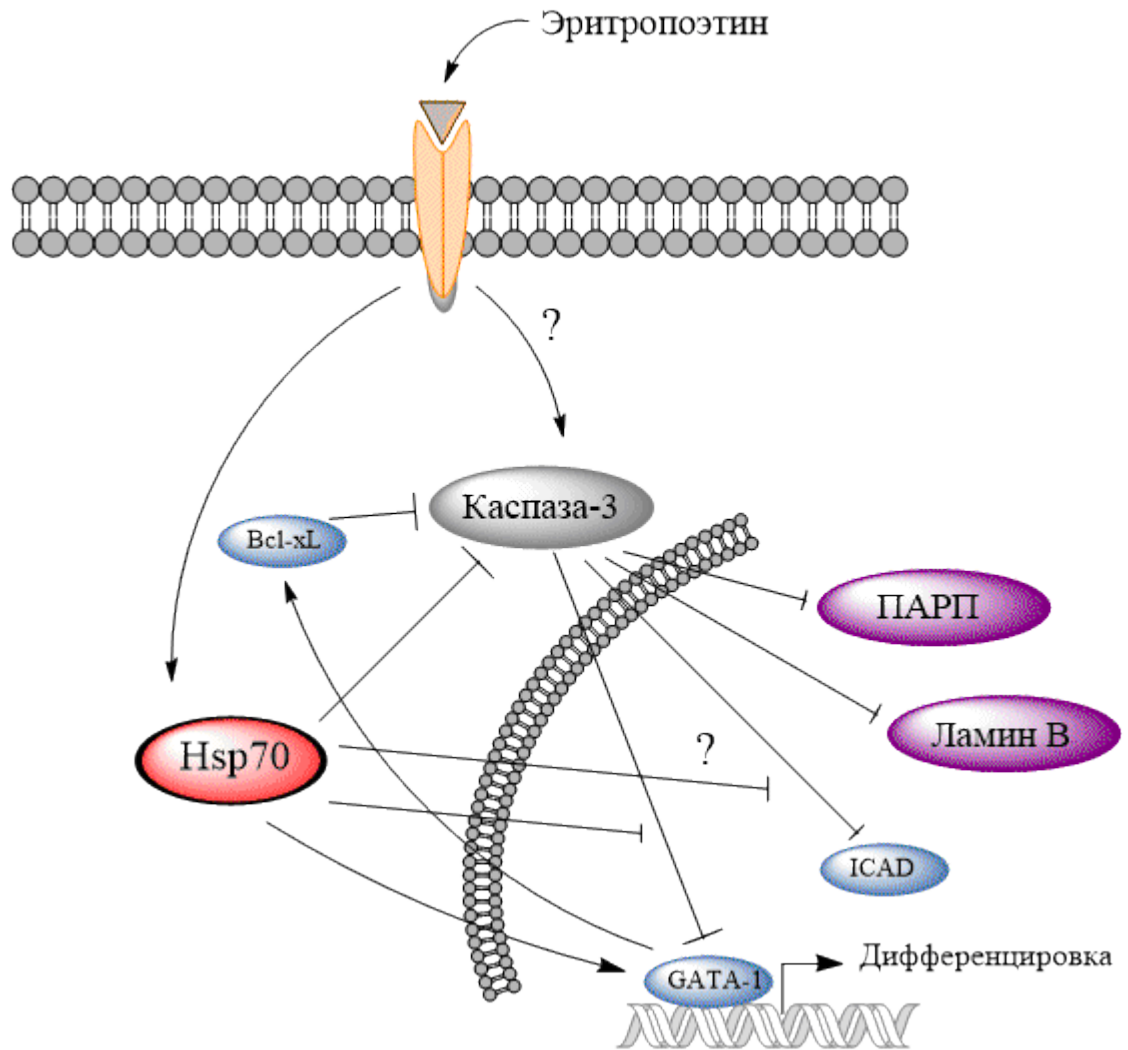


Рис. 2. Вовлечение каспазы-3 в дифференцировку эритробластов (по данным литературы).

Возможно, представленный сценарий недостаточно полный и эритропоэтин вызывает экспрессию какого-то, еще не идентифицированного, ингибитора каспаз, но ингибитора не сильного, оставляющего существенную часть каспаз в активном состоянии. Можно предположить, что роль такого ингибитора играет антиапоптотический белок Bcl-xL. Этот ингибитор способен эффективно предотвращать расщепление каспазами одной группы субстратов (ICAD и GATA-1), но не способен предотвращать расщепление субстратов другой группы (ПАРП и ламин В). В такой ситуации происходит дифференцировка эритробластов.

Анализ участия каспаз в дифференцировке и гибели эритробластов позволяет сделать и еще один, обобщающий, вывод. Активация каспаз происходит в самых разнообразных физиологических условиях, но конкретный результат индуцированных каспазами протеолитических событий зависит от спектра расщепляемых белков. Спектр каспазных субстратов различается в разных ситуациях, и каким он будет, сложным образом зависит от каспаз, их субстратов, или иных молекул, регуляторов. Возможно, такими регуляторами каспаз являются обратимые конкурентные ингибиторы, но ингибиторы слабые, не способные полностью подавить активность каспаз, но способные уменьшить расщепление каспазами белков одной группы, при этом сохраняя расщепление каспазами белков другой группы. С энзимологической точки зрения, к первой группе каспазных субстратов относятся субстраты с высоким значением  $K_m$ , а ко второй – с низким. Кроме того, возможно, между этими двумя группами каспазных субстратов нет различия по  $K_m$ , а различия лишь по концентрации, и белков первой группы гораздо меньше, чем белков второй. Также возможно, что в разных ситуациях у субстратов каспаз изменяется доступность, например, субстрат каспазы меняет внутриклеточную локализацию и/или становится недоступен для расщепления каспазами. Конечно, возможны и другие схемы регуляции каспаз в клетке, но перечисленные выше выглядят наиболее вероятными.

Другим примером дифференцировки с потерей ядра является дифференцировка кератиноцитов. Эпидермис представляет собой несколько слоев лежащих друг на друге клеток, при этом клетки самого глубокого слоя постоянно делятся, а вновь образованные клетки постепенно вытесняются к поверхности кожи. В процессе продвижения в наружный слой клетки дифференцируются, теряют ядро и другие органеллы, постепенно становясь плоскими чешуйками с кератиновыми филаментами внутри. Ингибирование каспаз двумя разными ингибиторами, Z-VAD-FMK и Boc-D-FMK, приводит к образованию дифференцированных плоских кератиноцитов, в которых тем не



менее, остается ядро (Weil et al, 1999). Какая именно из каспаз принимает участие в процессе дифференцировки кератиноцитов, остается во многом спорным вопросом. Так, в первой работе по этой теме были получены свидетельства того, что каспаза-3 является основным эффектором в дифференцировке кератиноцитов (Weil et al, 1999). Практически сразу же были получены свидетельства о вовлечении в дифференцировку кератиноцитов каспазы-14 (Eckhart et al, 2000). Более того, участие каспазы-3 в дифференцировке в тот момент даже было поставлено под вопрос, при этом участие каспазы-14 в этом процессе все более подтверждалось (Lippens et al, 2000). Впоследствии в дифференцирующихся кератиноцитах была показана активация каспаз-3 и -9, но не каспазы-8 (Allombert-Blaise et al, 2003). Вскоре после этого появились четкие свидетельства о вовлечении в дифференцировку кератиноцитов и каспазы-3, и каспазы-14 (Okuyama et al, 2004). Несмотря на большой материал относительно вовлечения каспаз в дифференцировку кератиноцитов, субстраты каспаз и молекулярные механизмы регуляции активности каспаз в этом процессе изучены недостаточно. Установлено, что транскрипционный фактор Notch1 запускает дифференцировку кератиноцитов, а также активацию каспаз-3 и -14 (Okuyama et al, 2004). При этом кератиноциты без гена каспазы-3 экспрессируют маркеры терминальной дифференцировки в значительно меньшей степени, чем контрольные. В такой же степени дифференцировка кератиноцитов зависит от каспазы-14 и опосредованного ею расщепления основного структурного белка кератиноцитов – филаггрина (Yamamoto-Tanaka et al, 2014).

При дифференцировке повышается активность протеинкиназы PKC $\delta$ , причем это повышение зависит от каспазы-3 (Okuyama et al, 2004). Уровень ПАРП в течение дифференцировки не изменяется. Более конкретно указать механизмы вовлечения каспаз в дифференцировку пока нельзя, но можно предполагать некоторую общность со сценарием дифференцировки эритроидных предшественников. А именно, каспаза может быть активирована

на всем протяжении жизни кератиноцита, но ее активность точно регулируется на разных стадиях дифференцировки. При апоптозе каспазами расщепляется широкий спектр субстратов, а при дифференцировке спектр субстратов ограничивается небольшой группой белков.

Схема вовлечения каспазы-3 в дифференцировку кератиноцитов представлена на рис. 3. Более подробно вовлечение каспазы-3 в дифференцировку еще не изучено, хотя общность со сценарием дифференцировки эритробластов видна (ср. рис. 2). Неизвестно, какие ингибиторы принимают участие в ограничении активности каспазы-3 в клетке, также как и неизвестно, какие еще важные для дифференцировки субстраты каспаза-3 расщепляет при этом сценарии. Важным отличием является тот факт, что в кератиноцитах, в отличие от эритробластов, каспаза-3 не расщепляет ПАРП при дифференцировке.

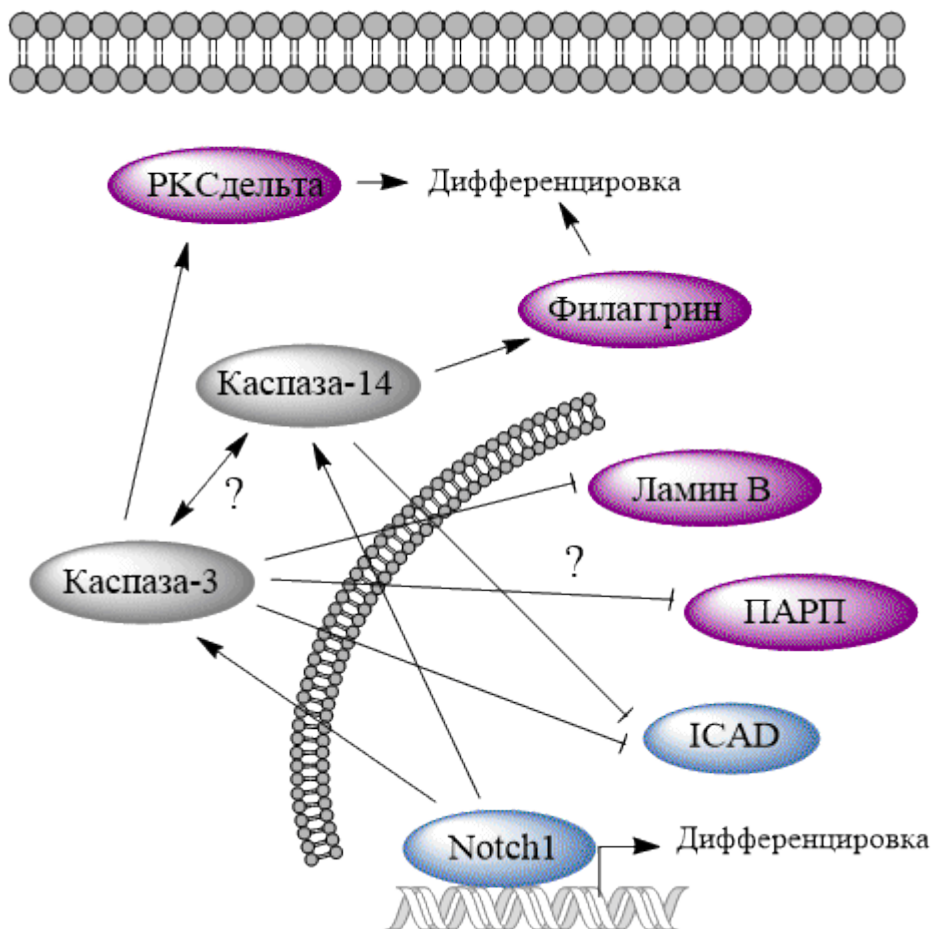


Рис. 3. Вовлечение каспазы-3 в дифференцировку кератиноцитов (по данным литературы).

Примером дифференцировки с потерей ядра является образование хрусталика. Хрусталик образуется в результате дифференцировки эпителиальных клеток, в этом процессе клетки теряют все органеллы, включая ядро, эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи, и становятся прозрачными для поступающего света. Морфологически процесс потери клетками ядра при дифференцировке очень похож на разрушение ядра при апоптозе, такое же сморщивание, образование глыбок хроматина, перераспределение хроматина по периферии ядра (Dahm & Prescott, 2002). Оказалось, что и в клетках этого типа дифференцировка сопровождается активацией каспаз (Ishizaki et al, 1998). Более того, в процессе дифференцировки происходит характерное для апоптоза расщепление ДНК и расщепление ПАРП, а каспазный ингибитор Z-VAD-FMK предотвращает и расщепление ПАРП, и разрушение ядра при дифференцировке (Bassnett & Mataic, 1997; Ishizaki et al, 1998). При дифференцировке клеток хрусталика, как и при апоптозе, расщепляются белки ламин В и спектрин, структурные белки, отвечающие за целостность цитоскелета, а также профилаггрин, белок, способствующий образованию кератиновых волокон (Bassnett & Mataic, 1997; Lee et al, 2001; Weil et al, 1999).

Все перечисленные результаты получены с использованием традиционного, но недостаточно специфичного подхода: ингибиторного анализа. Методически более надежная работа с использованием мутантов по каспазе-3, -6 и -7 не выявила участия ни одной из этих каспаз в дифференцировке клеток хрусталика (Zandy et al, 2005). Результат, безусловно, неожиданный, с учетом известной специфичности каспазных ингибиторов. Авторы указывают на то, что значительная доля субстратов каспаз расщепляется не специфичной для данного субстрата каспазой, а

другим ферментом, возможно, другой каспазой (Zandy et al, 2005). Анализируя результаты этой и предыдущих работ, можно прийти к заключению, что для реализации программы дифференцировки необходима активация сразу нескольких каспаз. Возможно, каспазы, между собой очень близкие по специфичности, могут при реализации дифференцировки расщеплять субстраты друг друга. В таком случае, регуляция функции каспаз в клетке, например, переключение с апоптоза на дифференцировку, может осуществляться через включение одного и выключение другого фермента этого семейства.

В существенной степени выяснены механизмы регуляции, и даже более конкретно, ограничения активности каспазы-3 при дифференцировке хрусталика (Basu et al, 2012). Оказывается, одновременно с активацией проапоптотического сигналинга по классическому митохондриальному пути и активацией каспазы-3 происходит активация сигналинга, запускаемого рецептором инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1) (Basu et al, 2012). Рецептор ИФР-1 активирует транскрипционный фактор NFκB, который запускает экспрессию антиапоптотических белков семейств Bcl-2 и IAP (Basu et al, 2012). Если в такой ситуации заблокировать активность NFκB, то экспрессия антиапоптотических белков падает, и активность каспазы-3 возрастает так, что клетка вместо дифференцировки умирает по апоптотическому сценарию (Basu et al, 2012). Важную роль в запуске сигналинга ИФР-1 играет рецептор α6 интегрин (Basu et al, 2014). И активация каспазы-3, и активация антиапоптотического сигналинга четко локализована внутри клеток, причем именно в той зоне, откуда начинается процесс дифференцировки.

Схема дифференцировки клеток хрусталика и вовлечение в этот процесс каспазы-3 представлены на рис. 4. Активность каспазы-3 в этом процессе необходима как для расщепления структурных белков (ламина В, спектрина, профилаггрина) и реорганизации цитоскелета, так и для активации ДНКазы и

разрушения (неизвестно, в какой степени селективного) ДНК. Особый интерес представляет регуляция активности каспазы-3 в этой ситуации. Оказывается, наряду с активацией каспазы-3 одновременно происходит также и повышение экспрессии ингибиторов каспаз – белков семейств Вc1-2 и IAP. Ингибиторы блокируют существенную часть активности каспазы-3, и если бы не это, в клетке происходило бы неконтролируемое увеличение активности каспазы-3 и впоследствии клеточная гибель. Именно поэтому очень важно, где и когда появляются ингибиторы каспазы-3 в клетке. Судя по всему, такое совместное локальное и одновременное увеличение активности каспазы-3 и концентрации ее ингибиторов является ключевым фактором регуляции активности этого фермента в клетке.

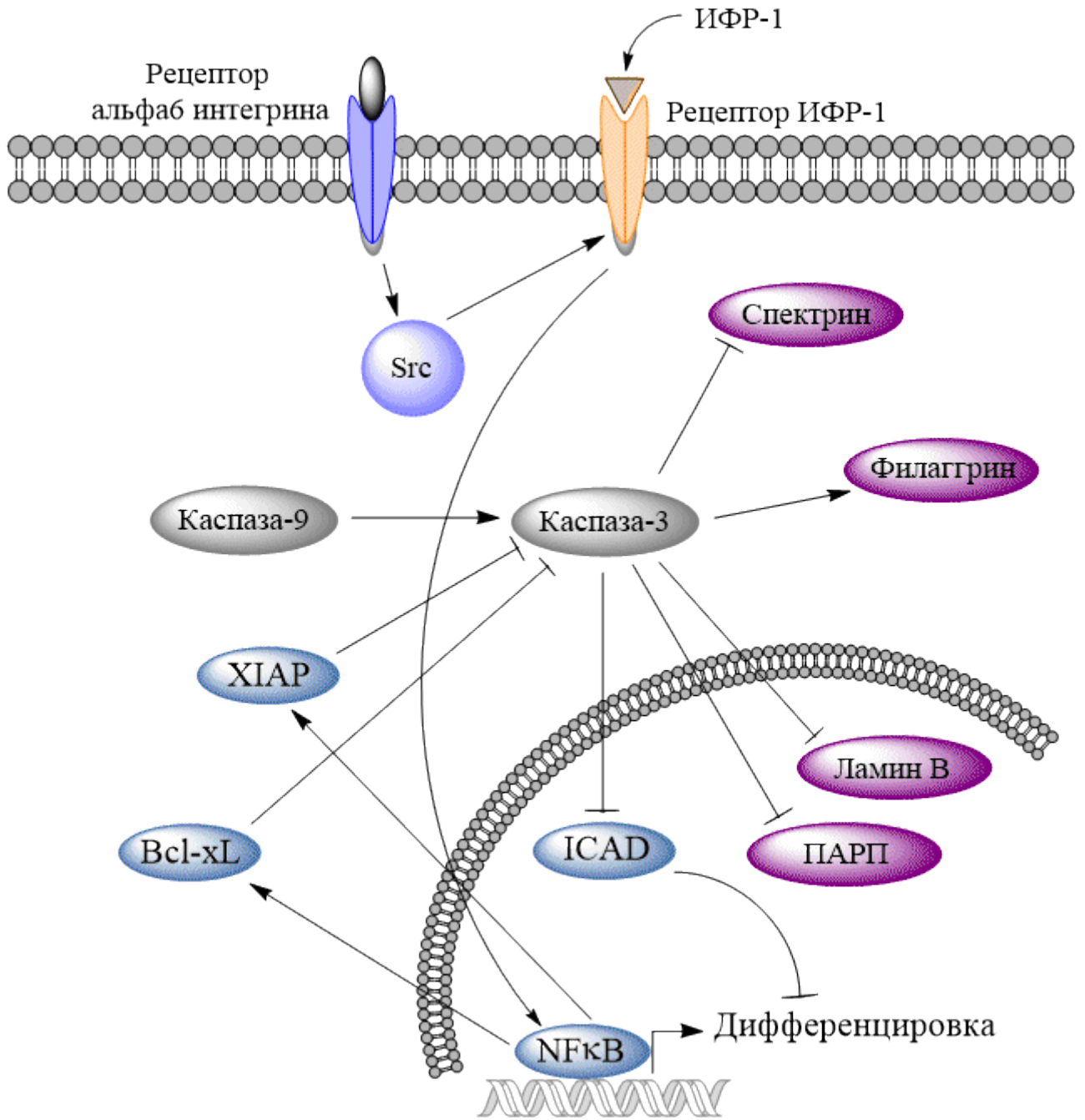


Рис. 4. Вовлечение каспазы-3 в дифференцировку клеток хрусталика (по данным литературы).

Тромбоциты уже в момент своего образования лишены ядра. Эти клетки отшнуровываются из длинных и тонких отростков цитоплазмы зрелого мегакариоцита. После отшнуровывания тромбоцитов мегакариоцит погибает по апоптотическому сценарию. Оказалось, что активные каспазы -3 и -9 обнаруживаются на всех этапах жизни мегакариоцита: в период созревания, в

период образования тромбоцитов и в последующий период гибели (de Botton et al, 2002). Одновременно с активированными каспазами обнаруживается расщепление актин-связывающего белка гельзолина и ПАРП. Кроме того, активная каспаза-3 проявляет необычную картину внутриклеточной локализации в мегакариоцитах перед началом образования тромбоцитов. В созревающем мегакариоците каспаза-3 активируется точно в цитоплазме клетки, тогда как при гибели активация каспазы-3 происходит диффузно по всему объему клетки (de Botton et al, 2002). При созревании мегакариоцита активация каспазы-3 не сопровождается фрагментацией ДНК. И напротив, при индукции апоптоза стауроспорином активация каспазы-3 сопровождается фрагментацией ДНК, при этом тромбоциты не образуются. Ингибиторы каспазы-3 и -9, также как и панкаспазный ингибитор, предотвращают образование тромбоцитов, также как и оверэкспрессия антиапоптотического белка Bcl-2 (de Botton et al, 2002).

Анализ образования тромбоцитов позволяет сделать некоторые заключения относительно регуляции каспаз в этом процессе. Так, субстраты каспаз при созревании мегакариоцитов такие же, как и при гибели этих клеток, а ингибиторы каспаз, как и оверэкспрессия антиапоптотического белка Bcl-2, предотвращают как гибель, так и созревание этих клеток. Важным различием активации каспазы-3 при созревании и при гибели является характерная картина распределения активной каспазы-3 по клетке, при созревании это точечная активация, тогда как при гибели это диффузная активация по всей клетке (рис. 5). Таким образом, при дифференцировке активная каспаза-3 может быть локализована в определенных компартментах, тогда как при гибели каспаза-3 распределена по всей клетке. Вероятно, что в таком случае основными регуляторами каспазы-3 будут ингибиторы/активаторы этого фермента, распределенные по разным внутриклеточным компартментам и меняющие распределение в зависимости от стимула (например, при индукции дифференцировки или гибели). В этой ситуации могут, также

предположительно, участвовать некоторые пока неизвестные субстраты каспазы-3. Этими субстратами будут являться те молекулы, которые расщепляются каспазой-3 при индукции апоптоза, но, в силу локальности активации каспазы-3 во время дифференцировки, не расщепляются при дифференцировке. Соответственно, такие субстраты нужно искать в компартментах, в которых каспаза-3 не активируется при дифференцировке.

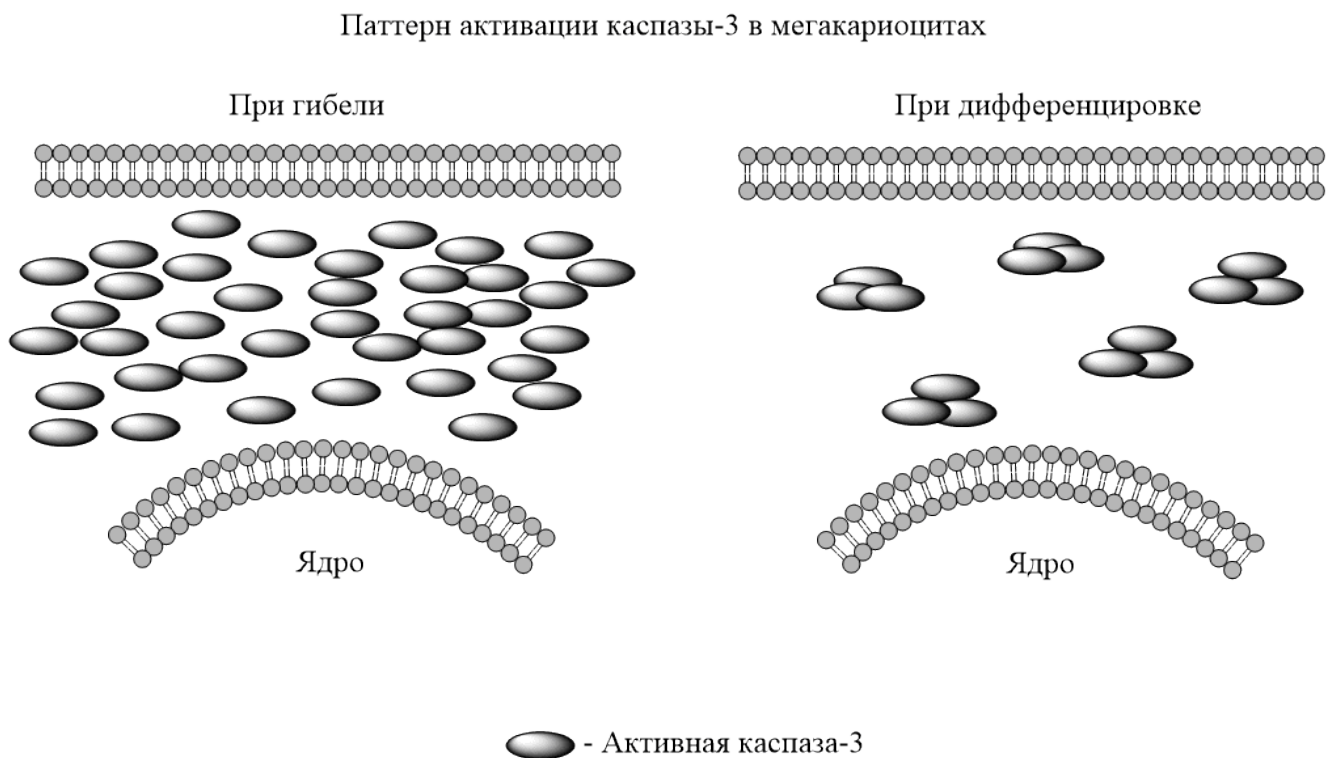


Рис. 5. Распределение активной каспазы-3 внутри мегакариоцита при гибели и при дифференцировке (по данным литературы).

К настоящему времени известно несколько типов клеток, в которых потеря ядра при дифференцировке связана с активацией каспазы-3: предшественники эритроцитов, кератиноциты, клетки хрусталика и мегакариоциты. Именно потеря ядра делает похожей картину дифференцировки и апоптоза в клетках этих типов, при этом сходство не



только морфологическое. Каспаза-3 активируется во всех перечисленных ситуациях и, более того, расщепляет примерно сходный набор субстратов.

Объединяющий практически все описанные ситуации субстрат каспазы-3 – ПАРП. Также во всех ситуациях каспаза-3 расщепляет как минимум один структурный белок – ламин, спектрин, гельзолин, профилаггрин. В настоящее время нельзя сказать ничего более конкретного про сходство и различие субстратов каспазы-3 при дифференцировке с потерей ядра и при апоптозе. Также неизвестны способы регуляции каспазы-3 в этих ситуациях. Но, основываясь на данных литературы, можно сделать несколько предположений о том, чем различается активация каспазы-3 при апоптозе и при этом виде дифференцировке. Возможно, при дифференцировке каспаза-3 активируется совместно со своим ингибитором, который ограничивает ее активность по отношению к одним субстратам и не влияет на активность по отношению к другим за счет своей константы связывания с каспазой. Более того, этот ингибитор может быть экспрессирован в определенных клеточных компартментах, ограничивая активность каспазы-3 локально в конкретном компартменте. Возможно, что такой локальный ингибитор отвечает за переключение каспазы между апоптозом и дифференцировкой.

Вовлечение каспазы-3 в дифференцировку не ограничивается теми типами клеток, в которых при дифференцировке происходит потеря ядра. Многие примеры подтверждают участие каспазы-3 в дифференцировке других типов клеток и о регуляции каспазы-3 в этих ситуациях известно немного больше, чем при дифференцировке с потерей ядра.

Моноциты дифференцируются в макрофаги под действием макрофагального колониестимулирующего фактора. В этом процессе непосредственное участие принимают каспазы -3 и -9 (Sordet et al, 2002). Активация каспаз в этой ситуации не связана с клеточной гибелью, и дифференцировка моноцитов в дендритные клетки не сопровождается активацией каспаз. При дифференцировке моноцитов в макрофаги, как и при

апоптозе в этих клетках, происходит выход цитохрома с из митохондрий и расщепление структурного компонента клеточного ядра – белка ацинус. Интересно, что ПАРП расщепляется при апоптозе в этих клетках, но не расщепляется при дифференцировке. Ингибирование каспаз как синтетическими, так и природными ингибиторами, останавливает процесс дифференцировки и запускает процесс каспазозависимой неапоптотической клеточной гибели (Cathelin et al, 2006; Sordet et al, 2002). По другим данным, дифференцировка моноцитов в макрофаги под действием интерлейкина-32 также сопровождается активацией каспазы-3, но не зависит от каспаз -1, -8 и -9 (Netea et al, 2008). Краткая схема процессов представлена на рис. 6.

Была предпринята попытка идентифицировать субстраты каспазы-3 при дифференцировке моноцитов в макрофаги (Cathelin et al, 2006). Оказалось, что в процессе дифференцировки по сайтам, характерным для каспаз, расщепляются тубулин, p21-активируемая киназа 2 (PAK-2), гетерогенный ядерный нуклеопротеин hnRNP C1/C2, ингибитор активатора плазминогена - 2 (PAI-2), белок цитоскелета винкулин (Cathelin et al, 2006). Еще одним важным субстратом каспаз при дифференцировке является протеинкиназа RIP1, ее расщепление ингибирует активность транскрипционного фактора NF-κB (Rebe et al, 2007).

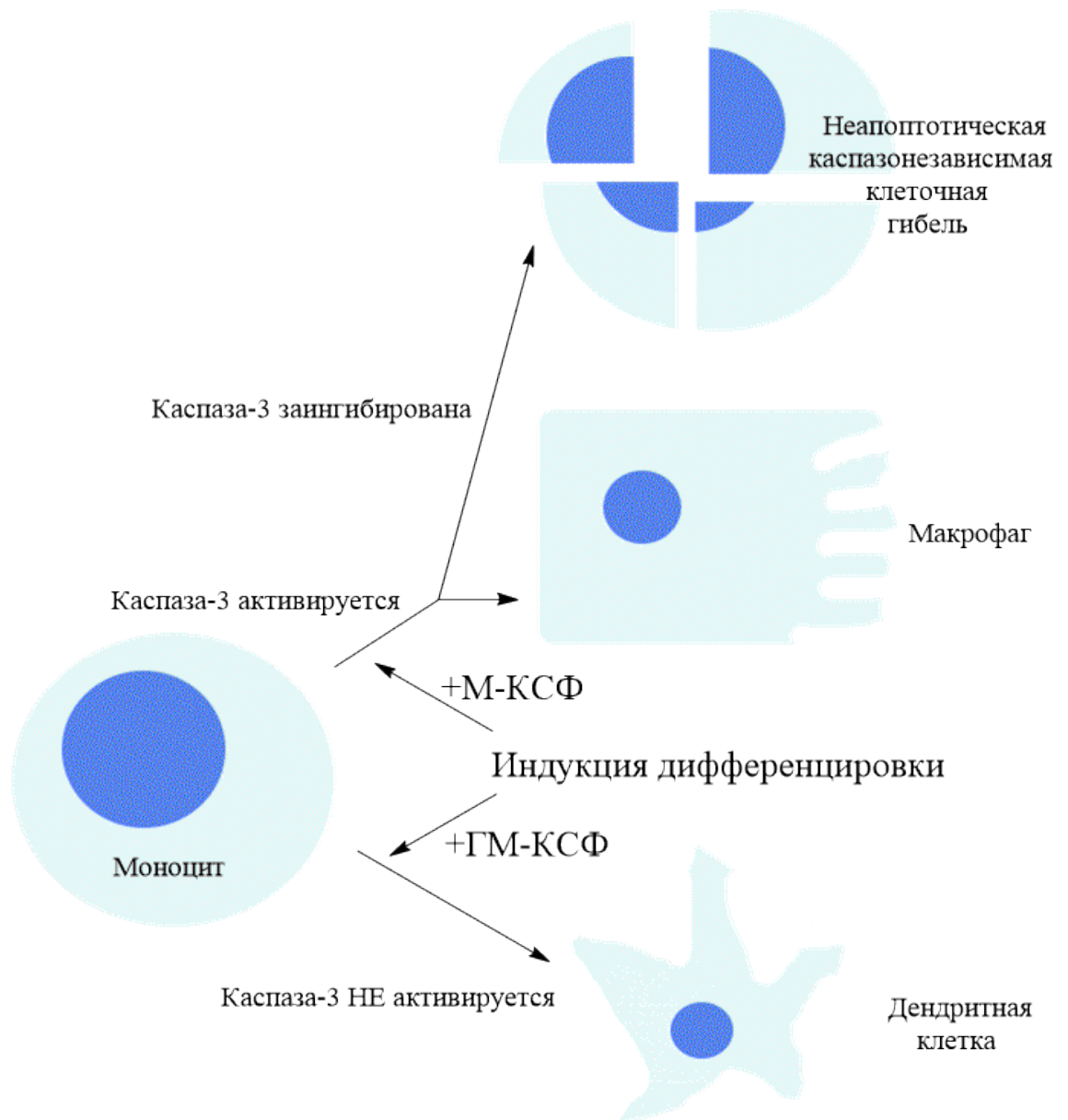


Рис. 6. Пути дифференцировки моноцита под действием различных индукторов (по данным литературы).

Как уже было сказано, дифференцировка моноцитов в дендритные клетки под действием гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора не вызывает активацию каспаз (Sordet et al, 2002). Но если недавно образовавшиеся дендритные клетки подвергнуть воздействию макрофагального колониестимулирующего фактора, то такие клетки получают некоторую промежуточную морфологию между дендритными клетками и макрофагами (Lo et al, 2007). Процесс такого

«передифференцирования» сопровождается активацией каспаз -3, -8 и -9, а ингибирование каспазы-8 или каспазы-9 специфическими ингибиторами возвращает этим клеткам исходную морфологию дендритных клеток (Lo et al, 2007). Регулятором этого процесса является фосфатидилинозитол-3 киназа, так как ингибиторы этой киназы предотвращают активацию каспаз (Lo et al, 2007). Интересно, что интерлейкин-4 может предотвращать активацию каспазы-3 за счет увеличения экспрессии антиапоптотических белков семейства Bcl-2 и за счет ингибирования Fas индуцированного сигналинга (Rautajoki et al, 2007). Таким образом, дифференцировка моноцитов в макрофаги, но не в дендритные клетки, сопровождается активацией каспазы-3. В этом процессе, как и при апоптозе, активность каспазы-3 зависит от транскрипционного фактора NF-κB и фосфатидилинозитол-3 киназы, а субстратами каспазы являются структурные белки клетки, но не ПАРП.

Дифференцировка мышечных клеток происходит с участием каспазы-3 (Fernando et al, 2002; Larsen et al, 2010). Миогенез представляет собой многоступенчатый процесс, в котором сначала пролиферирующие одноядерные миобласты выходят из клеточного цикла, затем дифференцируются в миоциты и сливаются друг с другом с образованием многоядерных миотрубок – функциональных единиц мышечных волокон. Давно известно, что на ранних стадиях дифференцировки миобластов в этих клетках отмечается временное повреждение ДНК (Farzaneh et al, 1982). Аналогично, дифференцировка моноцитов и гранулоцитов сопровождается появлением одиночных и двойных разрывов ДНК, при этом ингибиторы репарации ДНК снижают выраженность дифференцировки (Khan & Francis, 1987). Также в миобластах на ранних стадиях дифференцировки появляются одноцепочечные разрывы ядерной ДНК в результате активации ДНКазы, которую перед этим активирует каспаза-3 (Larsen et al, 2010). Ингибирование ДНКазы или каспазы-3 в такой ситуации предотвращает дифференцировку миобластов (Larsen et al, 2010).

Существенную роль в дифференцировке миобластов играет каспаза-9 (Murray et al, 2008). При дифференцировке миобластов не происходит нарушения целостности мембраны митохондрий и выхода проапоптотических белков в цитоплазму, тем не менее, каспаза-9 активируется и активирует каспазу-3 (Murray et al, 2008). Оверэкспрессия известного ингибитора каспаз, Bcl-xL (Clem et al, 1998), также как и подавление экспрессии каспазы-9 с помощью миРНК приводит к подавлению активности каспазы-3 и подавлению дифференцировки (Murray et al, 2008).

Активность каспаз -3 и -8 резко возрастает после индукции дифференцировки в миобластах, а образования миофибрилл не происходит на фоне специфического ингибитора каспазы-3 Z-DEVD-FMK (Fernando et al, 2002). Интересно, что в этой ситуации даже при ингибировании каспазы-3 происходит расщепление ПАРП, как и при апоптозе, что позволяет предполагать наличие в клетке фермента(-ов), близких каспазе по структурной и функциональной специфичности. Каспаза-3 при дифференцировке миобластов расщепляет и активирует киназу MST1, которая активирует p38 MAPK, тем самым запуская фосфорилирование и активацию специфических транскрипционных факторов (Fernando et al, 2002). Еще одной киназой, которую расщепляет и активирует каспаза-3 при дифференцировке миобластов, является киназа Nek5, причем активность каспазы-3 возрастает под действием продуктов расщепления этой киназы (Shimizu & Sawasaki, 2013). Протеинкиназа HIPK2 является репрессором дифференцировки в миобластах, а каспаза расщепляет эту протеинкиназу при индукции дифференцировки (de la Vega et al, 2013). Еще один репрессор дифференцировки, транскрипционный фактор Pax7, также расщепляется каспазой-3 (Olguin, 2011).

Остается малоизученным, каким образом каспазы активируются при дифференцировке миобластов. Широко распространено предположение, что каспазы при дифференцировке активируются как часть апоптотического

сигналинга, ограниченно активируемого при дифференцировке. Однако, активация каспаз при дифференцировке может происходить по отличному от апоптотического сценарию. Так, каспаза-3 активируется при дифференцировке миобластов в отсутствие активации каспаз -8 и -9 (Bloemberg & Quadrilatero, 2014), что несколько противоречит ранее опубликованным результатам (Fernando et al, 2002; Murray et al, 2008). Одним из объяснений этого противоречия может служить пересекающаяся субстратная и ингибиторная специфичность разных представителей семейства каспаз, так что ингибируя, например, каспазу-8, можно заингибировать и другие каспазы, а это, в свою очередь, и определит физиологическое значение ингибирования каспазы-8. Каспаза-3 при дифференцировке миобластов может быть активирована каспазой-2 (Bloemberg & Quadrilatero, 2014). Апоптотический сигналинг в этой ситуации не активирован, а концентрация цитоплазматического цитохрома с, известного индуктора активации каспаз, даже снижена. Вероятно, хорошо известный ингибитор каспаз XIAP также не принимает участие в регуляции активности каспаз при дифференцировке миобластов (Bloemberg & Quadrilatero, 2014).

Таким образом, во многих сценариях дифференцировки миобластов активируется каспаза-3 и запускает многие ключевые для дифференцировки процессы, но остается невыясненным, почему каспазы в клетке не начинают расщеплять и другие свои субстраты, то есть как в клетке ограничивается каспазная активность. К настоящему времени выяснен один из возможных механизмов ограничения каспазной активности в дифференцирующихся миобластах. А именно: в дифференцированных клетках по сравнению с недифференцированными сильно повышено содержание ингибиторов каспаз и белков теплового шока, в том числе Hsp27 и Hsp70 (Xiao et al, 2011). Уровень ингибиторов повышен настолько, что несмотря на 10-ти кратное увеличение активности каспазы-3 и сравнимое увеличение содержания других проапоптотических белков, миобласты после дифференцировки становятся в

разы менее чувствительны к традиционным апоптотическим индукторам, таким как стауроспорин (Xiao et al, 2011). В этом случае каспаза-3 запускает программу дифференцировки, одним из результатов которой является повышение экспрессии ингибиторов самой каспазы, что является отрицательной обратной связью с точки зрения регуляции активности каспазы-3 в клетке.

Вовлечение каспазы-3 в дифференцировку миобластов является весьма показательным с точки зрения неапоптотической роли каспазы-3 (рис. 7). С одной стороны, активация каспазы-3 в этом сценарии дифференцировки происходит классически, под действием активаторных каспаз. С другой стороны, расщепляемые каспазой-3 субстраты не совпадают с классическим апоптотическим набором. Тем не менее, среди субстратов каспазы-3 в этой ситуации присутствуют (как и в большинстве ситуаций, не связанных с клеточной гибелью) белки ПАРП и ICAD, из чего можно сделать вывод о важности и необходимости каспазы-3 для контроля ядерной ДНК как при апоптозе, так и при дифференцировке. Таким образом, в любой физиологической или патологической ситуации каспаза-3 отвечает за запуск расщепления (неизвестно, насколько специфического) ядерной ДНК, в случае апоптоза или при дифференцировке, не имеет значения. При дифференцировке миобластов активация каспазы-3 приводит к увеличению концентрации специфических для дифференцировки транскрипционных факторов MEF2, причем каспаза-3 как устраняет ингибирование этих транскрипционных факторов, расщепляя киназу HIPK2, так и активирует посредством активации другой киназы, MST1. Можно сказать, что каспаза-3 вовлечена в дифференцировку миобластов сразу по нескольким сигнальным путям, и не менее важна для этого процесса, чем для исполнения апоптоза. Ограничение активности каспазы-3 происходит с помощью каспазных ингибиторов, Bcl-xL, Hsp27 и Hsp70. Судя по всему, именно с помощью

локальной экспрессии ингибиторов клетка регулирует активность каспазы-3 в ситуациях, не связанных с апоптозом.

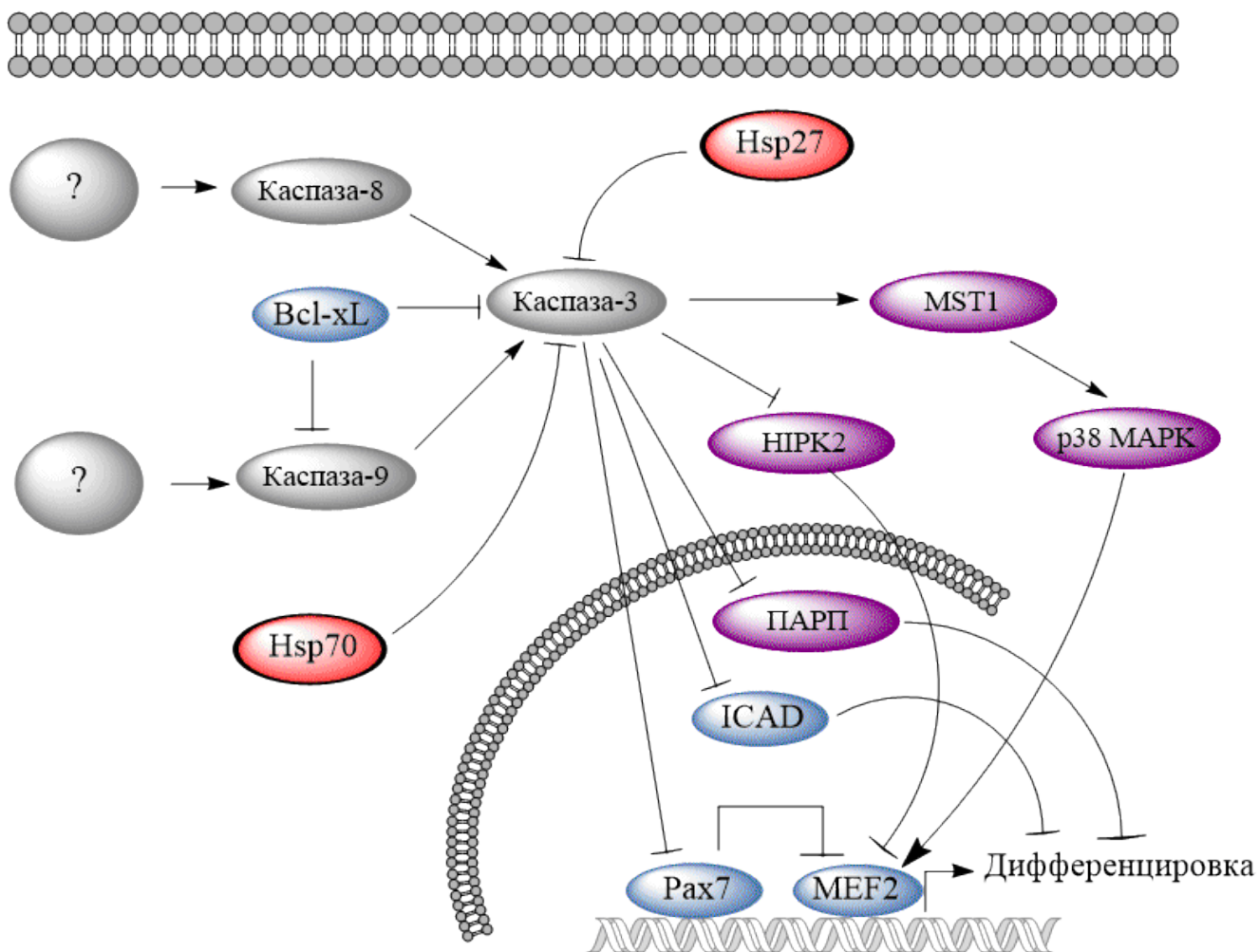


Рис. 7. Вовлечение каспазы-3 в дифференцировку миобластов (по данным литературы).

Дифференцировка остеобластов зависит от активации каспазы-8, каспазы-2 и каспазы-3 (именно в таком порядке) (Mogi & Togari, 2003). Никаких свидетельств гибели клеток при таком сценарии дифференцировки не обнаружено. Более того, у мышей, дефицитных по гену каспазы-3, существенно снижена плотность костей за счет сниженной дифференцировки предшественников остеобластов (Miura et al, 2004).

Существенную роль каспаза-3 играет в дифференцировке нейрональных стволовых клеток (Fernando et al, 2005). При дифференцировке этих клеток в естественных условиях активность каспазы-3 в дифференцирующихся, но не



в остающихся в стволовом состоянии клеток, неуклонно возрастает примерно сутки, достигая к этой временной точке уровня примерно десятикратного превышения активности над активностью в покоящихся клетках (Fernando et al, 2005). В этих же клетках не происходит расщепление ПАРП, даже на более поздних сроках.

После ингибирования каспазы-3 в нейрональных стволовых клетках из них не образуются ни астроглия, ни олигодендроциты, ни нейроны, клетки, которые в норме образуются из стволовых клеток в процессе дифференцировки (Fernando et al, 2005). При этом концентрация маркера стволового состояния, белка нестина, убывает со временем в стволовых клетках при дифференцировке, но остается на постоянном уровне в этих клетках, если в них ингибирована каспаза-3. Дифференцировка нейрональных стволовых клеток сопровождается образованием и ростом нейритов, а ингибирование каспазы-3 в несколько раз снижает длину образовавшихся при дифференцировке отростков (Fernando et al, 2005). Ингибирование каспазы-3 сопровождается снижением активности киназы p38 MAPK, а также киназ PAK1 и ASK1. Судя по всему, в этой ситуации конечным звеном, необходимым для дифференцировки, является фосфорилирование транскрипционных факторов семейства MEF2 (Fernando et al, 2005).

В сценарии дифференцировки нейрональных стволовых клеток, зависящем от каспазы-3, важную роль играет транскрипционный фактор p53 (Aranha et al, 2009). Дифференцировка клеток сопровождается снижением сигналинга Akt/фосфо-FOXO3A/Id1, а ингибирование каспазы-3 повышает уровень Akt/фосфо-FOXO3A/Id1, снижает активность p53 и существенно задерживает дифференцировку предшественников в нейрональные и глиальные клетки (Aranha et al, 2009). Во время дифференцировки повышается активность каспазы-3, активация транскрипционного фактора p53 и его транскрипционная активность (связывание с ДНК) (Aranha et al, 2009).

Снижение активности Akt/фосфо-FOXO3A/Id1 в этой ситуации как раз и опосредуется повышением активности каспазы-3.

Эмбриональные стволовые клетки способны к неограниченному самовоспроизведению и характеризуются способностью к дифференцировке в клетки любого типа. В поддержании стволового состояния клетки основную роль играют транскрипционные факторы, в первую очередь Oct4, Sox2 и Nanog, и, для перехода в дифференцированное состояние экспрессия этих транскрипционных факторов должна быть изменена. Оказывается, каспаза-3 расщепляет транскрипционный фактор Nanog после индукции дифференцировки, не позволяя клетке оставаться в стволовом состоянии (Fujita et al, 2008). Стволовые клетки без гена каспазы-3 не могут нормально дифференцироваться, а экспрессия в этих клетках мутантного белка Nanog, устойчивого к расщеплению каспазой-3, блокирует переход клеток в дифференцированное состояние (Fujita et al, 2008). Усиления апоптотической гибели клеток после индукции дифференцировки в эмбриональных стволовых клетках не происходит, несмотря на многократное увеличение активности каспазы-3 в течении первых суток после индукции (Fujita et al, 2008). Примерно в это же время происходит расщепление PARP.

С помощью биохимических и иммуногистохимических методов показано, что в клетках постнатального мозжечка крысы обнаруживается активная каспаза-3 (Oomman et al, 2004). При этом активная каспаза-3 не связана с исполнением апоптоза, так как в тех клетках, в которых она обнаруживается, не происходит конденсации хроматина, экстернализации фосфатидилсерина и фрагментации ДНК (Oomman et al, 2004). Активная каспаза-3 обнаруживается в пролиферирующих и дифференцирующихся клетках, но не в терминально дифференцированных (Oomman et al, 2004). В дальнейшем было установлено, что клетки, в которых активируется каспаза-3 в постнатальном онтогенезе (в период с примерно 8-го по 21-й день), являются глиальными (Oomman et al, 2005). Можно быть уверенными, что в этих

клетках не происходит активации апоптотической гибели, причем в основном это не пролиферирующие, а дифференцирующиеся клетки (Oomman et al, 2005).

Ингибирование каспазы-3 в культуре постнатальных клеток постнатального мозжечка крысы приводит к увеличению числа пролиферирующих предшественников и снижению числа дифференцирующихся глиальных клеток (Oomman et al, 2006). Максимум числа клеток с активной каспазой-3 приходится на 15-й постнатальный день, именно в этот период начинается активная дифференцировка глиальных клеток (Finckbone et al, 2009). В другой области мозга, гиппокампе, активная каспаза-3 обнаруживается вплоть до 56-го постнатального дня, причем локализуется и в пролиферирующих клетках субвентрикулярной зоны, и в дифференцирующихся клетках многих других областей гиппокампа (Chang et al, 2012). Неизвестно, в какие типы клеток дифференцируются каспазо-позитивные предшественники, но, как бы то ни было, каспаза-3 осуществляет регуляцию пролиферации и дифференцировки клеток постнатального мозга, не вызывая при этом гибели клеток.

Активная каспаза-3 обнаружена в нейронах обонятельных луковиц в первые две недели постнатального онтогенеза (Yan et al, 2001). В каспазо-позитивных клетках в этой ситуации признаков апоптоза не обнаружено, зато есть основания полагать, что это клетки, делящиеся в пролиферативных зонах, мигрирующие в обонятельную луковицу и дифференцирующиеся там в нейроны (Yan et al, 2001).

Не так давно обнаружен новый интересный факт относительно реализации каспазой-3 своих неапоптотических функций. Оказывается, каталитически неактивная проформа каспазы-3, прокаспаза-3 принимает участие в целом ряде неапоптотических процессов (Brentnall et al, 2014). В частности, проформа каспазы-3 регулирует секрецию фибронектина и оказывает влияние на морфологию, адгезию и миграцию клеток (Brentnall et

al, 2014). К настоящему времени никакого объяснения для этого факта не найдено.

Апоптоз и дифференцировка схожи морфологическими и биохимическими изменениями не только в ядре. Так, дифференцировка нейронов характеризуется ростом нейритов, которая в свою очередь зависит от перестроек цитоскелета, схожих с изменениями, которые часто происходят во время апоптоза. Возможно, биохимический механизм, запускающий перестройку цитоскелета является общим для апоптоза и дифференцировки клеток некоторых типов. В мышцах реорганизация актинового цитоскелета является характерным признаком как апоптоза (Hall & Nobes, 2000), так и дифференцировки (Gallo et al, 1999; Qu et al, 1997). Слияние мембран как при апоптозе, так и при дифференцировке миобластов, происходит при участии матриксных металлопротеиназ (Powell et al, 1999; Yagamihromasa et al, 1995). Одна из самых характерных черт апоптоза, изменение концентрации фосфатидилсерина на внутренней и внешней стороне мембраны клетки, также является составной частью слияния мембран при образовании многоядерных мышечных волокон (van den Eijnde et al, 2001). Рассматривая общность морфологических изменений клетки при апоптозе и при дифференцировке нетрудно прийти к выводу об общем эволюционном происхождении, или конвергентной эволюции, этих двух важнейших биологических процессов (Fernando & Megeneu, 2007). В таком случае, легко прийти к заключению об общности пусковых биохимических механизмов, лежащих в основе и апоптоза, и дифференцировки.

### **Регуляция активности каспазы-3**

Протеолиз является необратимым в физиологических условиях, поэтому в клетке активность любой протеазы очень тщательно регулируется. Считается, что существует три стратегии для предотвращения нежелательной активации каспаз – это ингибирование каспаз, деградация каспаз и так

называемые ингибиторы-ловушки (Pop & Salvesen, 2009). Природные ингибиторы каспаз используют такую стратегию ингибирования: участок белковой цепи ингибитора имитирует хороший каспазный субстрат и связывается с субстратным карманом протеазы, при этом может происходить медленное расщепление ингибитора, хотя в некоторых случаях ингибирование необратимо (Callus & Vaux, 2007). Самыми известными ингибиторами каспаз, действующими таким способом, являются вирусные белки CrmA и p35/p49. CrmA при физиологических условиях ингибирует каспазы-1, -8 и -10, предотвращая характерную для апоптоза активацию каспаз, тогда как p35/p49 более или менее эффективно ингибирует все каспазы (Callus & Vaux, 2007). В случае p35/p49 каспазы распознают и расщепляют консенсусную последовательность в ингибиторе, но образовавшийся продукт образует с ферментом тиюэфирную связь, не позволяя ферменту вступить в новый цикл катализа (Zhou et al, 1998b). Такая ингибиторная стратегия является неспецифичной, так как все ферменты, распознающие «приманку» на ингибиторе, могут быть ингибированы таким способом.

Клетка для ингибирования своих собственных каспаз использует другую стратегию, экспрессию специфичных каспазных ингибиторов, таких как XIAP. Хотя белок XIAP и гомологичен вирусным ингибиторам каспаз, он ингибирует каспазы по гораздо более тонкому механизму. XIAP представляет собой мультидоменный белок, связывающий и ингибирующий каспазу-9 посредством домена BIR3, и связывающий и ингибирующий каспазы-3 и -7 посредством домена BIR2 (Deveraux & Reed, 1999). При этом белок XIAP за счет другого своего домена, RING, является E3 убиквитин лигазой, так что обеспечивает деградацию своего комплекса с каспазами по протеасомальному пути (Yang et al, 2000), хотя даже и без убиквитинилирования ингибирование происходит эффективно. Мыши-мутанты, экспрессирующие белок XIAP с удаленным доменом RING, также как и мыши без белка XIAP вообще, демонстрируют повышенную чувствительность к индукции апоптоза в

некоторых клетках организма, также как и повышенный уровень каспаз в норме в этих клетках (Schile et al, 2008). Стоит отметить, что XIAP превосходит других членов семейства ингибиторов апоптотических белков по эффективности ингибирования каспаз и является единственным членом этого семейства, способным на непосредственное связывание с молекулами протеаз, другие члены этого семейства действуют по другому, не до конца понятному, принципу (Eskelman et al, 2006).

Еще одним механизмом регуляции активности каспаз в клетке является деградация этих ферментов с помощью протеасомы. Особенно быстро подвергаются деградации активированные формы каспаз, неактивные проформы имеют большее время жизни (Tawa et al, 2004). Мутантные формы каспазы-3 живут в клетке обратно пропорционально своей каталитической активности, что, разумеется, подразумевает зависимый от каталитической активности сценарий деградации каспазы-3 (Tawa et al, 2004). В основном, деградация происходит по протеасомальному пути, как описано выше для XIAP (Yang et al, 2000), хотя возможны и исключения. Так, фактор роста нервов способен предотвращать апоптоз, вызванный разными цитотоксическими агентами, за счет селективной деградации каспазы-3 в лизосомах (Mnich et al, 2014). Этот процесс не зависит от каталитической активности каспазы-3 и его регуляция требует дальнейшего изучения (Mnich et al, 2014). Схожий процесс ограничения активности путем деградации в лизосомах описан и для каспазы-8 (Hou et al, 2010), хотя механизм захвата ферментов в лизосомы существенно различается между каспазами-3 и -8 (Hou et al, 2010; Mnich et al, 2014).

Показано прямое убиквитинилирование каспаз-3 и -7, но не каспазы-1, белком из семейства белков ингибиторов апоптоза, cIAP2 (Huang et al, 2000). Косвенные данные также указывают на роль протеасомальной деградации в регуляции каспаз. Так, ингибитор протеасомы лактацистин за 8 часов воздействия на клетки HL-60 вызывает увеличение активности каспазы-3 в

этих клетках в 38 раз, при этом активности каспаз-8 и -9 остаются практически неизменны (Chen et al, 2003). В этих клетках протеасома расщепляет только активные субъединицы каспазы-3, но не ее неактивную проформу (Chen et al, 2003). Также показано, что любой из лизинов субъединицы p12 каспазы-3 может быть убиквитинилирован. Лактацистин вызывает апоптоз в клетках HL-60, при этом каспаза-3 расщепляет и инактивирует белок XIAP, который является ее ингибитором (Chen et al, 2003).

Еще один механизм ограничения активности каспаз основан на структурных особенностях так называемых ингибиторов-ловушек. Особенностью структуры ингибиторов-ловушек каспаз является то, что такие белки состоят из доменов, гомологичных продоменам каспаз, но не содержат каталитически активной части. Такие ингибиторы конкурируют за связывание и вытесняют каспазы из активационных комплексов (Kersse et al, 2007; Tschopp et al, 1998). Каспазы в этом случае так и остаются в виде каталитически неактивных зимогенов. Строго говоря, ингибиторы такого типа не являются собственно ингибиторами, скорее их можно назвать каталитически неактивными гомологами. Тем не менее, такая стратегия остается одной из самых востребованных и эффективных стратегий клетки по предотвращению нежелательной активации каспаз.

Кроме собственно ингибиторов каспаз клетка использует и другие механизмы регуляции активности этих ферментов. В первую очередь, это процессы посттрансляционной модификации, а также связанные с ними межмолекулярные взаимодействия каспаз с разнообразными модуляторами, увеличивающими или уменьшающими активность этих ферментов. В числе первых работ по этой теме появились работы, посвященные регуляции каспазной активности протеинкиназами. Активность каспазы-3 регулируется протеинкиназами Сдельта (PKCСдельта) и p38 MAPK, причем активность каспазы-3 в результате фосфорилирования может как повышаться, так и понижаться в зависимости от сайта фосфорилирования (Alvarado-Kristensson

et al, 2004; Voss et al, 2005). Для РКСдельта каспаза-3 представляет собой достаточно специфичную мишень, как в норме, так и при индукции апоптоза (Voss et al, 2005). Как *in vitro*, так и при индукции клеточной гибели несколькими агентами на культуре клеток, фосфорилирование протеинкиназой РКСдельта каспазы-3 увеличивает активность последней примерно на 30 % (Voss et al, 2005). Кроме того, во всех исследованных ситуациях как спонтанной, так и индуцированной клеточной гибели, активация протеинкиназы РКСдельта происходит сначала, а затем происходит активация каспазы-3.

Однако встречаются и ситуации, когда активация каспазы-3 предшествует активации РКСдельта и каспаза-3 является прямым активатором РКСдельта (Emoto et al, 1995; Ghayur et al, 1996). Каспаза-3 расщепляет РКСдельта, и образовавшийся короткий фрагмент этой киназы примерно шестикратно более активен, чем исходная полноразмерная киназа РКСдельта (Emoto et al, 1995; Ghayur et al, 1996). Образовавшаяся короткая форма этой киназы приобретает способность проникать в ядро, где и исполняет свои функции (DeVries et al, 2002). Более того, только с образованием короткой формы киназы РКСдельта связаны появляющиеся характерные черты апоптоза, такие как конденсация хроматина и фрагментация ядра (Emoto et al, 1995). Похожим образом каспаза-3 активирует ближайший структурный аналог РКСдельта, протеинкиназу РКСтета (Datta et al, 1997).

Таким образом, взаимодействие каспазы-3 и протеинкиназы РКСдельта в клетке включает положительную обратную связь. Каждый из этих ферментов исполняет свою часть апоптотической программы, каспаза в цитоплазме, киназа в ядре, и кроме того, два этих фермента усиливают активность друг друга. Видимо, такой механизм позволяет быстро и, что может быть еще более значимо, одновременно реализовывать разные аспекты апоптотической программы в клетке. Неодновременность апоптотических



событий грозит повлиять на соседние клетки, если, например, цитоплазма разрушена, а ядро осталось целым, то соседние клетки рискуют захватить потенциально опасный генетический материал. Или содержимое разрушенного ядра попадает в цитоплазму, что может привести к ингибированию программы апоптоза и дальнейшему развитию событий по некротическому сценарию. Одновременность исполнения апоптотической программы в разных компартментах клетки важна сама по себе, так как только одновременно «разобранный» в цитоплазме цитоскелет и «разобранное» ядро, уже не содержащее генетической информации, могут быть утилизированы соседними клетками. Именно поэтому взаимная регуляция различных апоптотических ферментов из разных субклеточных компартментов представляет собой важную часть апоптотической гибели клетки.

В некоторых ситуациях протеинкиназы могут подавлять активность каспаз (Alvarado-Kristensson et al, 2004). Киназа p38 MAPK может снижать активность и каспазы-3, и каспазы-8 примерно в два раза за счет фосфорилирования по консервативному остатку серина (Alvarado-Kristensson et al, 2004). Интересно, что дефосфорилирование этого остатка протеинфосфатазой 2A (PP2A) восстанавливает активность каспазы-3 и стимулирует апоптоз (Alvarado-Kristensson & Andersson, 2005). Более того, между каспазой и фосфатазой PP2A существует положительная обратная связь (Alvarado-Kristensson & Andersson, 2005), и ситуация похожа на описанную выше с участием каспазы-3 и РКСдельта.

Фосфорилирование является классической посттрансляционной модификацией, которая затрагивает практически все аспекты клеточной биологии. Но существуют и более редкие разновидности посттрансляционных модификаций, также затрагивающих каспазы. Одной из таких модификаций является S-нитрозилирование, такая модификация, при которой внутриклеточный оксид азота NO вступает в обратимую реакцию с цистеинами белков и образует нитрозоцистеин. В частности, мишенью NO

могут быть и остатки цистеина каспаз (Dimmeler et al, 1997; Kim et al, 1997; Mannick et al, 1999). S-Нитрозилирование снижает активность каспаз, предотвращая образование активной формы из проформы (Mannick et al, 1999), либо напрямую взаимодействуя с цистеином активированного фермента (Dimmeler et al, 1997; Kim et al, 1997). Кроме того, S-нитрозилирование может косвенно снижать активность каспаз, по всей видимости, посредством индукции внутриклеточных киназ (Kim et al, 1997). С помощью S-нитрозилирования клетка может сдерживать активность каспаз как в норме, так и после индукции апоптоза, причем снижение активности каспаз происходит довольно эффективно, в 2-3 раза (Dimmeler et al, 1997; Kim et al, 1997). Денитрозилирование с помощью тиол-восстанавливающих реагентов способно полностью или почти полностью восстанавливать активность каспаз (Kim et al, 1997). Например, при индукции апоптоза происходит денитрозилирование каспаз, что наряду с активацией зимогенов приводит к существенному увеличению каспазной протеолитической активности (Mannick et al, 1999). Такой механизм, в частности, реализуется и при активации каспазы-3 в головном мозге после ишемии/реперфузии (Sun et al, 2013) или при активации каспазы-3 в гиппокампе крыс после судорог, вызванных каиновой кислотой (Wei et al, 2012).

Одним из вариантов посттрансляционной модификации белков является S-глутатионилирование – обратимая реакция связывания остатка цистеина белка с самым распространенным тиолом клетки, трипептидом глутатионом (GSH). Эта модификация служит в клетке определенного рода сенсором на окислительно-восстановительный потенциал, так как стимулируется окислительным и нитрозативным стрессом, но, кроме того, происходит в клетке и в нестрессовых условиях. Оказывается, глутатион связывается с каспазой-3 и ингибирует ее активность (Huang et al, 2008). Связывание легко обратимо с помощью тиол-восстанавливающих агентов. Кроме того, глутатион способен предотвращать активацию каспаз (Huang et al, 2008).

Интересно, что глутатион связывается не только с цистеином активного сайта каспазы-3, но также и с цистеином малой каспазной субъединицы. Небольшой белок глутаредоксин является уникальным белком, способным регулировать глутатионилирование белков. Оказывается, он регулирует активацию каспазы-3 в клетке посредством глутатионилирования (Pan & Berk, 2007).

Оксид азота является довольно реактивным соединением, которое вступает в реакции с многими внутриклеточными белками. Эта молекула не является специфическим регулятором какого-то класса ферментов, а выступает неспецифическим регулятором для большой группы цистеин-содержащих белков. Вот и в случае с каспазами NO не только обратимо ингибирует активность этих ферментов, но так же и снижает активность их ингибиторов, например, XIAP (Nakamura et al, 2010). S-Нитрозилирование белка XIAP приводит к угнетению его убиквитин лигазной активности, что, в свою очередь, приводит к уменьшению деградации каспазы-3 протеасомой и увеличению активности каспазы-3 (Nakamura et al, 2010). В нейронах коры головного мозга XIAP существенно снижает гибель этих клеток после воздействия высоких концентраций NMDA, а нитрозилирование XIAP снижает выраженность этого эффекта (Nakamura et al, 2010). Более того, нитрозилированная форма каспазы-3 способна передавать свою NO группу на молекулу XIAP (в обратном направлении реакция не идет), тем самым повышая свою активность и снижая активность своего ингибитора (Nakamura et al, 2010).

К настоящему времени достоверно не установлены физиологические аллостерические модуляторы активности каспаз, но на возможность такого механизма регуляции этих ферментов указывают некоторые авторы (Pop & Salvesen, 2009). Так, известна цистеиновая протеаза, способная *in vivo* аллостерически активироваться низкомолекулярным соединением, инозитол гексафосфатом (Lupardus et al, 2008). Более того, активность каспаз-1, -3, -7 и -8 *in vitro* модулируется лигандами, связывающимися не в активном сайте

(Datta et al, 2008; Feldman et al, 2012; Scheer et al, 2006). Сайт аллостерического связывания на каспазах расположен в области контакта субъединиц фермента. Соединения, способные взаимодействовать с цистеиновым остатком в этой области, способны инактивировать каспазы, переводя молекулы ферментов в неактивное состояние, конформационно похожее на каталитически неактивную проформу (Hardy et al, 2004). Для каспазы-6 также найдены аллостерические модуляторы пептидной природы (Stanger et al, 2012), действующие по схожему принципу, но остается неизвестным, насколько такие механизмы регуляции работают *in vivo*.

Связываться и ингибировать активность каспазы-3 способны ионы цинка  $Zn^{2+}$  (Perry et al, 1997). Даже микромолярные концентрации иона цинка способны предотвращать расщепление каспазой-3 ПАРП в клеточной культуре при индукции апоптоза этопозидом (Perry et al, 1997). Ингибирование цинком каспазы-3 продемонстрировано и на чистом рекомбинантном ферменте. Концентрация полуингибирования составляет в этом случае 0.1 мкМ. Другие каспазы, в разной степени, также ингибируются цинком, так что некоторые авторы даже предполагают, что ингибирование каспаз цинком может быть одним из звеньев механизма регуляции каспазной активности при нейропластичности (Unsain & Barker, 2015).

### **Взаимодействие каспазы-3 с другими протеолитическими системами**

Каспаза-3 теоретически может расщепить или модифицировать огромное число клеточных белков – к настоящему времени секвенировано более 34 тысяч белков человека с аминокислотной последовательностью, потенциально расщепляемым каспазой-3 (Earnshaw et al, 1999). Тем не менее, это не означает, что все эти белки действительно являются субстратами каспазы-3. К настоящему времени экспериментально показано, что субстратами фермента являются порядка нескольких сотен белков. Наличие ряда чрезвычайно важных, с точки зрения функционирования нервных клеток,

субстратов, расщепляемых каспазами, позволяет предположить центральную роль этой группы ферментов в нормальной функции нейронов. Субстратами каспазы-3, наиболее активной эффекторной каспазы в мозге, являются белки цитоскелета, протеинкиназы и протеинфосфатазы, белки вовлеченные в трансдукцию сигнала, белки семейства Bcl-2, пресенилины и белок-предшественник амилоида, ферменты, модулирующие транскрипцию, репарацию и синтез ДНК, мембранные и стероидные рецепторы (Chan & Mattson, 1999; Fischer et al, 2003). Многие субстраты каспазы-3 локализованы в пре- и постсинаптических компартментах нейронов (Mattson & Duan, 1999; Shimohama et al, 2001b).

Протеолитические события, происходящие при апоптозе, являются объектом пристального изучения. С одной стороны, анализ этих событий позволяет сказать, разрушение каких белков принципиально важно для реализации апоптотической программы. С другой стороны, такой анализ позволяет выявить, какие протеазы принимают участие в реализации апоптоза. В любом случае, такой анализ применим и для неапоптотической роли каспазы-3, и также позволяет сказать, в какие еще процессы может быть вовлечена каспаза-3. Одной из первых работ в этом направлении была проведена на иммортализованных лимфоцитах человека при индукции в этих клетках Fas-зависимого апоптоза (Van Damme et al, 2005). Авторы с помощью изотопов кислорода помечали контрольные и апоптотические клетки, после чего использовали метод диагональной хроматографии объединенных фракций (COFRADIC) для того, чтобы разделить N-концевые пептиды, которые в случае контрольных и апоптотических клеток были помечены кислородом-16 или кислородом-18. Полученные фракции анализировали с помощью масс-спектрометрии и идентифицировали характерные для апоптоза сайты расщепления белков и белки, в которых эти сайты были обнаружены. Всего было выявлено 93 сайта расщепления белков при апоптозе в 76 белках, но только в 50 из них сайты расщепления были пост-аспаратными, вероятно

каспазными, а в остальных сайты расщепления не являлись каспазными (Van Damme et al, 2005). Интересным результатом работы было также и то, что одной из первых мишеней каспаз при апоптозе является сплайсосома, мультибелковый комплекс, отвечающий за сплайсинг мРНК. Всего было обнаружено 35 некаспазных сайтов расщепления при апоптозе, в основном, это сайты расщепления после остатка аргинина, всего 15 таких сайтов в 12 белках.

Постарганиновая протеазная активность является свойством многих протеаз, самой известной из которых является трипсин. Однако, не так просто предположить, что за внутриклеточная протеаза осуществляет расщепление по этому сайту при апоптозе. При апоптозе по такому сайту расщепляется, в частности, актин (Van Damme et al, 2005). Исходя из известной к настоящему времени субстратной специфичности протеаз, к конкретному апоптотическому сайту расщепления актина GRPR↓HQGV по информации базы данных MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>) могут быть специфичны матриксная металлопептидаза-2, трипсиноподобная пептидаза дыхательных путей, матриптаза-2 и -3, гепсин и тромбин. Выбор для данного конкретного сайта расщепления, действительно, не столь богат, и тем более удивительно, что все перечисленные протеазы являются либо секретлируемыми, либо экстраклеточными мембранносвязанными белками.

Аналогичная ситуация складывается с другим сайтом расщепления при апоптозе, PPR↓HLQL в гистоне H2A. Согласно базе данных MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>) по этому сайту могут проводить расщепление пептидаза DESC1, матриптаза-1 и -3, трипсиноподобная пептидаза дыхательных путей, гранзим А. И вновь это секретлируемые или мембранносвязанные экстраклеточные протеазы.

Похожий метод идентификации субстратов протеаз при клеточной гибели был использован на клетках карциномы человека (Impens et al, 2008). Гибель была индуцирована хорошо известным цитотоксическим агентом

таксолом (паклитакселом). Стоит отметить, что модель была подобрана очень удачно, так как живые клетки остаются прикреплены к субстрату, а клетки, в которых запущена программа гибели, быстро теряют адгезию и довольно просто могут быть собраны из культуральной среды. В работе было выявлено 27 сайтов расщепления протеазами, из них 16 постаспарататных, то есть каспазных, и 11 непостаспарататных (Impens et al, 2008). Среди непостаспарататных есть и постаргининовые, причем отвечающая за такой протеолиз протеаза так и не была выявлена.

Очень большая работа по выявлению сайтов расщепления протеазами была проведена на иммортализованных лимфоцитах человека при индукции апоптоза этопозидом (Mahrus et al, 2008). Для выявления таких сайтов был использован метод нерадиоактивного мечения N-концевых аминокислотных остатков, образовавшихся при расщеплении исходных полипептидов протеазами. Всего в работе было выявлено 733 специфичных для апоптоза сайта расщепления белков, и лишь 43 % из них являлись постаспарататными (каспазными) (Mahrus et al, 2008). В норме постаспарататных сайтов расщепления в белках всего лишь 3 % от общего числа сайтов расщепления (Mahrus et al, 2008), что подтверждает существенное увеличение доли именно каспазного протеолиза в общем протеолизе в клетке при запуске программы клеточной гибели. В этой работе также обнаружено большое число некаспазных протеолитических событий при запуске апоптоза, в том числе расщепление полипептидов после остатка аргинина.

Таким образом, согласно результатам нескольких групп исследователей (Impens et al, 2008; Mahrus et al, 2008; Van Damme et al, 2005), при индукции апоптоза происходит протеолитическое расщепление белков после остатка аргинина. Этот протеолиз опосредован секретлируемыми или мембранносвязанными протеазами, согласно базе данных MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>). Остается сделать вывод, что либо часть экстраклеточных протеаз каким-то образом возвращается в цитоплазму и

осуществляет протеолиз внутри клетки, либо какие-то внутриклеточные протеазы способны осуществлять протеолиз по постарганиновым сайтам при апоптозе. Последний вариант представляется достаточно вероятным, особенно если предположить, что такими протеазами являются катепсины, постарганиновая активность которых хорошо известна.

В пользу последнего предположения говорит и тот факт, что при индукции гибели в клетках происходит образование пор в мембране лизосом, как, например, это было обнаружено в одной из работ по выявлению сайтов расщепления протеаз при апоптозе (Impens et al, 2008). Через 48 часов после индукции гибели в клетках карциномы человека с помощью таксола образуется активная форма каспазы-3 и активируется калпаин, и в это же время значительная доля клеток, около 30 %, содержит лизосомы, в мембранах которых образовались поры. Эти события происходят только в умирающих клетках, потерявших адгезию к субстрату, в оставшихся прикрепленными клетках уровень каспазы-3, калпаина и образование пор в мембране лизосом не отличаются от контрольного (Impens et al, 2008). Авторы не исключают вовлечение катепсинов и калпаина в протеолиз при гибели клеток (Impens et al, 2008).

Согласно другим авторам, гибель клеток карциномы под действием таксола связана с выходом в цитоплазму из лизосом катепсина В (Broker et al, 2004). Более того, гибель клеток в этом случае можно предотвратить именно ингибиторами катепсина В, но не ингибиторами каспаз или калпаинов. Стоит отметить некоторое противоречие выводов в работах, касающихся роли различных протеаз в гибели лимфоцитов под действием таксола. Такая гибель может быть как практически полностью каспазо-зависимой (Impens et al, 2008), так и полностью катепсино-зависимой (Broker et al, 2004). Для объяснения указанного противоречия можно остановиться на двух обстоятельствах. Первое, ингибиторы протеаз не обладают абсолютной специфичностью, ингибирование каспаз с помощью синтетических



ингибиторов также приводит и к ингибированию других протеаз, и наоборот (Mihalik et al, 2004; Rozman-Pungercar et al, 2003; Schotte et al, 1999). И второе, можно с высокой долей уверенности предполагать, что протеазные системы в клетке взаимосвязаны, активация каспаз приводит к образованию пор в мембранах лизосом и выходу катепсинов в цитоплазму, которые, в свою очередь, могут активировать, прямо или косвенно, каспазы. Если принимать во внимание перечисленные обстоятельства, то обобщить картину протеолиза, происходящего в клетке после индукции апоптоза можно в следующих словах. При индукции клеточной гибели происходит быстрая активация каспаз и образование большого числа пептидов, соответствующих расщеплению белков каспазами (в большинстве случаев расщепление происходит по сайту DXXD↓X). Одновременно с этими событиями происходит активация не-каспазного протеолиза, происходящего по другим сайтам распознавания, в этом протеолизе принимают участие протеазы других семейств, и катепсины в том числе. Полная картина протеолиза при клеточной гибели складывается из активности многих протеолитических ферментов, и, хотя роль каспаз в этом протеолизе очень высока, только каспазами протеолиз при апоптозе не ограничивается.

Современные представления о вовлечении каспазы-3 в реализацию процессов нейрональной пластичности просуммированы в табл. 1. Каспаза-3 принимает участие в большом числе принципиальных для нейрона процессах, среди которых такие значимые, как долговременная потенция и долговременная депрессия. При этом каспаза-3, видимо, опосредует структурные перестройки нейронов, такие как расщепление белков цитоскелета и влияет на внутриклеточный сигналинг, регулируя активность внутриклеточных протеинкиназ.

Заметную роль играет каспаза-3 в процессах дифференцировки и пролиферации клеток разных типов, табл. 2. На первый взгляд, нельзя выделить какого-либо отличительного признака клеток, для дифференцировки

которых требуется активация каспазы-3. Для стволовых клеток, например, каспаза-3 определяет самое начало процесса дифференцировки, переход из пролиферирующего состояния в дифференцирующееся, расщепляя определенные транскрипционные факторы. В нейробластах и миобластах каспаза-3 регулирует активность некоторых протеинкиназ и принимает участие в запуске транскрипции. Для большой группы клеток участие каспазы-3 в дифференцировке сводится к быстрому устранению каких-то белков (такова дифференцировка кератиноцитов и клеток хрусталика). В целом можно сказать, что каспаза-3 регулирует дифференцировку и пролиферацию клеток большим числом различных способов.

Таким образом, активация каспазы-3 далеко не всегда приводит к гибели клеток. Однако, далеко не всегда понятно, каким образом регулируется собственно активность каспазы-3 в разных ситуациях. Варианты регуляции активности каспазы-3, как ее активации, так и ингибирования, представлены в табл. 3. Зачастую избыточная активация каспазы-3 и, как следствие, нежелательная гибель клеток, предотвращается протеасомальной системой. В некоторых других случаях регуляция активности каспазы-3 осуществляется с помощью фосфорилирования/дефосфорилирования.

Проводя анализ приведенных выше данных сложно прийти к заключению о существовании какого-то одного механизма, активирующего каспазу-3 в неапоптотических ситуациях. Скорее стоит сказать, что клетка использует все многообразие внутриклеточных инструментов, для того, чтобы регулировать активность каспазы-3 в норме и при патологии. Изучению новых ситуаций, в которых каспаза-3 играет неапоптотическую роль, а также поиску новых механизмов регуляции каспазной активности и переключения между разными субстратами и посвящена эта работа.

Таблица 1. Участие каспазы-3 в изменениях функциональных и структурных характеристик нервных клеток.

| <b>Долговременные изменения пластичности клеток нервной системы</b> |  |  |
|---|--|--|
| Поддержание выработанной долговременной потенциации                 | Под действием необратимого, проникающего в клетки, специфического ингибитора каспазы-3 происходит угасание выработанной долговременной потенциации | (Gulyaeva et al, 2003; Kudryashov et al, 2003)                             |
| Выработка долговременной сенситизации                               | Аналог каспазы-3 участвует в выработке особой формы синаптической пластичности у улитки  | (Bravarenko et al, 2006)   |
| Подавление выработки долговременной потенциации                     | Каспаза-3 расщепляет и инактивирует Akt, что приводит к активации GSK3 $\beta$ и подавлению выработки долговременной потенциации                   | (Jo et al, 2011)   |
| Долговременная депрессия  | Каспаза-3 необходима для интернализации AMPA рецепторов  | (Li et al, 2010b)  |
| Регуляция чувствительности клетки к глутамату                       | Каспаза-3 расщепляет субъединицу AMPA рецепторов   | (Chan et al, 1999; Glazner et al, 2000; Lu et al, 2002; Meyer et al, 2002) |
| Изменения нейронов в ответ на зрительную стимуляцию                 | Каспаза-3 расщепляет транскрипционный фактор MEF2 и запускает структурные изменения нейронов при зрительной стимуляции                             | (Chen et al, 2012)   |

|   |  |   |
|---|--|---|
| Перестройки отростков ганглионарных клеток сетчатки | Каспаза-3 активна только во вновь образованных отростках, но не в более старых устоявшихся отростках клеток и не в теле клеток | (Campbell & Okamoto, 2013)  |
| Пространственная память у животных                  | Введение ингибиторов каспазы-3 в гиппокамп блокирует долговременную пространственную память у крыс                             | (Dash et al, 2000)  |
| Способность животных к обучению                     | Каспаза-3 необходима для долговременной адаптации поведения животных   | (Lo et al, 2015)  |
| <b>Структурные изменения в клетках мозга</b>        |  |   |
| Дегенерация аксона                                  | Каспаза-3 необходима для селективной дегенерации аксонов сенсорных нейронов при депривации трофических факторов                | (Cusack et al, 2013; Nikolaev et al, 2009; Simon et al, 2012; Unsain et al, 2013) |
| Дегенерация дендритов                               | Каспаза-3 необходима для селективной деградации шипиков и сокращения длины дендрита после выработки долговременной депрессии   | (Ertuerk et al, 2014; Williams et al, 2006)                                       |
| Регенерация аксона                                  | Активность апоптотической протеазы CED-3 необходима для инициации процесса репарации аксона после повреждения                  | (Pinan-Lucarre et al, 2012)   |

|   |  |   |
|---|--|---|
| Опосредованный молекулами клеточной адгезии рост нейритов       | Каспаза-3 локально внутри конуса роста расщепляет структурный белок $\alpha$ II спектрин   | (Westphal et al, 2010)                  |
| Регуляция нервно-мышечного контакта                             | Каспаза-3 принимает участие в процессе устранения нефункциональных кластеров ацетилхолиновых рецепторов  | (Wang et al, 2014)                      |
| Регуляция роста отростков после экзайтотоксического воздействия | Каспаза-3 активируется в результате повреждающего воздействия в мозге, первыми эффектами ее активации являются структурные и функциональные изменения клеток | (Acarin et al, 2007; Tzeng et al, 2013) |

Таблица 2. Участие каспазы-3 в пролиферации и дифференцировке.

| <b>Пролиферация и выживание клеток</b>      |  |  |
|---|--|--|
| Активация процессов выживания               | Каспаза-3 расщепляет белок RasGAP, и образовавшийся фрагмент этого белка защищает клетку от гибели   | (Khalil et al, 2012; Yang et al, 2004; Yang & Widmann, 2001; 2002) |
| Прекодиционирование нейронов                | Ингибитор каспазы-3 блокирует вызванную кратковременной ишемией защиту от NMDA   | (McLaughlin et al, 2003)   |
| Снижение воспаления                         | Каспаза-3 расщепляет и инактивирует провоспалительный цитокин интерлейкина-33  | (Luethi et al, 2009)   |
| Предотвращение воспаления при гибели клетки | Каспаза-3 (как и каспаза-9) снижает секрецию интерферона $\beta$ из гибнущих клеток  | (White et al, 2014)  |
| Регуляция митоза                            | Введение в клетки ингибитора каспазы-3 вызывает задержку митоза  | (Kim et al, 2005)  |
| Пролиферация стволовых клеток               | Каспаза-3, также как и каспаза-7, способна выступать в роли ключевого регулятора регенерации ткани за счет стимулирования пролиферации окружающих стволовых клеток | (Li et al, 2010a)  |

|  |  |  |
|--|--|--|
| Пролиферация клеток разных типов                     | Активация каспазы-3 в умирающих клетках необходима для стимуляции выживания окружающих клеток                                  | (Cheng et al, 2015; Donato et al, 2014; Huang et al, 2011; Mao et al, 2013)                        |
| Стимуляция ангиогенеза                               | Каспаза-3 запускает рост сосудов в месте гибели клеток   | (Feng et al, 2015)   |
| Поддержание способности к миграции клеток            | Каспаза-3 расщепляет структурный белок гельзолин и определяет способность к миграции у некоторых клеток                        | (Gdynia et al, 2007)   |
| Жизнедеятельность стволовых клеток эритроидной линии | Каспаза-3 необходима для дифференцировки, регуляции клеточного цикла, пролиферации и выживаемости эритроидных предшественников | (Boehm et al, 2013)  |
| <b>Дифференцировка клеток</b>                        |  |  |
| Дифференцировка эритроидных клеток                   | Активация каспазы-3 сопровождает энуклеацию в эритроидных клетках  | (Zermati et al, 2001)<br>(De Maria et al, 1999)<br>(Ribeil et al, 2007)                            |
| Дифференцировка кератиноцитов                        | Каспаза-3 является основным эффектором, опосредующим энуклеацию в дифференцировке кератиноцитов                                | (Allombert-Blaise et al, 2003; Okuyama et al, 2004; Weil et al, 1999; Yamamoto-Tanaka et al, 2014) |

|                                   |   |  |
|-----------------------------------|---|--|
| Дифференцировка клеток хрусталика | Каспаза-3 расщепляет структурные белки клетки, что приводит к образованию зрелого хрусталика                  | (Bassnett & Mataic, 1997; Basu et al, 2012; Lee et al, 2001; Weil et al, 1999)   |
| Образование тромбоцитов           | Каспаза-3 демонстрирует уникальный паттерн активации в мегакариоците при образовании тромбоцитов              | (de Botton et al, 2002)  |
| Дифференцировка моноцитов         | Каспаза-3 принимает участие дифференцировке моноцитов в макрофаги, но не в дендритные клетки                  | (Cathelin et al, 2006; Netea et al, 2008; Sordet et al, 2002)  |
| Дифференцировка миобластов        | Дифференцировка мышечных клеток происходит с участием каспазы-3   | (Bloemberg & Quadrilatero, 2014; de la Vega et al, 2013; Fernando et al, 2002; Larsen et al, 2010; Murray et al, 2008) |
| Дифференцировка остеобластов      | Каспаза-3 отвечает за минерализацию костей за счет дифференцировки стромальных стволовых клеток в остеобласты | (Miura et al, 2004; Mogi & Togari, 2003)   |



|   |  |  |
|---|--|--|
| Дифференцировка<br>нейрональных стволовых<br>клеток     | Каспаза-3 активирует протеинкиназы, необходимые для<br>дифференцировки нейрональных стволовых клеток   | (Fernando et al, 2005)   |
| Дифференцировка<br>эмбриональных стволовых<br>клеток    | Каспаза-3 расщепляет транскрипционный фактор Nanog<br>после индукции дифференцировки, не позволяя клетке<br>оставаться в стволовом состоянии | (Fujita et al, 2008)   |
| Дифференцировка<br>предшественников глиальных<br>клеток | Каспаза-3 в раннем постнатальном онтогенезе<br>необходима для образования глиальных клеток из<br>предшественников                            | (Finckbone et al, 2009;<br>Oomman et al, 2004;<br>Oomman et al, 2006;<br>Oomman et al, 2005) |

Таблица 3. Посттрансляционные модификации и процессы, изменяющие активность каспазы-3.

| <b>Фосфорилирование</b>            |  |   |
|------------------------------------|--|---|
| Фосфорилирование киназой РКСдельта | Активация каспазы-3  | (Voss et al, 2005)                                      |
| Фосфорилирование киназой р38 MAPK  | Ингибирование каспазы-3  | (Alvarado-Kristensson et al, 2004)                      |
| Дефосфорилирование фосфатазой PP2A | Активация каспазы-3  | (Alvarado-Kristensson & Andersson, 2005)                |
| <b>Деградация</b>                  |  |   |
| Деградация в протеасоме            | Уменьшение количества активной формы и проформы каспазы-3      | (Huang et al, 2000; Tawa et al, 2004; Yang et al, 2000) |
| Деградация в протеасоме            | Ограничение активности каспазы-3 в соме клетки, но в отростках | (Cusack et al, 2013)                                    |
| Деградация в лизосоме              | Уменьшение количества активной формы и проформы каспазы-3      | (Mnich et al, 2014)                                     |

| <b>Другие посттрансляционные изменения</b> |   |  |
|--|---|--|
| S-нитрозилирование                         | Ингибирование каспазы-3   | (Dimmeler et al, 1997;<br>Kim et al, 1997;<br>Mannick et al, 1999) |
| Глутатионилирование                        | Ингибирование активности и активации каспазы-3  | (Huang et al, 2008;<br>Pan & Berk, 2007)                           |
| <b>Прямое ингибирование</b>                |   |  |
| Белок XIAP                                 | Основной сдерживающий фактор при активации каспаз в процессе аксональной дегенерации в результате депривации трофических факторов | (Unsain et al, 2013)   |
| Связывание с ионом Zn <sup>2+</sup>        | Связываться и ингибировать активность каспазы-3 способны ионы цинка   | (Perry et al, 1997)  |

## ЧАСТЬ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Материалы

В работе были использованы кросс-линкеры EDC, DSP, EGS, DMP производства Pierce (США), MES, ЭДТА, HEPES, дитиотреитол, стауроспорин, форсколин, Suc-LY-AMC, Suc-LLVY-AMC, ингибитор катепсина В CA074, апротинин, окисленный глутатион, PMSF производства Sigma-Aldrich (США), Ac-DEVD-AMC, Ac-DEVD-CHO, антитела к субъединице протеасомы альфа5 PA1-1962 производства Pierce (США), антитела к катепсину В FL-339 производства Santa-Cruz (США), антитела к каспазе-3 RB1197 производства NeoMarkers (США), субстраты протеаз Ac-IETD-AMC, Ac-LEHD-AMC, Z-FR-AMC, Z-RR-AMC производства Biovision (США). Фильтры Amicon Ultracell 3 kDa производства Millipore (США), краситель Coomassie G-250 производства Serva (Германия).

### Культивирование нейробластомы

Для культивирования клеточной линии крысиной нейробластомы B103 использовали среду DMEM (с 4 mM глутамина и 4,5 мг/мл глюкозы без HEPES) с добавлением 50 ЕД/мл пенициллина и 50 ЕД/мл стрептомицина. Для культивирования клеточных линий использовали 10%-ный раствор фетальной бычьей сыворотки в культуральной среде. Клетки выращивали на чашках диаметром 10 см. Клеточные культуры инкубировали в термостатируемом CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C и концентрации CO<sub>2</sub> 5%. Форсколин хранили в виде спиртового раствора концентрации 10 мг/мл, конечная концентрация в культуральной среде составляла 2 мкг/мл. РМА хранили в виде спиртового раствора с концентрацией 1.25 мг/мл, конечная концентрация 10 нг/мл. С чашек клетки снимали раствором, содержащим 0.25% трипсин и 0.02% ЭДТА. Клетки собирали (ц/ф 400 g), промывали дважды PBS и замораживали в жидком азоте.

### **Выделение катепсина**

Выделение катепсинов из мозга крысы проводили как описано ранее (Porovic et al, 1996) с небольшими модификациями. Супернатант мозга крысы подкисляли до pH 4.0 и доводили концентрацию сульфата аммония до 20 % насыщения. Через 1 ч осадок удаляли центрифугированием при 12 000 g в течение 20 мин. Супернатант обессоливали на Sephadex G-25 и наносили на S-Sepharose Fast Flow. Все фракции обессоливали методом центрифужной гель-фильтрации (spin desalting) на колонках Bio-Spin 6 (Biorad, США). Во фракциях определяли DEVDазную активность при pH 4,0, и фракцию, содержащую активность, разделяли методом SDS-ПААГ-электрофореза. Полоски полипептидов вырезали из геля, подвергали трипсинолизу и определяли массы полученных пептидов методом MALDI-TOF MS. Анализ результатов проводили с помощью программы Mascot (<http://www.matrixscience.com>).

### **Ионообменная хроматография**

Ионообменную хроматографию проводили на колонне Waters Protein-Pak DEAE5PW 0.75x7.5 см. Колонку уравнивали в 20 mM HEPES pH 7.5 (буфер А). Наносили 1 мл экстракта мозга и элюировали со скоростью 1 мл/мин градиентом 0-0.5 M NaCl в буфере А в 40 фракциях по 1 мл каждая.

### **Гель-фильтрация**

Гель-фильтрацию проводили на колонне Sepharose 6B 1.6x75 см. Наносили 0.5 мл экстракта мозга и элюировали буфером А со скоростью 0.5 мл/мин. Собирали фракции по 7 мл, всего 25 фракций.

### **Денатурирующий электрофорез (SDS-ПААГ-электрофорез)**

Образцы кипятили 5 мин в буфере 50 mM Tris pH 6.8, 2 % SDS, 100 mM DTT, 5 % глицерин, 0.005 % бромфеноловый синий. После охлаждения до комнатной температуры пробы центрифугировали и наносили на полиакриламидный гель, содержание акриламида 15 %, содержание бис-акриламида 2.7 % от общего количества акриламида. После электрофореза

содержимое геля электрофоретически переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Эффективность переноса проверяли, окрашивая мембрану обратимым белковым красителем Ponceau S. Блокировку сайтов неспецифического связывания проводили 2 % молоком в течение 1 часа, затем окрашивали антителами к каспазе-3 или к субъединице протеасомы альфа5 в разведении 1:1000 (обычное время инкубации 16 часов), затем в течение часа инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Регистрировали хемилюминесценцию с помощью рентгеновской пленки. Проявленные рентгеновские пленки фотографировали.

### **Определение активности каспазы-3**

Для биохимических исследований животных декапитировали и выделяли головной мозг без ствола и мозжечка. Мозг замораживали в жидком азоте. Ткань гомогенизировали в среде выделения (10 мМ HEPES, pH 7.5, 10 мМ KCl, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреитол, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид, 0.5 мМ ЭДТА (все реактивы – Sigma, США) в гомогенизаторе Potter S (тефлон-стекло; Braun, ФРГ) со скоростью 1500 об/мин. Гомогенаты центрифуговали при 14 000 g в течение 30 мин при 4°C, и супернатанты использовали для оценки активности каспазы-3. Все процедуры проводили на льду. Активность каспазы-3 определяли флуориметрическим методом, описанным ранее (Яковлев и соавт., 2001). Супернатант инкубировали 60 мин при 37°C в 0.1 М буфере MES-NaOH с заданным значением pH, содержащем 10 мМ дитиотреитол, 1 мМ ЭДТА и 100 мкМ субстрат Ac-DEVD-AMC (Biomol, США). Флуоресценцию регистрировали на планшетном флуориметре Wallac (Perkin Elmer, США) при длинах волн возбуждения и эмиссии 380 нм и 440 нм соответственно. В качестве флуоресцентного стандарта использовали 7-амино-4-метилкумарин (Sigma, США). Определение активности каспазы-8 и каспазы-9 проводили аналогично с использованием специфических субстратов Ac-IETD-AMC и

Ac-LEHD-AMC, соответственно. Определение активности катепсина В проводили аналогично, за исключением того, что использовали субстрат Z-RR-AMC. Активность калпаина определяли флуориметрическим методом, описанным в работе. Активность протеасомы определяли по активности ее химотрипсинового сайта (Яковлев с соавт., 2012). Определение активности ЛДГ в солевом растворе или лизатах клеток осуществляли флуориметрическим методом, основанным на регистрации скорости накопления NAD<sup>+</sup> в реакции восстановления пирувата. Концентрацию белка в пробах определяли по связыванию с Кумасси G-250 (Bradford, 1976).

### **Определение концентрации белка**

Общую концентрацию белка в пробах измеряли по связыванию с Кумасси G-250 (Bradford, 1976). Образцы разводили так, чтобы концентрация белка составляла 0.01-0.1 мг/мл. В лунку 96-луночного планшета вносили 100 мкл пробы и 150 мкл реактива (0.017 % Кумасси G-250, 17 % фосфорной кислоты, 18 % этанола). Пробы инкубировали при комнатной температуре 20 мин и считывали поглощение при 595 нм. Калибровочную прямую строили по известным концентрациям БСА.

### **Внутриклеточная локализация**

Выделение внутриклеточных фракций проводили как описано ранее (Nyman & Whittaker, 1963). Животных декапитировали и быстро выделяли головной мозг. На льду выделяли отделы мозга. Ткань мозга гомогенизировали в непритертом гомогенизаторе типа Potter S (тефлон-стекло) в течение 1 мин при малых оборотах в 2 объемах 0.32 М сахарозы с добавлением ингибиторов протеаз. Такая обработка приводит к образованию замкнутых везикул, содержащих внутриклеточные фракции в их нативном состоянии. Гомогенаты инкубировали с кросс-линкерами (2-5 мМ) в течение 60 мин при 4°C при помешивании. Такая обработка приводит к образованию ковалентных связей между исследуемыми молекулами. Для удаления непрореагировавшего кросс-линкера гомогенаты инкубировали 30 мин при

4°C в 50 мМ Tris pH 7.5. Затем пробы гомогенизировали в 5 объемах 20 мМ HEPES pH 7.5, 0.5 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол с добавлением ингибиторов протеаз. Гомогенаты центрифугировали 30 мин при 14 000 g при 4°C и полученный супернатант использовали для определения биохимических показателей.

### **Работа с кросс-линкерами во внутриклеточных фракциях**

Работу проводили на крысах Wistar обоего пола (получены из питомника РАМН «Столбовая»), группу молодых крыс составляли животные в возрасте 3-х недель, взрослые крысы были в возрасте 2-х месяцев. Животных содержали в виварии при свободном доступе к воде и пище в режиме 12-часового цикла день-ночь (день 8.00-20.00). Животных декапитировали и на льду выделяли отделы мозга. Кусочки ткани мозга (вес 20-50 мг) гомогенизировали в 500 мкл 0.32 М сахарозы, 2 мМ HEPES pH 7.4 в эппендорфе с помощью маленького пестика при 1 500 об/мин 20 ударов. Центрифугировали 10 мин при 4°C при 1 500 g. Собирали супернатант, а осадок ресуспендировали в 500 мкл 0.32 М сахарозы, 2 мМ HEPES pH 7.4 и центрифугировали тем же образом. Супернатанты объединяли и центрифугировали 9 000 g 20 мин при 4°C. Осадок, содержащий синапсомы, митохондрии и миелин, ресуспендировали в 50 мкл 0.32 М сахарозы, 2 мМ HEPES pH 7.4 и каждые 100 мкл суспензии аккуратно насливали на 0.5 мл 0.8 М сахарозы, 2 мМ HEPES pH 7.4. Центрифугировали 9 000 g 25 мин при 4°C. Появлялись три фракции, миелин на границе 0.32-0.8 М сахарозы, синапсомы в 0.8 М сахарозе и митохондрии в осадке. Синапсомы в 0.8 М сахарозе, 2 мМ HEPES pH 7.4 разводили 2 мМ HEPES pH 7.4 до 0.32 М сахарозы и центрифугировали 9 000 g 25 мин при 4°C. Осадки синапсом и митохондрий, а также ядерную фракцию и миелин, ресуспендировали в сахарозе соответствующей концентрации, и часть инкубировали в присутствии 5 мМ кросс-линкера EGS (этилен гликоль бис-(сукцинимидил-сукцинат)) в течение 30 мин при комнатной температуре.



Цитоплазму также подвергали обработке кросс-линкером, но без предварительного разведения. Далее фракции, содержащие замкнутые компартменты (синапсосомы, митохондрии и лизосомы, а также ядра) лизировали в 400 мкл 20 мМ HEPES pH 7.4, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ DTT при 4°C при помешивании в течение 15 мин. Суспензию центрифугировали 5 000 g 30 мин при 4°C. Полученный осадок, содержащий мембраны соответствующих клеточных органелл, ресуспендировали в 200 мкл 20 мМ HEPES pH 7.4, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ DTT.

### **Первичная культура нейронов мозжечка**

Диссоциированные клетки-зерна мозжечка семидневных крысят линии Wistar культивировали по описанной ранее методике (Andreeva et al, 1991) в CO<sub>2</sub> инкубаторе (95% воздуха, 5% CO<sub>2</sub>, 35.5°C) в течение 6-8 дней. Клеточную суспензию раскапывали по 150 мкл на лунку в 24-луночные планшеты, предварительно покрытые полиэтиленэмином (0.5 мг/мл), в дальнейшем объединяя по 3 лунки на одну экспериментальную пробу. В каждом эксперименте анализировали не менее 3 параллельных образцов сестринских культур. К 6-8 дневным клеткам добавляли сначала стауроспорин на 5 часов, промывали, а затем добавляли кросс-линкер. Кросс-линкеры, использованные в работе, обладают гидрофобными свойствами и, поэтому, проникают внутрь клетки. Через час лунки тщательно промывали и собирали клетки в PBS. Лизировали клетки в 20 мМ HEPES pH 7.5, 0.5 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитоле, затем центрифугировали 30 мин при 14 000 g при 4°C.

### **Прекондиционирование клеток к неблагоприятным условиям**

Культуры помещали в солевой буферный раствор (BSS), содержащий глюкозу 10 мМ, NaCl 143.4 мМ, KCl 25 мМ, CaCl<sub>2</sub> 2 мМ, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 мМ, HEPES 5 мМ, pH 7.4 на 7-й день культивирования, и выдерживали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение часа при 35.5°C. На этот период времени клетки оказывались в неблагоприятных условиях недостатка трофических факторов

и некоторого снижения рН, но гибели клеток за этот период обнаружено не было (окрашивание пропидиум иодидом и активность лактатдегидрогеназы в культуральной среде, данные не представлены). После прекондиционирования культуры возвращали в питательную среду.

### **Обработка клеток глутаматом**

В модели острой эксайтотоксичности клетки помещали в BSS (глюкоза 10 мМ, 143.4 мМ, 25 КСl мМ, СаСl<sub>2</sub> 2 мМ, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 мМ, HEPES 5 мМ, рН 7.4), содержащий глутамат в концентрации 100 или 200 мкМ на 15 или 30 минут через сутки после прекондиционирования. Далее, клетки помещали в BSS на 5 часов в СО<sub>2</sub>-инкубатор и затем отбирали пробы.

### **Лизирование клеток**

После отбора проб культуральной жидкости, клетки лизировали в буфере, содержащем 20 мМ HEPES рН 7.5, 0.5 мМ EDTA, 10 мМ КСl, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.01% NP-40. Добавляли 300 мкл буфера в пробирку с клетками, интенсивно перемешивали, после чего охлаждали на льду 15 минут. Затем пробы центрифугировали 30 минут при температуре 4°C со скоростью 13000 об/мин и отбирали супернатант.

### **Определение активности лактатдегидрогеназы**

Активность лактатдегидрогеназы измеряли в культуральной жидкости. К 15 мкл пробы добавляли 15 мкл буфера, содержащего 30 мМ Tris/HCl рН 7,4, 1 мМ пирувата и 0,02 мМ NADH. Пробы инкубировали 15 мин при 37°C, после чего реакцию останавливали добавлением 20 мкл 1М HCl. Далее, пробы инкубировали 20 минут при комнатной температуре и добавляли 200 мкл 6М NaOH, после чего 10 минут инкубировали при 60°C. Флуоресценцию образовавшегося в результате реакции NAD<sup>+</sup> регистрировали на планшетном флуориметре Wallac (Perkin Elmer, США) при длинах волн возбуждения и эмиссии 370 нм и 430 нм. Концентрацию образованного в результате реакции NAD<sup>+</sup> определяли по калибровочному графику. Активность выражали в нмоль NADH/мин/мл среды.

### **Статистическая обработка**

Статистическую обработку и анализ результатов проводили с использованием критерия Манна-Уитни, непараметрического критерия Вилкоксона для зависимых величин, непараметрического дисперсионного анализа ANOVA. Данные представлены в виде  $M \pm SD$ .

### ЧАСТЬ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

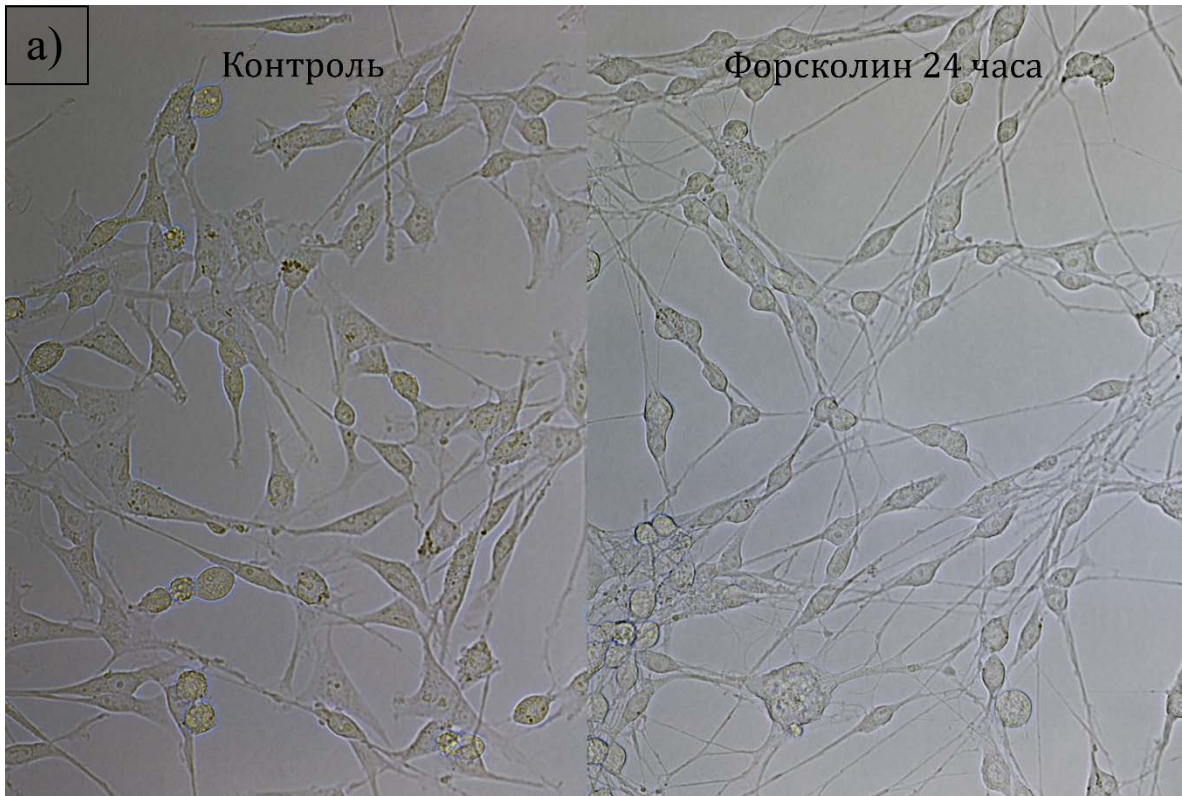
#### 1. ИССЛЕДОВАНИЕ НЕАПОПТОТИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ КАСПАЗЫ-3, СВЯЗАННЫХ С РЕАЛИЗАЦИЕЙ ФЕНОМЕНОВ ПЛАСТИЧНОСТИ

За последнее время накопились данные о новых, ранее не исследованных, функциях каспаз и каспазы-3, в частности. Участие каспаз идентифицировано в некоторых специфических процессах, не связанных с клеточной гибелью. Мы провели серию экспериментов, результаты которых свидетельствуют о необычайно широком спектре неапоптотических функций каспазы-3 и ее роли в дифференцировке.

##### **Роль каспазы-3 в дифференцировке клеток нейробластомы**

Работа по изучению роли каспазы-3 в дифференцировке нейробластомы была проведена совместно с лабораторией клеточной инженерии ИТЭБ РАН (зав. лаб. д.б.н. И. П. Белецкий). Основной чертой дифференцировки является образование отростков клетки. Фотографии клеток до и после форсколиновой дифференцировки представлены на рис. 8а. Форсколин вызывает характерные для дифференцировки морфологические изменения, а именно увеличение числа и длины отростков (рис. 8а). После 48 ч после индукции дифференцировки форсколином клетки В103 демонстрируют достоверно большее число достоверно более длинных отростков, чем контрольные В103 (рис. 8б).

Активность каспазы-3 после индукции дифференцировки клеток крысиной нейробластомы В103 форсколином и РМА представлена на рис. 9а. Активность фермента после индукции дифференцировки форсколином через 24 ч составила  $187 \pm 118\%$  от контроля, а через 48 ч  $283 \pm 113\%$  от контроля.



■ Клетки В103  
□ Клетки В103 через 48 ч после  
индукции дифференцировки форсколином

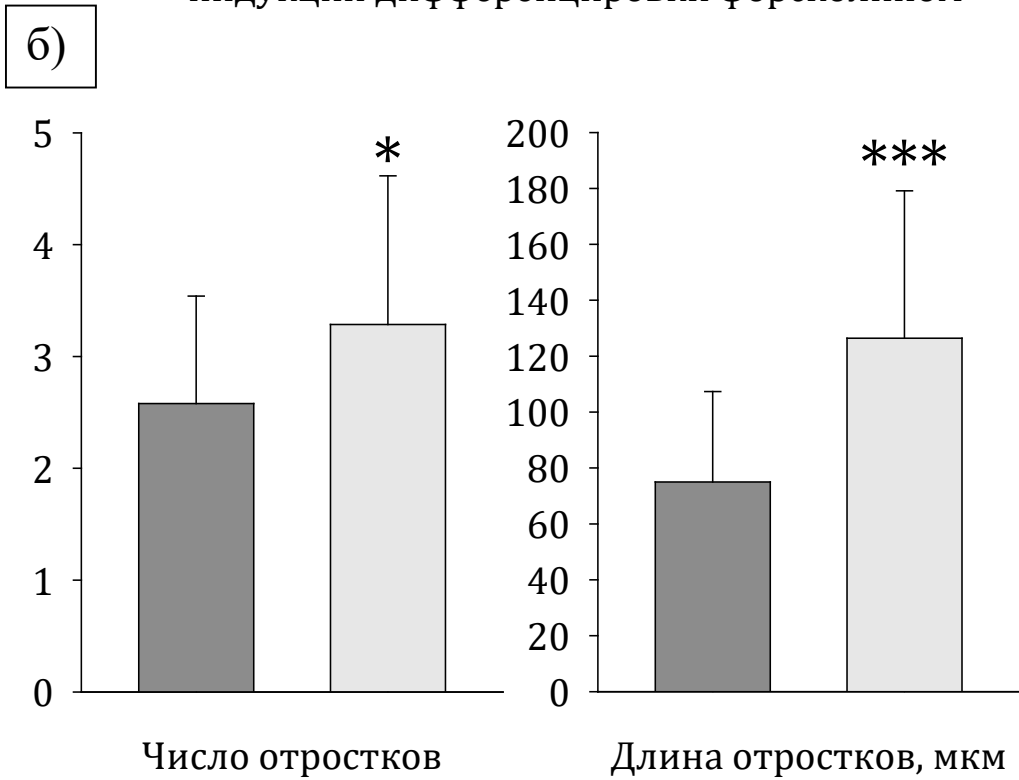


Рис. 8. (На предыдущей странице) Изменение характерных признаков нейробластомы В103 до и после индукции дифференцировки форсколином, а) фотографии клеток в контроле и после индукции дифференцировки форсколином, увеличение  $\times 200$ , б) число и длина отростков на клетку до и после дифференцировки клеток с помощью форсколина. \* -  $p < 0.05$ , \*\*\* -  $p < 0.0005$  по сравнению с недифференцированными клетками.

При этом статистически выявлена зависимость активности каспазы-3 от времени после индукции дифференцировки,  $p < 0.05$  (непараметрический вариант анализа ANOVA). Оказалось, что значение активности фермента через 24 ч после индукции дифференцировки форсколином, также как и активность фермента через 48 ч после добавления форсколина достоверно превосходит контрольный уровень,  $p < 0.05$ .

Другой индуктор дифференцировки, РМА, на всех исследованных временных сроках не приводил к изменению активности каспазы-3, при этом значения активности фермента составили  $110 \pm 13\%$  и  $99 \pm 12\%$  от контроля через 24 ч и 48 ч, соответственно. В дополнительной серии экспериментов мы определяли активность каспазы-3 в трансфектантах клеток нейробластомы В103 геном каспазы-3, результаты представлены на рис. 9б. Активность каспазы-3 в этих клетках через 24 ч после индукции дифференцировки составила  $161 \pm 3\%$  от контроля, а через 48 ч  $415 \pm 1\%$  от контроля. Сравнивая эти данные с результатами экспериментов на нетрансфицированных клетках (рис. 9а), можно предположить, что вклад трансфекции в активность каспазы-3 начинает проявляться через 48 ч.

Нами была проведена дополнительная серия экспериментов по ингибированию каспазы-3 после индукции дифференцировки форсколином, результаты представлены на рис. 10б. На всех исследованных временных сроках введение в культуру клеток ингибитора каспазы-3 приводило к существенному ингибированию активности этого фермента. Более того,

введение ингибитора в культуру клеток предотвращало появление характерных черт дифференцированной клетки: образование отростков (данные не представлены).

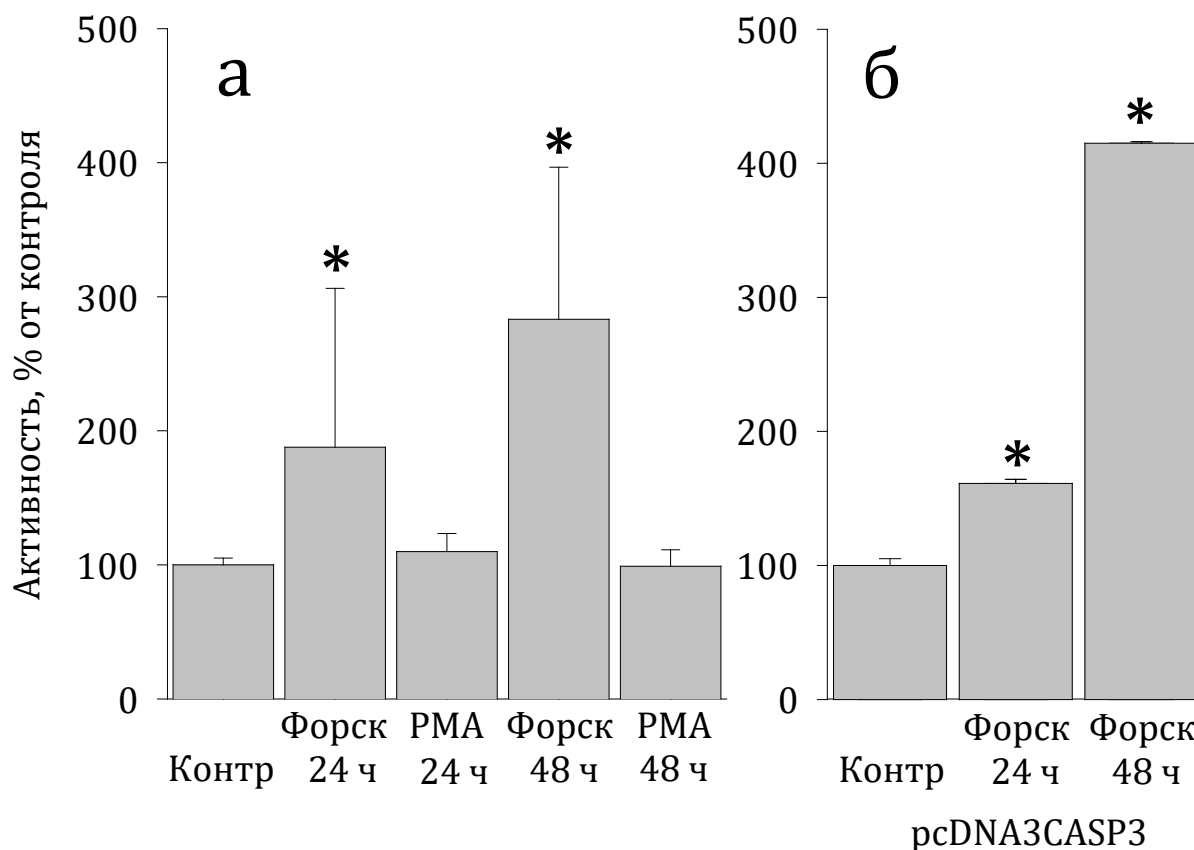


Рис. 9. Активность каспазы-3 в культуре клеток крысиной нейробластомы В103 после индукции дифференцировки, а) через 24 ч и 48 ч после индукции дифференцировки форсколином либо форболовым эфиром PMA, б) через 24 ч и 48 ч после индукции дифференцировки форсколином на фоне внутриклеточной экспрессии экзогенной каспазы-3 после трансфекции клеток плазмидой pcDNA3, содержащей ген каспазы-3. \*-  $p < 0.05$ . Контр – контроль, Форск – форсколин, PMA – форболовый эфир.

В этой модели мы также определяли активность ферментов, важных для реализации процесса апоптоза. Исследованные нами активности каспазы-8, каспазы-9 и калпаина не увеличиваются так, как активность

каспазы-3 (рис. 9), а, скорее, уменьшаются после индукции дифференцировки форсколином (данные не представлены).

На рис. 10а представлена зависимость активности каспазы-3 от времени после индукции клеточной гибели. В качестве индуктора апоптоза использовали стауроспорин. Интересно, что к 24 часам после индукции клеточной смерти активность каспазы-3 превосходит контрольную величину примерно в два раза. Сходная величина активности каспазы-3 обнаружена и на 24 ч после индукции дифференцировки клеток форсколином (рис. 9а).

Вовлечение каспазы-3 в дифференцировку клеток В103 было продемонстрировано с помощью еще одного подхода. Были синтезированы малые интерферирующие РНК к каспазе-3, так что после их трансфекции в клетки активность каспазы-3 снижалась. Снижение в силу специфики данного метода происходило не сразу, но длилось довольно долго. Активность каспазы-3 в обычных клетках и клетках после трансфекции миРНК к каспазе-3 после индукции дифференцировки форсколином и гибели стауроспорином представлена на рис. 11. Через 48 ч после индукции дифференцировки форсколином активность каспазы-3 в трансфецированных клетках оказалась практически на уровне контроля, тогда как в обычных клетках происходит более чем двукратное увеличение активности каспазы-3. активация каспазы-3 под действием стауроспорина также практически полностью подавлена миРНК каспазы-3.

Известно, что цАМФ-зависимый механизм является одним из важнейших сигнальных путей, опосредующих дифференцировку в клетках нейробластомы. Активатор аденилатциклазы эукариотов форсколин открыт более 30 лет назад (Seamon et al, 1981). Показано, что форсколин вызывает увеличение внутриклеточного уровня цАМФ в клетках нейробластомы и индуцирует дифференцировку в этих клетках (Bergsbaken et al, 1993). Использование форсколина как индуктора дифференцировки и агента, повышающего внутриклеточный уровень цАМФ, позволяет выявить



внутриклеточные механизмы, опосредующие цАМФ-зависимые процессы в клетке.

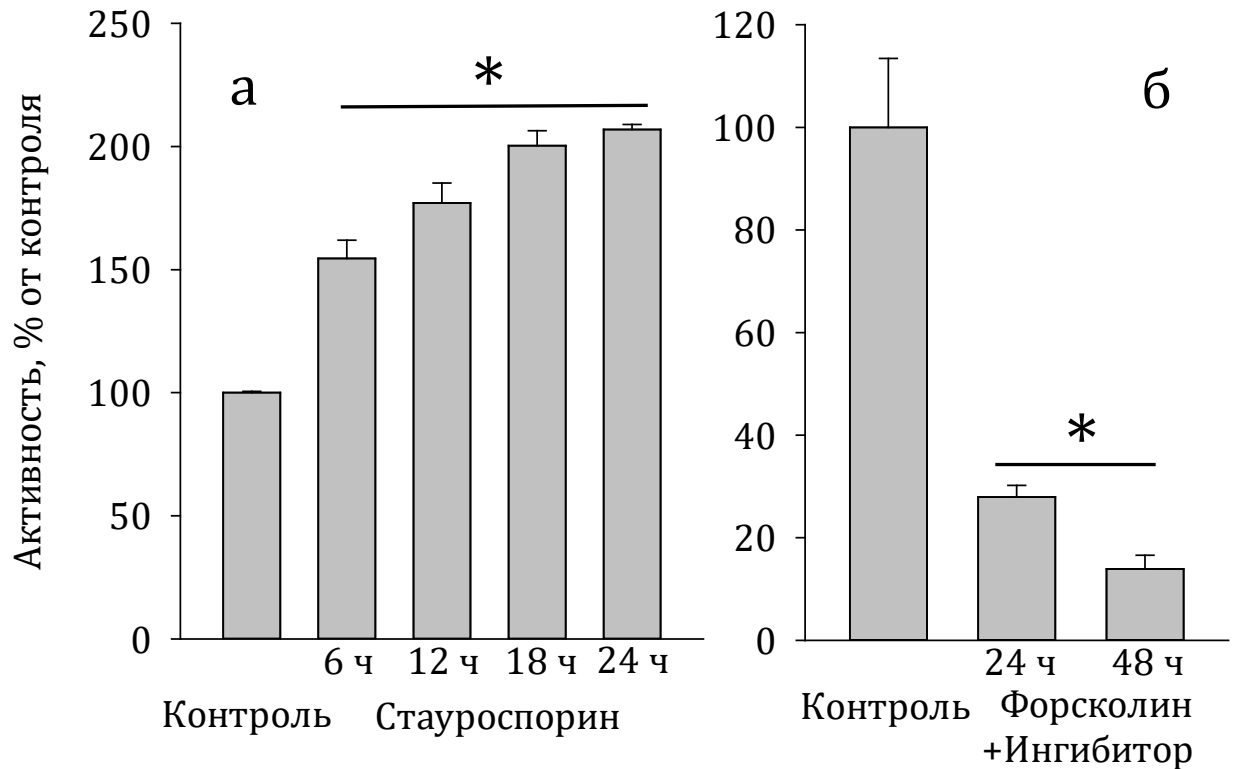


Рис. 10. Активность каспазы-3 в культуре клеток крысиной нейробластомы В103, а) после индукции клеточной гибели стауроспорином, б) через 24 ч и 48 ч после индукции дифференцировки форсколином на фоне ингибитора каспазы-3 Ас-DEVD-СНО. \* -  $p < 0.05$  от контроля.

Внутриклеточный уровень цАМФ в клетках регулируется посредством ряда внутриклеточных и внеклеточных сигналов. Примерами внешних сигналов, изменяющих внутриклеточный уровень цАМФ, являются некоторые простагландины (Choi et al, 2001; Kim et al, 1996; Prasad et al, 1998), ряд нейромедиаторов (McDonald et al, 1994; Vortherms & Watts, 2004), факторы роста и гормоны (Spada, 1998). Циклический АМФ регулирует активность серин/треониновой протеинкиназы А (ПКА) (Tasken & Aandahl,

2004), которая фосфорилирует различные белки, изменяя тем самым их функции. В настоящее время точно установлен факт регуляции цАМФ функций транскрипционного фактора CREB (цАМФ-чувствительный элемент связывающий белок) (Gonzalez & Montminy, 1989; Montminy et al, 1986), и преобладает точка зрения, что это основной путь регуляции посредством цАМФ транскрипции генома (Gonzalez & Montminy, 1989; Kandel, 2001).

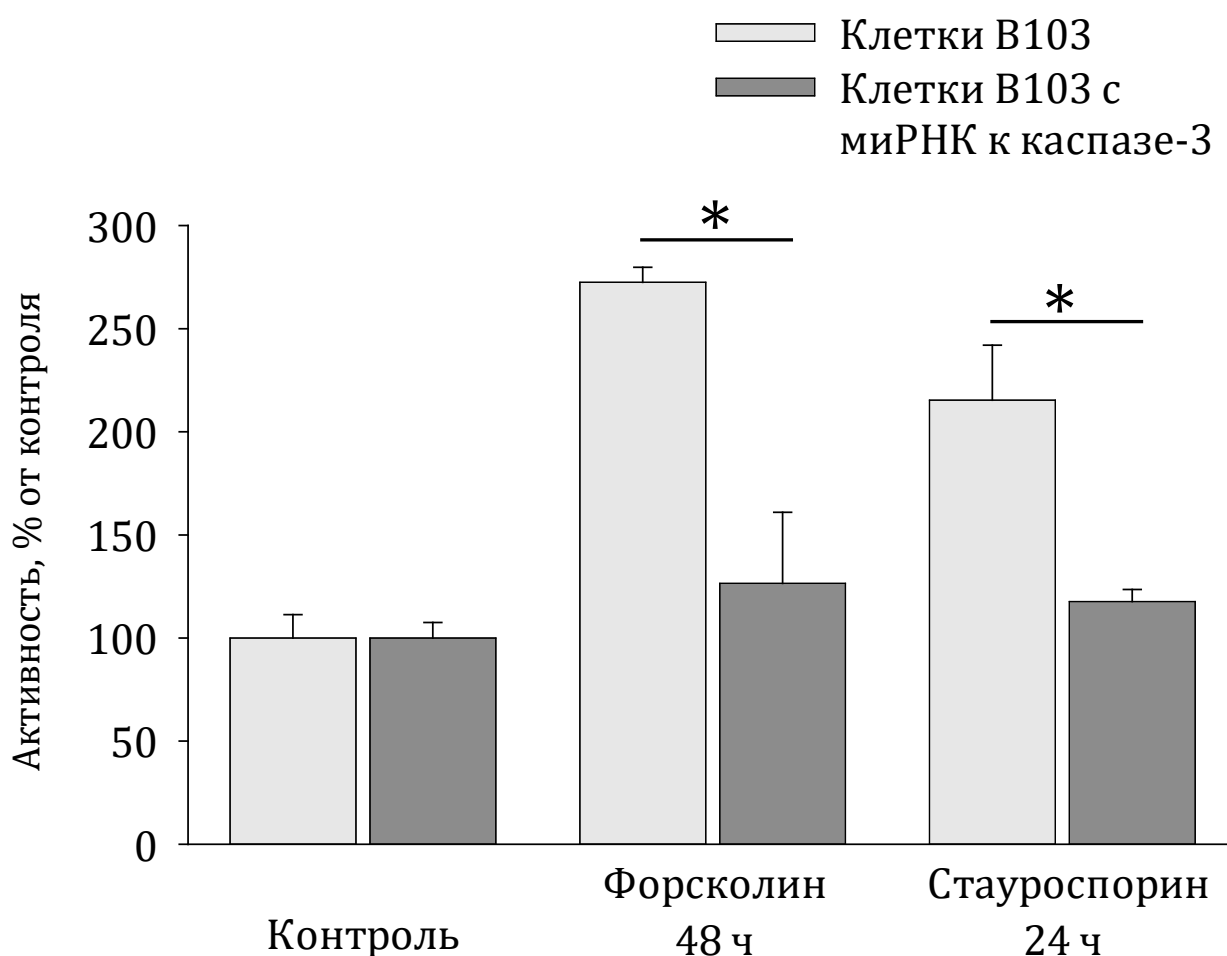


Рис. 11. Активность каспазы-3 в культуре клеток крысиной нейробластомы В103 и в клетках после трансфекции миРНК к каспазе-3 после индукции дифференцировки форсколином, а также после индукции клеточной гибели стауроспорином. \* -  $p < 0.05$ .

Молекулярные механизмы цАМФ-зависимой дифференцировки опосредованы рядом внутриклеточных протеинкиназ (Sanchez et al, 2004). Дифференцировка клеток нейробластомы под действием цАМФ зависит от синтеза белка: полностью предотвращается при добавлении к клеткам ингибитора трансляции РНК циклогексимида (Prasad, Kumar, 1974), но остается неизменной при добавлении ингибитора синтеза РНК актиномицина D (Sheppard, Prasad, 1973). В процессе образования нейритов изменяется организация актинового цитоскелета, причем увеличение активности ПКА приводит к большей выраженности реорганизации актина (Dehmelt et al, 2003). Можно предположить, что синтез белка необходим в первую очередь для процесса перестройки микротрубочек и микрофиламентов, то есть для морфологического видоизменения клетки.

Однако, если для дифференцировки клеток необходим синтез белка, то можно предположить, что необходимо также увеличение скорости протеолиза «старых» компонентов клетки, в частности белков цитоскелета. Ферменты, ответственные за протеолиз клеточных компонентов при дифференцировке, неизвестны, и мы предполагаем, что важнейшим из них может быть каспаза-3, субстратами которой являются важнейшие структурные белки актин и спектрин. Поскольку каспаза-3 может быть непосредственно и опосредованно (расщепляя калпастатин, ингибитор калпаина) вовлечена в регуляцию активности некоторых протеинкиназ, например ПКА, а также через модуляцию активности калпаина изменять функционирование G-белков (Chan & Mattson, 1999), этот фермент может влиять на ключевые компоненты цАМФ-зависимой трансдукции сигнала при дифференцировке клеток нейробластомы.

Морфологическое изменение клеток под действием цАМФ сопровождается и другими существенными биохимическими изменениями. Так, некоторые ферменты, вовлеченные в метаболизм нейромедиаторов, изменяют свою активность при цАМФ-зависимой дифференцировке

(Tremblay et al, 2010). Наиболее вероятно, что эти изменения связаны с созреванием нового вида нейротрансмиссии в клетках нейробластомы или с изменением существующих нейротрансмиттерных систем. Очевидно, что любые изменения в метаболизме нейромедиаторов связаны также с метаболизмом их рецепторов. Однако к настоящему времени неизвестно, разрушаются ли и, если разрушаются, то каким образом, существовавшие в клетках нейробластомы рецепторы при дифференцировке. Мы предполагаем, что каспаза-3 может быть вовлечена в изменение нейротрансмиттерных систем при дифференцировке клеток, прямо или косвенно участвуя в изменении рецепторов клеточной поверхности.

В своей работе мы исследовали активность каспазы-3 в условиях индукции дифференцировки клеток нейробластомы не только форсколином, активирующим аденилатциклазу, но и форболовым эфиром, который, как полагают, вызывает дифференцировку за счет активации протеинкиназы C (Tanaka & Nishizuka, 1994). Несмотря на то, что протеинкиназа C является субстратом каспазы-3 непосредственно и опосредованно (через модуляцию активности калпаина), активность каспазы-3 не изменяется при РМА-зависимой дифференцировке. Таким образом, каспаза-3 активируется не при всех типах дифференцировки нейробластомы (рис. 1), а только при цАМФ-зависимой дифференцировке, несмотря на то, что при обоих типах дифференцировки в клетке изменяется активность многих белков, среди которых есть и субстраты каспазы-3.

Неясно, почему каспаза-3 активируется после индукции дифференцировки форсколином, но не форболовым эфиром, так как механизмы и того, и другого процесса не до конца изучены. Можно предположить, что каспаза-3 является участником внутриклеточного ферментативного каскада, не приводящего клетку к гибели и активируемого форсколином, но не РМА. Мы считаем возможным, что ограниченный протеолиз, осуществляемый каспазой-3 может принимать прямое участие в

регуляции активности целого ряда протеинкиназ и протеинфосфатаз клетки при дифференцировке, регулируя таким образом экспрессию генов. Дальнейшее исследование роли каспазы-3 в процессах дифференцировки может привести не только к получению дополнительной информации о неапоптотической функции этого фермента, но и к более глубокому пониманию механизмов важных событий в жизни клетки.

Можно вспомнить большую группу работ, где дифференцировка не сопровождается потерей ядра и не напоминает апоптоз, в нашем случае как раз дифференцировка нейробластомы V103 апоптоз не напоминает. На миоцитах показано, что генетическое удаление каспазы приводит к неправильной дифференцировке и изменению экспрессии целого ряда специфических белков. Что еще важнее, при этом не изменяется скорость апоптоза в этой же культуре клеток. Идентифицирован субстрат каспазы-3 при дифференцировке миобластов, серин/треониновая протеинкиназа MST1 (Fernando et al, 2002). Каспаза-3 удаляет в этом белке ингибирующий домен, а MST1, будучи активна, не только опосредует дифференцировку в этих клетках, но и восстанавливает паттерн нормальной дифференцировки в тех клетках, где каспаза-3 заингибирована. Таким образом, в миоцитах роль каспазы-3 может быть в первую очередь связана с дифференцировкой, и лишь во вторую с клеточной гибелью.

Негативную регуляцию опосредованной каспазой-3 дифференцировки миобластов осуществляет серин/треониновая протеинкиназа Raf, и похожая регуляция каскада обнаружена при дифференцировке эритроидных клеток (DeChant et al, 2002). Каспазы активируются при дифференцировке мегакариоцитов и образовании тромбоцитов (de Botton et al, 2002). Серин/треониновая протеинкиназа MST1 принимает участие в дифференцировке мегакариоцитов, но роль каспазы-3 в этом процессе не установлена. Интересно, что при образовании тромбоцитов каспаза-3 активирована локально в некоторых клеточных компартментах, в отличие от

апоптоза, где каспаза-3 активирована по всей клетке (de Botton et al, 2002). Также замечено, что сходный с дифференцировкой процесс агрегации тромбоцитов ингибируется каспазным ингибитором.

Дифференцировка моноцитов в макрофаги сопровождается активацией каспаз. Этот процесс сопровождается выходом цитохрома с из митохондрий и ингибируется каспазным ингибитором (Sordet et al, 2002). Более того, удаление гена каспазы-8 предотвращает дифференцировку гематopoэтических клеток. Интересно, что страдают только некоторые виды дифференцировки, другие остаются без изменений. Белок acinus подвергается расщеплению каспазой при дифференцировке моноцитов в макрофаги, тогда как PARP остается без изменений (Sordet et al, 2002). Другой группой исследователей проведена попытка идентификации всех субстратов каспаз на этой модели (Cathelin et al, 2006). Выявлены несколько десятков белков, изменение экспрессии которых происходит при дифференцировке. Часть из этих белков подвергается расщеплению каспазами при дифференцировке. Показано, что дифференцировка остеобластов сопровождается активацией каспаз (Mogi & Togari, 2003). Глиальные клетки мозжечка нуждаются в активной каспазе-3 для дифференцировки (Oomman et al, 2004; Oomman et al, 2006; Oomman et al, 2005). При этом отсутствует иммуногистохимическая положительная окраска нейронов на каспазу-3, а ингибитор каспазы вызывает изменение доли пролиферирующих и дифференцирующихся клеток глии. Дифференцировка нейрональных стволовых клеток сопровождается активацией каспазы-3, а ингибирование этого фермента приводит к снижению активности ряда пронеурогенных киназ (Fernando et al, 2005). Созревание дендритных клеток зависит от активности каспаз, при этом ингибитор каспаз вызывает изменения, сходные с изменениями при воспалительном процессе (Santambrogio et al, 2005). Идентифицирован субстрат каспазы-3 в этом процессе – терамерный адапторный белок AP-1.

Современное представление о вовлечении каспазы-3 в дифференцировку клеток нейробластомы представлено на рис. 12. При дифференцировке в предшественниках нейрональных клеток при физиологических условиях активируется аденилатциклаза (Chen et al, 2010; Sanchez et al, 2004; Yung et al, 2010), в нашем случае с помощью форсколина мы добиваемся того же самого эффекта. Эффекты аденилатциклазы в клетке опосредуются протеинкиназой А (ПКА) и транскрипционным фактором CREB (Beyer & Karolczak, 2000; Peltier et al, 2007), прямое взаимодействие которых с каспазой-3 не показано. При дифференцировке на других типах клеток показано, что индукция CREB приводит к активации каспазы-3, но молекулярный механизм такой активации остается неизвестным (Di Pietro et al, 2007). Еще одним результатом активации аденилатциклазы в клетках при дифференцировке является увеличение экспрессии антиапоптотических белков семейства bcl-2 (Pugazhenthii et al, 2000) и активация протеинкиназ Erk (Ravni et al, 2008; Stork & Schmitt, 2002). Активация каспазы-3, видимо, происходит более менее одновременно с активацией какой-то (или обеих) из этих систем, способных к ограничению каспазной активности, такая одновременность способна поддерживать в клетке баланс между дифференцировкой и гибелью. Активатор каспазы-3 в процессе дифференцировки нейробластомы пока не выявлен, но, по нашим данным, им не является ни каспаза-8, ни каспаза-9, ни калпаин. Таким образом, результаты нашей работы показывают, что у каспазы-3 могут быть другие, ранее неизвестные активаторы, что уже само по себе открывает совершенно новое перспективное направление исследований. Субстрат(ы) каспазы-3 в процессе дифференцировки нейробластомы также остаются неизвестными, но, судя по всему, каспаза-3 в этом процессе расщепляет структурные белки, в первую очередь спектрин. В очень похожей физиологической ситуации перестройки нейритов каспаза-3 локально внутри конуса роста расщепляет структурный белок альфаII спектрин (Westphal et al, 2010), что позволяет нам

с большой долей уверенности предполагать вовлечение каспазы-3 в дифференцировку посредством расщепления именно спектрина.

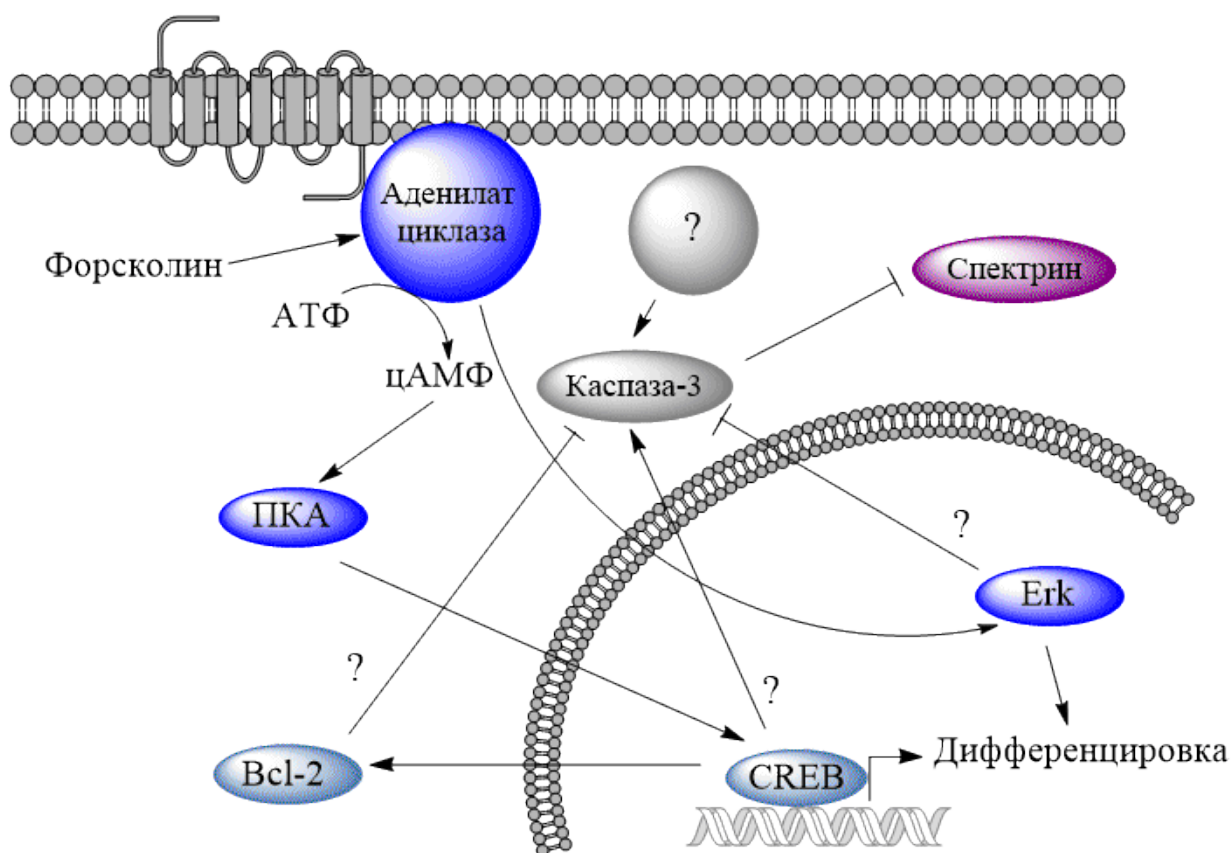


Рис. 12. Вовлечение каспазы-3 в дифференцировку нейробластомы (собственные данные с привлечением данных литературы).

Таким образом, продемонстрированная нами роль каспазы-3 в дифференцировке клеток в существенной степени перекликается со сделанными ранее работами, но мы также обнаружили и новые ранее неизученные аспекты вовлечения каспазы-3 в дифференцировку. Во-первых, активация каспазы-3 в нашем случае происходит без активации протеаз, обычно активирующих этот фермент (каспазы-8, каспазы-9, калпаина), что наталкивает нас на мысль о наличии альтернативных путей активации. Во-вторых, мы показываем вовлечение каспазы-3 в цАМФ-зависимый сигналинг, что в контексте дифференцировки до сих пор показано не было. Несомненно, что несмотря на все достигнутые успехи, несколько важных



вопросов относительно активации каспазы-3 при дифференцировке остаются открытыми. Основными, конечно, являются два вопроса, идентификация активаторов и субстратов каспазы-3 при дифференцировке, и в ближайшее время, стоит надеяться, эти вопросы будут решены.

### **Участие каспазы-3 в долговременной пластичности гиппокампа**

Важное свидетельство участия каспазы-3 в нейрональной пластичности получено при изучении феномена долговременной потенциации на срезах гиппокампа (результаты получены совместно с д.б.н. И. В. Кудряшовой, рис. 13). Срезы гиппокампа крысы инкубировали со специфическим ингибитором каспазы-3 пептидом Z-DEVD-FMK или с неактивным пептидом Z-FA-FMK в течение 30 мин. В течение 7 часов после инкубации ни один из пептидов не изменял базовые характеристики нейрональной активности в гиппокампе. Срезы через 1 час после инкубации с пептидами имели сходные характеристики кривых выработки и удержания долговременной потенциации. В интервале времени от 1.5 до 3 часов после инкубации с ингибитором каспазы-3 долговременная потенциация на срезах была достоверно снижена по сравнению со срезами после инкубации с контрольным пептидом, а через 3.5 часа была полностью блокирована. Активность каспазы-3 в срезах гиппокампа спустя два часа после отмывки избытка ингибитора Z-DEVD-FMK была снижена более чем вдвое (от 0.45 пмоль/мин/мг белка до 0.20 пмоль/мин/мг белка) по сравнению с контролем.

Мы полагаем, что эти результаты являются первым свидетельством того, что ингибирование каспазы-3 значительно снижает или даже блокирует долговременную потенциацию в поле CA1 гиппокампа, а каспаза-3, таким образом, необходима для выработки долговременной потенциации.

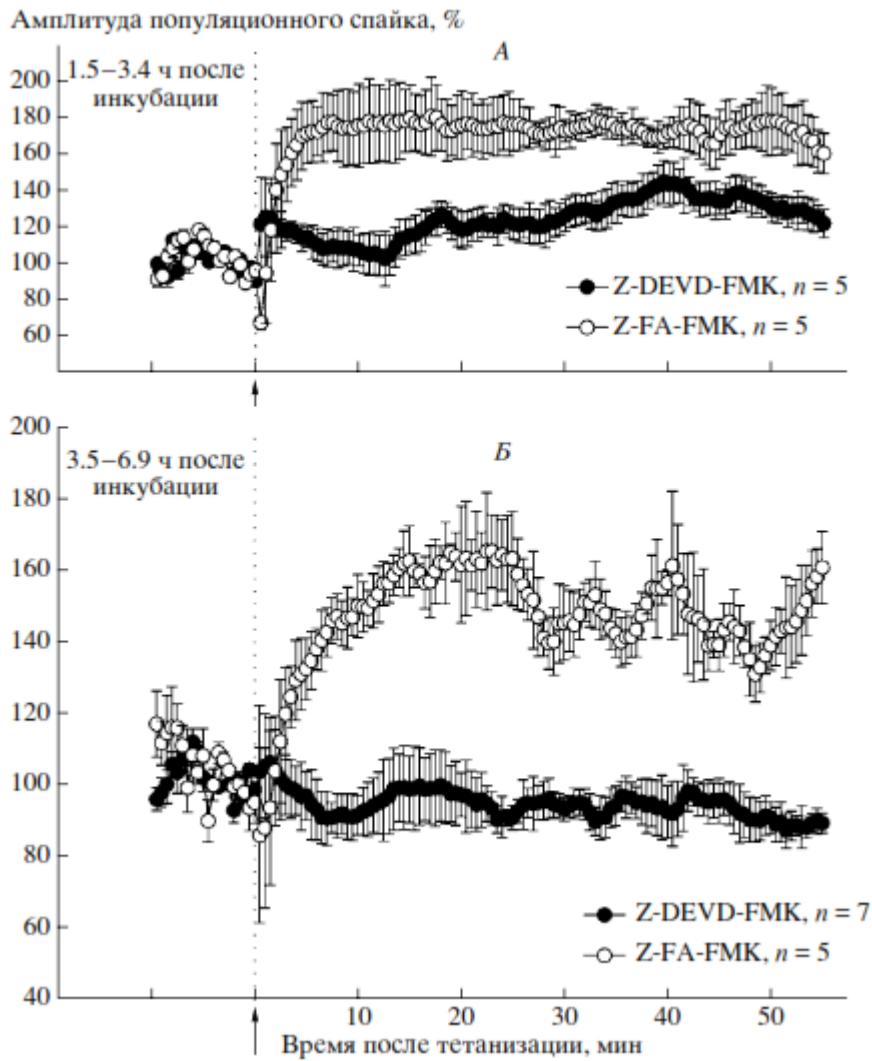


Рис. 13. Амплитуда популяционного спайка (в процентах от уровня до тетанизации) в срезах гиппокампа крыс через А) 1.5-3.4 часа после инкубации с ингибиторами и Б) через 3.5-6.9 часов после инкубации с ингибиторами. Темные символы – ингибитор каспазы-3 Z-DEVD-FMK ( $n=12$ ), светлые символы – контрольный пептид Z-FA-FMK ( $n=10$ ).

В исследовании на срезах гиппокампа крысы показано, что каспаза-3 необходима для выработки долговременной депрессии как фермент, регулирующий транспорт AMPA рецепторов (Li et al, 2010b). Механизм участия каспазы-3 в выработке долговременной потенциации до сих пор не выявлен, однако этот результат находится в соответствии с данными о том, что введение ингибиторов каспазы-3 в гиппокамп блокирует

долговременную пространственную память у крыс при тестировании в водном лабиринте (Dash et al, 2000). Мы проверили, влияет ли введение ингибитора каспазы-3 на другие формы обучения и памяти у крыс (Stepanichev et al, 2005).

Введение ингибитора каспазы-3 Z-DEVD-FMK (3 нмоля в желудочки мозга) значительно изменяло поведение крыс в тесте «темно-светлая камера», тогда как животные после введения контрольного пептида Z-FA-FMK не отличались от интактных (данные не представлены). Более того, Z-DEVD-FMK нарушал выработку некоторых принципиальных компонентов поведения в тесте активного избегания. Определение активности каспазы-3 в отделах мозга крысы, вовлеченных в обучение, показало, что активность каспазы-3 после введения специфического ингибитора сильнее всего снизилась во фронто-париетальной коре (рис. 14). При этом степень ингибирования активности фермента в ткани была невелика, что указывает на важность локальных изменений в определенных клетках мозга.

Имеющиеся данные указывают на то, что каспаза-3 важна для некоторых форм обучения. Проанализированные результаты указывают на наличие связи между активной каспазой-3 и важными, но не приводящими к гибели процессами в клетках головного мозга. Каспаза-3 принимает участие в реализации нейропластичности, включая ее высшую форму (обучение, память), способствуя приспособлению нейронов к меняющимся условиям среды. Интересно отметить, что введение в мозг ингибитора каспазы-1 улучшает память (Gemma et al, 2005), а ингибитор каспазы-1 усиливает долговременную потенциацию в срезах гиппокампа (Lu et al, 2006), демонстрируя обратные ингибированию каспазы-3 эффекты.

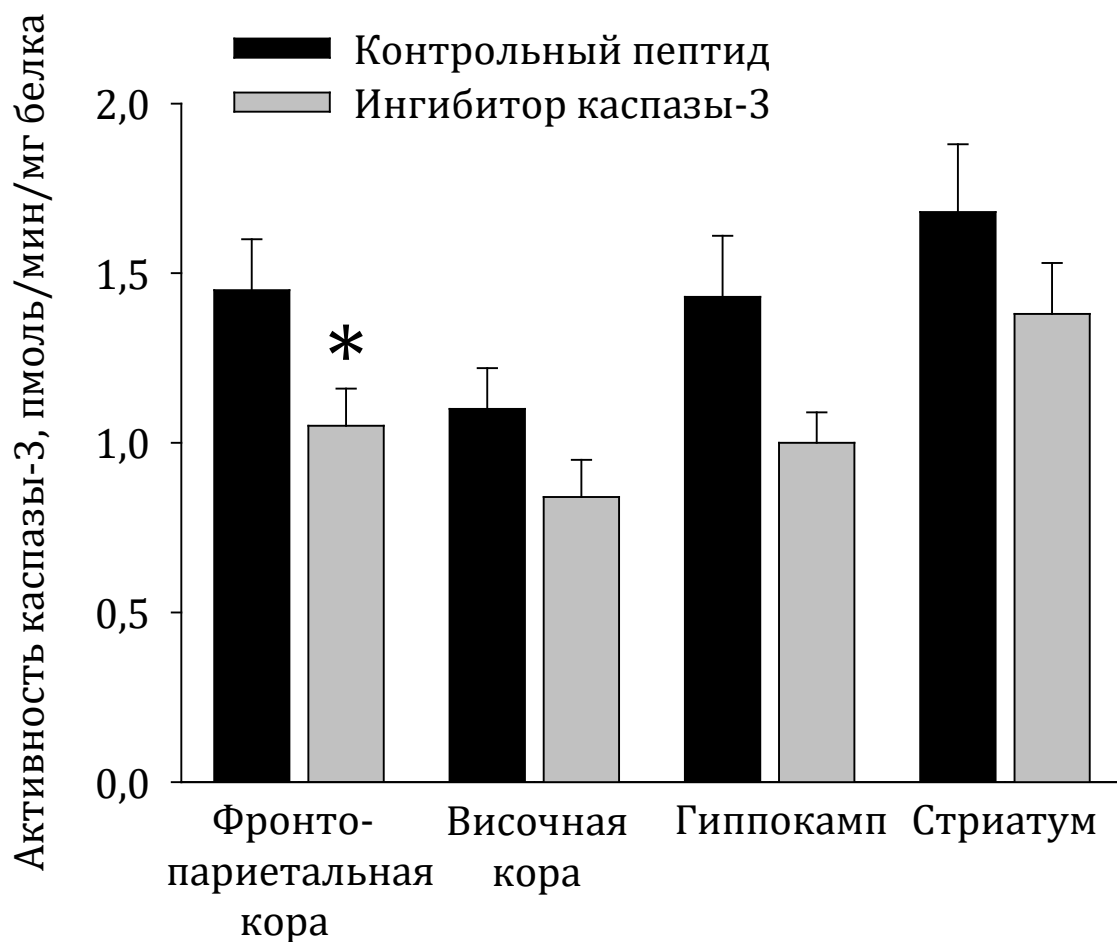


Рис. 14. Активность каспазы-3 в отделах мозга крысы через сутки после интрацеребровентрикулярного введения ингибитора каспазы-3 Z-DEVD-FMK,  $n=9$  и  $n=7$  в контрольной и опытной группах, соответственно. \* -  $p<0.05$ .

### **Однократное введение морфина вызывает активацию каспазы-3 в мозге**

В настоящее время принято считать, что препараты опиоидной группы, и в первую очередь морфин, вызывают значительные структурно-функциональные изменения в клетках головного мозга, в том числе изменения синаптической пластичности (Kauer & Malenka, 2007). Реорганизация синапсов, по современным представлениям, лежит в основе обучения и памяти, и именно индуцированные морфином нарушения

нормального функционирования синапсов могут приводить к возникновению патологической зависимости (Robinson & Kolb, 2004). Вызываемая морфином патологическая зависимость сопровождается изменением функционирования ряда нейромедиаторных рецепторов в мезокортиколимбических структурах головного мозга, последующим изменением множества внутриклеточных каскадов, экспрессии генов, в конечном итоге приводящим к изменению функционирования синапса и нейрона в целом в определенных отделах ЦНС (Williams et al, 2001). Важным элементом изменения внутриклеточного сигналинга при воздействии психоактивных веществ может являться изменение белкового состава нейрона и, в частности, посттрансляционные модификации внутриклеточных полипептидов. Известно несколько разновидностей посттрансляционных модификаций, и некоторые из них могут быть индуцированы морфином, например, фосфорилирование белков (Chen & Sommer, 2009). Однако к настоящему времени чрезвычайно мало известно о вызванных морфином протеолитических модификациях белков в нервной системе. Тем не менее, ограниченный протеолиз является очень распространенной модификацией, и с большой долей вероятности можно предположить, что при реализации фармакологических эффектов морфина в клетке и во внеклеточном пространстве происходят существенные для функции нейрона протеолитические события. Данные литературы позволяют выдвинуть гипотезу об участии протеолитических ферментов головного мозга, в частности ферментов семейства каспаз, в реализации фармакологических эффектов препаратов опиоидной группы.

Нами совместно с лабораторией биохимии НЦ наркологии Минздрава РФ (зав. лаб. академик РАМН Л. Ф. Панченко) было исследовано влияние морфина на активность каспазы-3, основного представителя семейства каспаз, в разных отделах мозга крыс *in vivo* (рис. 15).

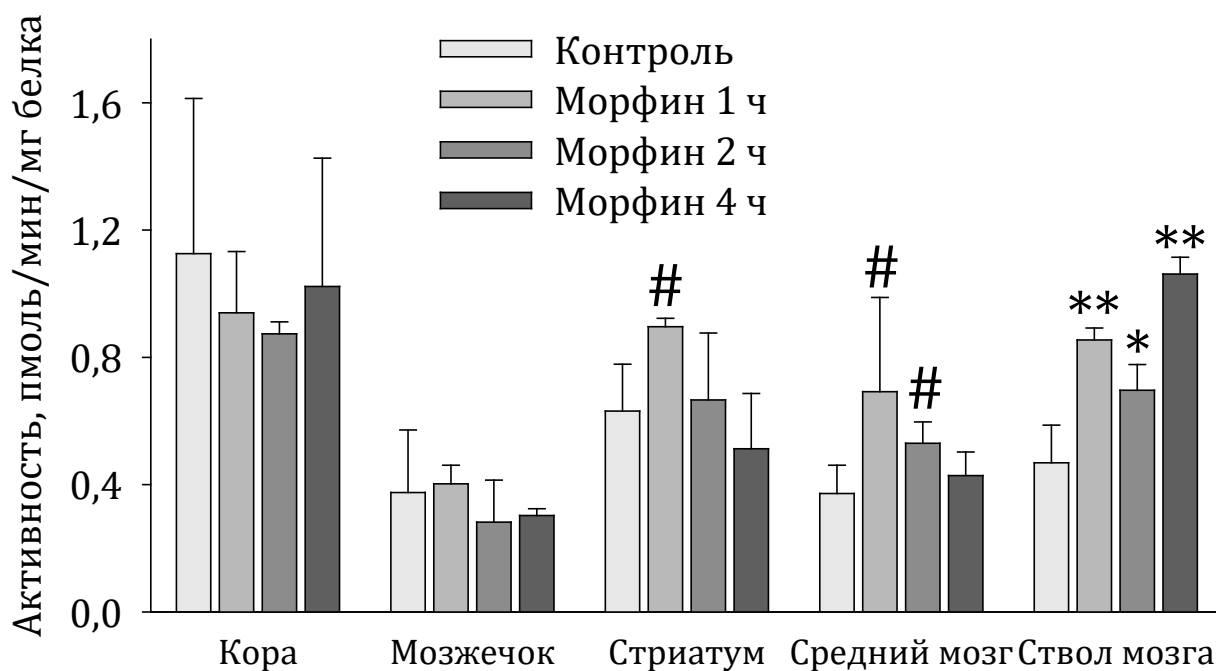


Рис. 15. Активность каспазы-3 в отделах мозга крысы после однократного введения морфина. \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , # -  $p < 0.1$ .

Животным вводили морфин в дозе 30 мг/кг, а затем через 1, 2 и 4 часа определяли активность каспазы-3 в разных отделах мозга с помощью флуориметрического метода. Оказалось, что активность каспазы-3 в коре больших полушарий практически не изменялась на всех сроках после введения морфина, сходная картина получена для мозжечка. Более выраженными оказались изменения активности каспазы-3 в стриатуме. Через 1 час после введения морфина активность каспазы-3 существенно превышала контрольный уровень, а затем, через 2 и 4 часа после введения морфина, активность каспазы-3 снижалась, достигая через 4 часа уровня активности в контроле. Более того, активность каспазы-3 через 1, 2 и 4 часа после введения морфина обратно коррелировала со сроком после введения с высоким уровнем достоверности. В среднем мозге активность каспазы-3 повышалась на всех сроках после введения морфина.

Наиболее заметными были изменения активности каспазы-3 в стволе мозга. Уже через 1 час после введения активность каспазы-3 увеличилась почти в 2 раза от контрольного значения. Увеличение активности каспазы-3 продолжалось и далее, через 2 и 4 часа после инъекции морфина. Таким образом, морфин вызывает активацию каспазы-3 в некоторых отделах головного мозга, что хорошо согласуется с данными литературы (Mao et al, 2002). Однако, никаких механизмов, связывающих морфин и активацию каспаз, до настоящего времени выявить не удалось. Пока остались неизвестными и последствия этой активации, в первую очередь это касается субстратов каспаз в клетке. На данном этапе работы мы рассматриваем активацию каспазы-3 в мозге после введения морфина феноменом, требующим дальнейшего детального исследования, но можем выдвигать гипотезы о механизмах вовлечения каспазы-3 в процессы вызванных морфином патологических и компенсаторных изменений клеток мозга.

Нет ничего удивительного в том, что опосредованный морфином апоптоз происходит (в тех немногих случаях, когда он происходит) при участии каспаз, и именно каспазы-3. Показано, что морфин способен вызывать клеточную гибель в различных областях головного и спинного мозга (Atici et al, 2004; Vajic et al, 2013; Mao et al, 2002), но только в условиях хронического введения, а также в культуре клеток (Hu et al, 2002). Молекулярные механизмы опосредованной морфином нейротоксичности до конца не выяснены, но есть основания полагать, что вызываемая морфином клеточная гибель может быть связана с глутаматными рецепторами (Mao et al, 2002), с апоптотическими белками (Yin et al, 2006), с экспрессией специфических киназ (Fan et al, 2003). Не подвергается сомнению, что гибель клеток под воздействием опиатов проходит при непосредственном участии каспаз, в том числе каспазы-3.

Не столь однозначно связаны ферменты семейства каспаз с действием морфина, когда не отмечается гибели нервных клеток. Так, защитное

действие морфина продемонстрировано на культуре первичных нейронов человека (Cui et al, 2008). Показано, что морфин значительно снижает нейрональную гибель, вызванную депривацией факторов роста или ингибированием внутриклеточных протеинкиназ (Cui et al, 2008). Этот эффект может быть опосредован снижением уровня белка Вах, важного компонента апоптотического сигналинга (Cui et al, 2008). Стоит обратить внимание на то, что Вах является одним из субстратов каспаз (Wood & Newcomb, 1999; Yanase et al, 2000). Морфин вызывает многократное увеличение экспрессии потенциального нейропротектора, клеточного шаперона Hsp70 (Ammon-Treiber et al, 2004), причем предположительно этот эффект не опосредован опиатными рецепторами. Прекондиционирование морфином приводит к нейропротекции на органотипических культурах гиппокампа, а также в модели ишемии на животных (Zhao et al, 2006). Показано, что этот эффект может быть опосредован РКС- $\gamma$  (изоформа протеинкиназы C) (Liu et al, 2008). Другими эффекторами нейропротекции, индуцированной прекондиционированием в присутствии морфина, могут являться РКС- $\epsilon$  и субъединица NR1 ионотропного глутаматного рецептора NMDA подтипа (рецептор селективно связывающий N-метил-D-аспартат) (Meng et al, 2006), при этом изменения NMDA рецептора в каскаде внутриклеточного сигналинга, запускаемого морфином, расположены ниже (downstream) чем активация РКС- $\epsilon$ . Следует отметить, что эта протеинкиназа является хорошо известной мишенью каспазы-3 (Norpe et al, 2001; Mizuno et al, 1997).

На других моделях прекондиционирования показано, что каспаза-3 является важным компонентом сигналинга, обеспечивающего ишемическую толерантность клетки. Так, на модели ишемической толерантности *in vivo* было показано, что в прекондиционированной нервной ткани происходит активация каспазы-3 без признаков апоптоза, а на модели экзайтотоксической толерантности с помощью блокады окислительного



фосфорилирования в нейрональной культуре продемонстрировано, что ингибитор каспазы-3 блокирует вызванную ишемией защиту от NMDA (McLaughlin et al, 2003). Опосредованное морфином повышение внутриклеточной концентрации оксида азота (NO) ингибирует окислительный стресс и защищает клетки от гибели (Rambhia et al, 2005). По крайней мере частично этот эффект опосредован модулирующим влиянием морфина на протеасому и убиквитин. Можно предположить, что посредством NO морфин способен вызывать изменения в основной протеолитической системе клетки, которая, в свою очередь, тесно связана с каспазами (Jang et al, 2007; Yuan et al, 2009). Морфин способен защищать астроциты от апоптоза, причем этот эффект опосредован фосфоинозитид-3-киназой (Kim et al, 2001), связанной, по крайней мере косвенно, с каспазой-3 (Cinar et al, 2007).

Выяснению связи между протеолитической активностью каспазы-3 и изменением функционального состояния нейронов головного мозга после воздействия морфина может помочь исследование протеома синапсов (Prokai et al, 2005). Оказывается, хроническое введение морфина приводит к практически двукратному уменьшению количества  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФазы в синаптической фракции нейронов. Интегральный мембранный белок  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФаза является важным регулятором мембранного потенциала нейрона, и мы предполагаем, что снижение его экспрессии может проходить за счет протеолиза. Более того, авторы обнаружили снижение экспрессии основного структурного компонента цитоскелета нейронов  $\alpha$ II-спектрина (Prokai et al, 2005), являющегося субстратом каспазы-3 (Vanags et al, 1996). В этой же работе обнаружено снижение экспрессии белка клеточной адгезии NCAM, хорошо известного субстрата калпаина (Sheppard et al, 1991). Активность калпаина, в свою очередь, может зависеть от активности каспазы-3 через регуляцию ингибитора калпаина, калпастатина (Porn-Ares et al, 1998; Sun et al, 2008; Wang et al, 1998). Таким образом, анализ изменений

синаптосомального протеома при хроническом воздействии морфина позволяет выдвинуть предположение о вовлечении каспазы-3 в структурно-функциональные перестройки нейронов при воздействии опиатов.

Применение протеомного подхода при анализе изменений, вызванных хроническим введением морфина, позволило выявить группу белков, вовлеченных в этот процесс (Li et al, 2009). Оказалось, что большая группа белков с изменившейся под действием морфина экспрессией так или иначе связана с протеасомальной внутриклеточной системой. Изменение экспрессии протеасомы было обнаружено по всему мозгу, хотя величина и выраженность этого эффекта в разных отделах мозга отличаются. В похожем исследовании наличие изменений экспрессии субъединицы протеасомы после введения морфина было обнаружено в стриатуме (Bierczynska-Krzysik et al, 2006). Как известно, активности каспазной и протеасомальной внутриклеточных протеолитических систем тесно связаны между собой. Например, ингибирование протеасомы вызывает активацию каспаз (Yuan et al, 2009), а активация каспаз может приводить к ингибированию протеасомы (Jang et al, 2007). Хроническое введение морфина приводит как раз к снижению экспрессии протеасомы в большинстве отделов головного мозга крыс (Li et al, 2009), причем авторам не удалось идентифицировать механизм такого снижения. Мы предполагаем, что хотя бы отчасти уменьшение экспрессии внутриклеточных белков под действием морфина проходит через деградацию этих белков ферментами семейства каспаз.

На культуре клеток нейробластомы, стабильно экспрессирующих опиоидные рецепторы, в ответ на воздействие морфина были обнаружены изменения экспрессии нескольких десятков белков (Neasta et al, 2006). Среди них разные субъединицы протеасомы, связь которой с каспазной системой не вызывает сомнений (Jang et al, 2007; Yuan et al, 2009), и структурный белок клеточного ядра ламин А. Последний является давно известным и хорошо охарактеризованным субстратом каспаз (Orth et al, 1996). Более того,

предшествовавшая работа с этой культурой клеток позволяет однозначно связать изменения экспрессии некоторых белков с активностью протеасомальной системы (Mouledous et al, 2005). Можно предположить, что запускаемая морфином цепочка внутриклеточных событий, в частности, изменение экспрессии и активности субъединиц протеасомы, а также реорганизация клеточного ядра, опосредованы ферментами семейства каспаз.

Хроническое введение морфина мышам вызывает изменения в составе постсинаптических уплотнений в гиппокампе, специфических образований в постсинаптическом нейроне (Moron et al, 2007). Среди белков со сниженной под воздействием морфина экспрессией обнаружен  $\alpha$ II-спектрин, белок цитоскелета и субстрат каспазы-3 (Vanags et al, 1996). Более того, хроническое введение морфина приводит к снижению экспрессии GluR1 субъединицы ионотропного рецептора глутамата AMPA подтипа (рецептор, селективно связывающий  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионат) в постсинаптических уплотнениях, причем механизм таких изменений остается невыясненным (Moron et al, 2007). AMPA рецептор играет важную роль в процессах нейрональной пластичности, в частности, во многих когнитивных процессах (Chan et al, 1999). Ранее было показано, что каспаза-3 способна регулировать ток кальция в клетку, расщепляя субъединицу GluR1 глутаматного рецептора (Chan et al, 1999; Glazner et al, 2000; Lu et al, 2002; Meyer et al, 2002). Кроме того, есть свидетельства опосредованного участия каспазы-3 в глутаматном сигналинге в гиппокампе, опосредованном рецепторами как NMDA-, так и AMPA-подтипа (D'Amelio et al, 2011; Li et al, 2010b). Таким образом, можно предположить, что именно каспаза-3 может опосредовать влияние морфина на изменение экспрессии AMPA рецептора в постсинаптических уплотнениях и вызывать, тем самым, изменения пластических свойств нейронов гиппокампа. Локальная активация каспазы-3 может опосредовать реорганизацию дендритов и другие

структурно-функциональные изменения нейронов (Acarin et al, 2007; Ertuerk et al, 2014; Tzeng et al, 2013; Williams et al, 2006), что также свидетельствует в пользу предположения о вовлеченности каспаз в изменения нейронов, наблюдаемые при действии опиатов.

Таким образом, в различных моделях введения морфина на животных и в клеточных культурах показаны изменения содержания многих внутриклеточных белков. Среди белков, содержание которых в клетках головного мозга снижается под действием морфина можно выделить цитоплазматические и ядерные белки, рецепторы, протеинкиназы, важные структурные и функциональные белки нейронов. При этом механизмов снижения уровня полипептида в клетке не так уж и много, и один из важнейших – селективная деградация белка. Принципиально важно, что содержание основной системы внутриклеточной деградации белков – протеасомы, как показано во многих работах, при действии морфина снижается. А протеолитической системы, усиливающей свою активность при введении морфина, до сих пор не обнаружено. Мы предполагаем, что системой, опосредующей внутриклеточный ограниченный протеолиз при действии морфина, может быть каспазная протеолитическая система.

К настоящему времени можно считать установленной связь морфина лишь с одной протеазой головного мозга, тканевым активатором плазминогена. Основной субстрат этой протеазы, плазминоген, в мозге практически отсутствует (Davies et al, 1998), а специфичные для мозга субстраты тканевого активатора плазминогена еще предстоит идентифицировать. Этот фермент синтезируют и секретируют во внеклеточное пространство нейроны практически всех областей головного мозга, секретированная протеаза принимает участие в синаптической пластичности и перестройках внутриклеточного матрикса (Sappino et al, 1993). Показано, что морфин через активацию опиоидных рецепторов индуцирует экспрессию тканевого активатора плазминогена, а тот, в свою

очередь, регулирует высвобождение дофамина в специфических областях головного мозга (Nagai et al, 2004). Стоит отметить, что сходным образом и метамфетамин регулирует активность этой протеазы (Nagai et al, 2005). Практически полностью установленным можно считать тот факт, что часть поведенческих эффектов психоактивных веществ напрямую связана с активностью тканевого активатора плазминогена (Nagai et al, 2005; Nagai et al, 2004; Yamada et al, 2005). Интересно, что тканевый активатор плазминогена является внеклеточной протеазой.

Сам тканевый активатор плазминогена обладает нейропротекторной активностью, в основном опосредуемой фосфоинозитид-3-киназой (Lee et al, 2007), ферментом, регуляцию которого осуществляет каспаза-3 (Cinar et al, 2007). Возможно, что тканевый активатор плазминогена напрямую или через посредников активирует каспазу-3 (Lee et al, 2007). Таким образом, вполне вероятно, что и при индукции активности тканевого активатора плазминогена морфином происходит активация каспаз. Может оказаться, что каспазная протеолитическая система связана с молекулярными механизмами действия морфина через другую протеолитическую систему, а именно, через тканевый активатор плазминогена.

Таким образом, анализируя данные литературы и собственные результаты, можно прийти к заключению, что морфин в определенных ситуациях вызывает активацию каспаз в клетках головного мозга. В некоторых ситуациях вызванное морфином снижение уровня внутриклеточных полипептидов может напрямую быть связано с активностью этих протеаз, а в других морфин может быть связан с каспазами опосредованно, через иные протеолитические системы. Механизмы связи морфина с протеазами головного мозга практически мало исследованы. Выявление связи механизмов возникновения и развития патологической зависимости с протеолитическими системами головного мозга, безусловно, позволит лучше понять патогенез этого заболевания. Имея в виду

социальную и медицинскую значимость наркозависимости, новый, ранее неизвестный, механизм регуляции морфином внутриклеточных процессов подлежит безотлагательному исследованию. Весьма вероятно, что разработанные фармакологические подходы регуляции активности протеолитических систем при других патологиях окажутся полезными и для терапии наркозависимости.

## 2. ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПАРТНЕРОВ КАСПАЗЫ-3 В СИТУАЦИЯХ, НЕ СВЯЗАННЫХ С АПОПТОЗОМ

К настоящему времени остается невыясненным, как происходит регуляция активности каспаз и как каспазы регулируют различные внутриклеточные события в ситуациях, не связанных с апоптозом. Мы предположили, что внутриклеточные партнеры каспазы-3 различаются при апоптозе и в его отсутствие. Для проверки этой гипотезы мы провели несколько экспериментов с использованием специально разработанного нами метода.

### **Выявление партнеров каспазы-3 с помощью кросс-линкеров**

Конечные задачи большинства биохимических, молекулярно-биологических и, в частности, нейробиологических исследований сводятся к установлению последовательности химических реакций, лежащих в основе метаболизма и сигнальной трансдукции в клетке. Поскольку эти реакции в подавляющем большинстве ферментативные, основными их участниками являются фермент и субстрат. К настоящему времени стало очевидным, что важнейшие пути передачи меж- и внутриклеточных сигналов и метаболизма живых клеток, в том числе клеток мозга, опосредованы ферментами с широкой субстратной специфичностью. Десятки тысяч клеточных белков являются субстратами протеинкиназ, протеинфосфатаз, протеиназ. Для понимания участия конкретного фермента в реализации конкретных путей, лежащих в основе конкретных функций и функциональных особенностей клетки в конкретных ситуациях необходимо знать, какой именно субстрат вступает в реакцию, в каком компартменте клеток и когда. Имеющиеся экспериментальные подходы к решению такой задачи в настоящее время недостаточно эффективны. Современные методы исследования, рутинно применяемые в нейробиологии, позволяют ответить на этот вопрос крайне редко и, как правило, в модельных системах, весьма далеких от ситуации *in*

vivo. Одним из перспективных подходов к данной проблеме представляется использование кросс-линкеров (Yakovlev et al, 2010).

Кросс-линкерами принято называть химические вещества, которые способны ковалентно связывать между собой молекулы биологических или химических соединений, в первую очередь белков и нуклеиновых кислот. В химических исследованиях обработка кросс-линкером имеет, как правило, только одну цель – изменение физико-химических свойств вещества, тогда как в биологии задачи, решаемые с помощью кросс-линка, гораздо более сложные и тонкие.

Применение кросс-линкеров в биологии не ограничивается какой-либо конкретной областью и практически любой исследователь – от фармаколога до гистохимика – может найти интересное применение кросс-линкерам в своей работе. В целом, сферу применения кросс-линкеров в биологии можно охарактеризовать как поиск партнеров по межмолекулярным взаимодействиям. Исследователь с помощью определенных экспериментальных подходов связывает взаимодействующие между собой молекулы ковалентной связью, чтобы затем эти партнеры идентифицировать или охарактеризовать. Такими партнерами могут быть фермент и его субстрат, рецептор и его лиганд, антитело и соответствующий антиген, субъединицы олигомерного белка, транскрипционный фактор и участок ДНК, молекулярный мотор и передвигаемая им органелла, компонент внутриклеточного матрикса и секретируемое клеткой вещество. Перечисленные взаимодействия макромолекул не всегда достаточно сильны и достаточно продолжительны, чтобы сохраняться при необходимом для анализа разрушении клетки, поэтому фиксация этих взаимодействий кросс-линкером зачастую является уникальным средством изучения физиологии клетки. Ковалентно связанную пару партнеров можно идентифицировать с помощью иммунопреципитации с последующей хромато-масс-спектрометрией.



Кросс-линкеры являются высоко реакционноспособными небольшими (по «белковым меркам») молекулами. Каждый кросс-линкер имеет специфичность к той или иной функциональной группе биологического полимера, связь, образуемая кросс-линкером, может быть расщепляемая или нерасщепляемая, для запуска реакции кросс-линкеры могут быть необходимыми триггерами, например, облучение ультрафиолетом. Еще одним важным свойством кросс-линкера является длина образуемой им ковалентной связи. Гомофункциональный кросс-линкер реакционноспособен по отношению к одной функциональной группе полимера, а гетерофункциональный способен связать между собой разные функциональные группы.

Вообще, важнейшим требованием к исследователю, изучающему межмолекулярные взаимодействия с помощью кросс-линкеров, является требование максимальной близости экспериментальных условий к физиологическим. Идеальным с этой точки зрения вариантом является проведение экспериментов на живом организме или, по крайней мере, на клетках в культуре. Клеточная культура, однако, далеко не всегда является хорошей моделью процессов, проходящих в ткани, особенно такой сложной, как нервная. А в ткани живого организма провести кросс-линк очень сложно, так как кросс-линкеры являются высоко реакционноспособными веществами, и при попадании в организм вступают во множество побочных реакций, например, во внеклеточном матриксе или липидном бислое клеточной мембраны, и не проходят внутрь клеток. Именно поэтому исследователю часто приходится проводить кросс-линк в гомогенате, что не может не вызывать вопросы о корректности получаемых результатов. Основное сомнение состоит в следующем: не являются ли выявляемые с помощью кросс-линкеры взаимодействия молекул в гомогенате результатом их случайных соударений? Хотя однозначно ответить на этот вопрос невозможно, так как для ответа необходимо знать по крайней мере влияние микроокружения на молекулы интереса, физико-химическую природу

взаимодействия этих молекул, их концентрации, а также роль самого кросс-линкера в изменении третичной структуры биополимеров, однако принято считать, что взаимодействия эти неслучайны.

С учетом сказанного планирование эксперимента по идентификации межмолекулярных взаимодействий с помощью кросс-линкеров нельзя назвать сложным, а проведение самого эксперимента не требует глубоких специфических навыков. Это дает надежду на то, что исследование межмолекулярных взаимодействий с использованием кросс-линкеров может быть достаточно успешным с точки зрения получения фундаментально важных результатов.

Для выявления партнеров каспазы-3 в клетке нами было использовано несколько подходов, основанных на применении кросс-линкеров, причем применение этих подходов к поиску каспазных партнеров не было описано ранее. В нашей работе были использованы аминосpezifичные кросс-линкеры с различной длиной спейсера. Таким образом, мы попытались связать каспазу-3 с ее партнерами через свободные аминокгруппы этих белков, при этом изменяли длину спейсера, чтобы учесть размер белка-партнера каспазы-3.

С использованием нескольких кросс-линкеров нами было показано, что в коре больших полушарий головного мозга интактных крыс каспаза-3 находится в комплексе с несколькими белками. На рис. 16а представлены результаты одного репрезентативного эксперимента из трех. Особенно отчетливо видно, что использование разных кросс-линкеров позволяет выявить различный спектр взаимодействующих с каспазой-3 белков. Это не удивительно, так как кросс-линкеры отличаются размером и стерической специфичностью. Четко выделяется полоса каспазы-3 в комплексе с белком массой 40-50 кДа, (суммарная масса около 75 кДа) при использовании кросс-линкера DSP. Использование кросс-линкеров EDC и EGS не дает четкого представления о партнерах каспазы-3 в гомогенатах мозга. Важно отметить,

что каспаза-3 образует комплексы с белками, при этом ее активность при использовании кросс-линкеров не изменяется (активность 87% от контрольной, отличия не достоверны). Таким образом, можно заключить, что использование кросс-линкеров позволяет выявить партнеров каспазы-3 в мозге.

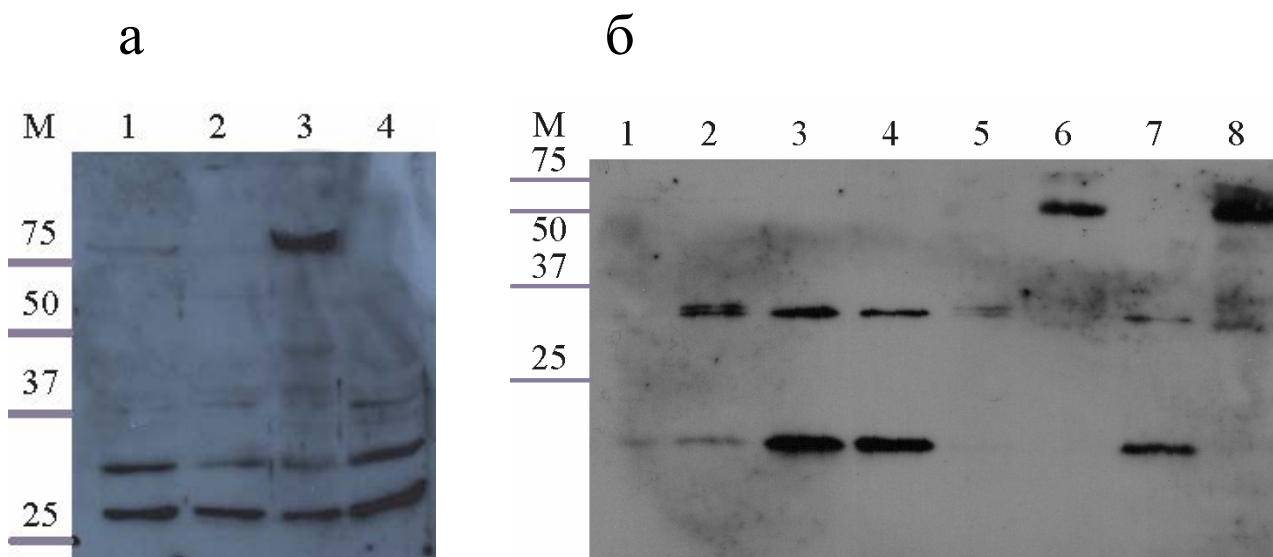


Рис. 16. Связывание каспазы-3 со своими партнерами в а) гомогенате коры головного мозга крысы и в б) первичной культуре нейронов мозжечка с помощью кросс-линкеров, окрашивание антителами к каспазе-3 (вестерн блот). Обозначения: а) М – маркеры молекулярной массы, в кДа, 1 – EDC, 2 – EGS, 3 – DSP, 4 – контроль; б) М – маркеры молекулярной массы, в кДа, 2, 4 – DMP, 6, 8 – EGS, 1, 2, 5, 6 – клетки без обработки стауроспорином, 3, 4, 7, 8 – клетки, обработанные стауроспорином.

Удобной моделью для изучения взаимодействия каспазы-3 с молекулярными партнерами является культура первичных нейронов. Кросс-линкер растворяют в клеточной среде, он проникнет через мембрану и фиксирует внутриклеточные взаимодействия. Мы использовали два кросс-линкера, DMP и EGS, для того, чтобы найти внутриклеточные взаимодействия каспазы-3 «в норме» и в процессе клеточной гибели – при индукции каспазы-3 стауроспорином. Эксперимент был воспроизведен

шесть раз, число лунок на точку не меньше трех, на рис. 16б представлены данные одного репрезентативного эксперимента.

Использование кросс-линкера DMP не выявило партнеров каспазы-3 в первичных нейронах мозжечка. В отличие от гомогенатов головного мозга крысы, EGS позволяет четко выявить партнеров каспазы-3 в клетке как в норме (дорожка 6), так и при апоптозе (дорожка 8) в культуре первичных нейронов мозжечка. Масса партнера в нормальных условиях составляет около 40 кДа, тогда как при обработке стауроспорином масса партнера немного больше (рис. 16б). Таким образом, картина в норме отличается от картины при апоптозе, что позволяет предполагать наличие различных партнеров каспазы-3 в разных физиологических ситуациях. Эксперименты на клеточных культурах проведены совместно с лабораторией экспериментальной нейробиологии ИЦ неврологии РАМН (зав. лаб. д.б.н. Л. Г. Хаспеков).

В результате связывания с внутриклеточными партнерами снижается активность каспазы-3 в пробах, где в качестве кросс-линкера использовали EGS (рис. 17). Эксперимент воспроизведен шесть раз, число лунок на точку не меньше трех, представлены данные одного репрезентативного эксперимента. Снижение обнаружено и в пробах без стауроспорина, и в пробах со стауроспорином ( $p < 0.05$  по тесту Манна-Уитни). Таким образом, можно предполагать, что каспаза-3 в норме и при патологии внутри клетки связана с белком, ингибирующим ее активность.

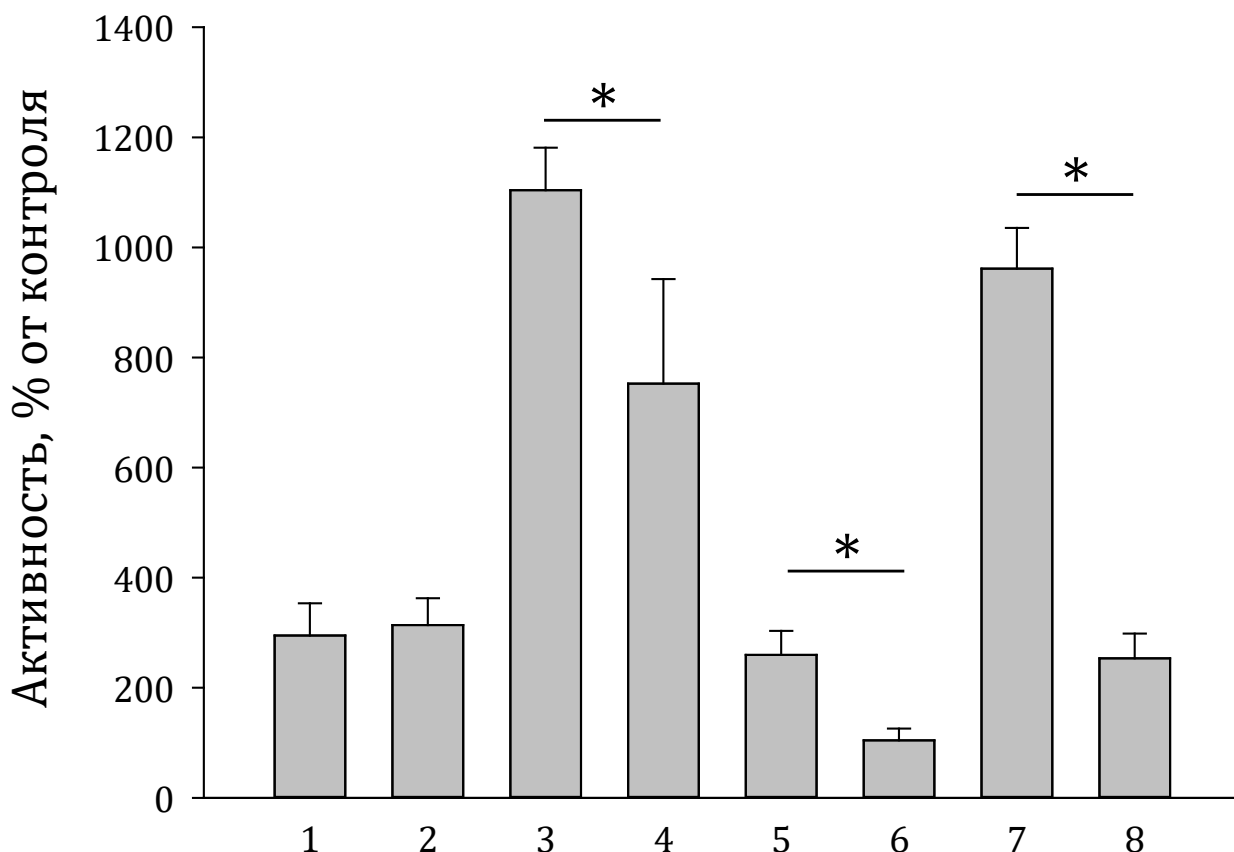


Рис. 17. Активность каспазы-3, пмоль/мин/мг белка в культуре нейронов мозжечка. Обозначения как на рис. 14б. \* -  $p < 0.05$ .

### **Специфичность взаимодействия каспазы-3 с ее партнерами в разных фракциях клеток головного мозга**

Анализ литературы и результаты наших предыдущих экспериментов позволяют предполагать, что каспаза-3 внутри клетки связана со своим(и) молекулярными партнерами. На предыдущем этапе работы в экспериментах на культуре клеток нами было показано, что предполагаемый партнер каспазы-3 имеет ингибирующую активность. Мы проверили, какую функциональную значимость имеет связывание каспазы-3 со своими партнерами в клетках головного мозга. Более того, мы проверили гипотезу о том, что в разных клеточных компартментах каспаза-3 может быть связана с различными партнерами. Также была проверена гипотеза об изменении внутриклеточного окружения каспазы-3 в нейронах в процессе онтогенеза.

В первом эксперименте было проведено сравнение уровней активности каспазы-3 в разных фракциях клеток головного мозга животных разного возраста до и после обработки кросс-линкером EGS. Практически во всех фракциях активность каспазы-3 была снижена, данные представлены в таблице 4.

Снижение активности под действием EGS происходит в некоторых компартментах неодинаково у взрослых и молодых животных (таблица 4), что позволяет нам говорить о разном внутриклеточном окружении каспазы-3 в процессе онтогенеза. Также мы подтверждаем свое предположение о разных партнерах каспазы-3 в разных внутриклеточных компартментах. В дальнейшем активность в пробах после обработки EGS относили к уровню взрослых животных также после обработки EGS, такой способ выбран как наиболее иллюстративный.

Таблица 4. Активность каспазы-3 после обработки EGS в процентах от исходного уровня.

| Фракция         | 1*           | 2*             | 3*            | 4*            | 5*           | 6*            | 7*            | 8*            |
|-----------------|--------------|----------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| Группа          |              |                |               |               |              |               |               |               |
| Взрослые<br>n=9 | 25.9±<br>4.5 | 138.6±<br>46.8 | 68.0±<br>10.8 | 22.1±<br>10.5 | 14.4±<br>4.9 | 55.6±<br>19.2 | 26.5±<br>7.3  | 52.0±<br>13.8 |
| Молодые<br>n=8  | 16.2±<br>5.7 | 173.5±<br>44.2 | 54.1±<br>14.9 | 43.4±<br>20.1 | 19.3±<br>3.3 | 77.3±<br>29.8 | 30.6±<br>13.6 | 66.8±<br>13.5 |

\* - внутриклеточные фракции клеток головного мозга, 1 – цитоплазматическая, 2 – синаптосомальная, 3 – мембраны синаптосом, 4 – содержимое органелл (митохондрии и лизосомы), 5 – мембраны органелл (митохондрии и лизосомы), 6 – миелин, 7 – ядра, 8 – мембраны ядер.

Активность каспазы-3 в цитоплазматической фракции клеток головного мозга молодых и взрослых животных в пробах без обработки и после обработки кросс-линкером EGS представлена на рис. 18а.

Результаты показывают, что в цитоплазматической фракции активность каспазы-3 у молодых животных достоверно выше, чем у взрослых,  $p < 0.05$ . Кросс-линкер снимает часть этого эффекта, что позволяет говорить о наличии какого-то ингибитора каспазы-3 в цитоплазме клеток головного мозга именно молодых животных.

На рис. 18б представлены данные по синаптосомальной фракции. Активность молодых животных также отличается от уровня взрослых, но на этот раз в сторону снижения,  $p < 0.05$ . EGS также значительно снижает активность молодых по сравнению со взрослыми,  $p < 0.05$ . Анализ активности каспазы-3 в синаптосомальной фракции показывает, что кросс-линкер не имеет специфического действия в этой фракции.

Во фракции синаптосомальных мембран динамика изменений очень похожа (рис. 18в). Тем не менее, без обработки кросс-линкером отличия молодых от взрослых не являются достоверными, а обработка EGS приводит к достоверному отличию молодых от взрослых,  $p < 0.05$ . Анализ активности каспазы-3 в синаптосомах, как в растворимой, так и в мембранной фракции, позволяет нам предполагать, что обработка кросс-линкером приводит к перераспределению каспазы-3 из растворимой в мембранную фракцию. В таком случае, можно предполагать наличие мембранно-связанного партнера каспазы-3 во фракции синаптосом.

Во фракции лизосом и митохондрий активность каспазы-3 у молодых животных была достоверно снижена по сравнению со взрослыми,  $p < 0.05$  (рис. 18г). Кросс-линкер обращает часть эффекта, что позволяет нам говорить о наличии партнера, способного увеличивать активность каспазы-3 в этой фракции.

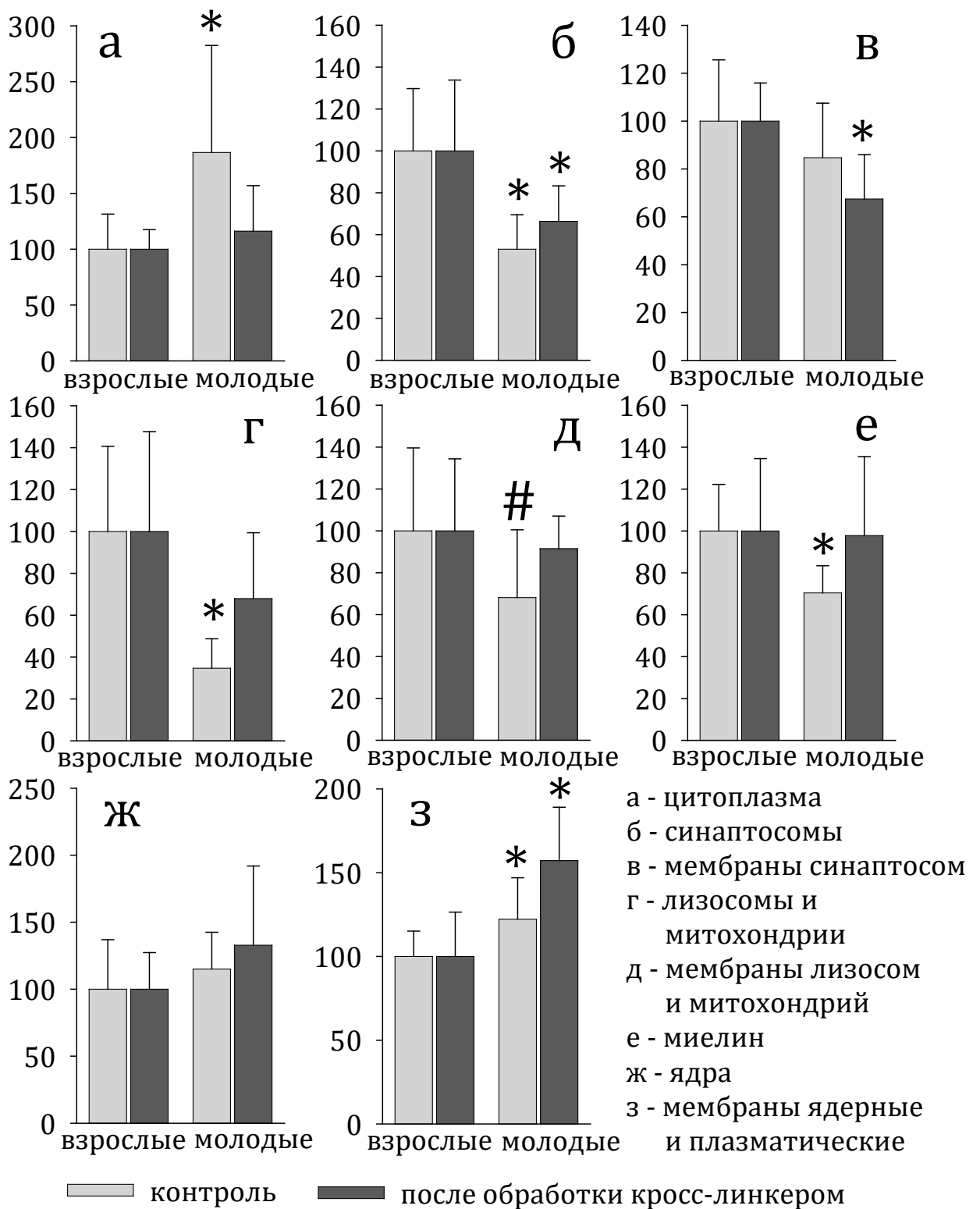


Рис. 18. Активность каспазы-3 в процентах от уровня активности у взрослых животных во фракциях клеток головного мозга без обработки и после обработки EGS. \* -  $p < 0.05$ , # - 0.1.



Схожая картина обнаружена во фракции мембран внутриклеточных органелл (рис. 18д). Тем самым, по анализу фракции органелл мы можем сделать предположение о наличии белка, способного после связывания с каспазой-3 с помощью кросс-линкера увеличивать ее активность. Также нельзя исключить косвенного влияния кросс-линкера на активность фермента, например, EGS может связывать белок, ингибирующий активность каспазы-3, тем самым ее активируя.

Активность каспазы-3 в миелиновой фракции представлена на рис. 18е. Молодые животные имеют в этой фракции активность достоверно ниже чем взрослые,  $p < 0.05$ , при этом кросс-линкер снимает часть этого эффекта, тем самым давая нам возможность предположить наличие некоторого активатора каспазы-3 в этой фракции.

В ядерной фракции отличий между группами не обнаружено, данные представлены на рис. 18ж, а во фракции ядерных мембран отличия молодых животных от взрослых достоверны как в группе без обработки, так и в группе после обработки кросс-линкером,  $p < 0.05$ , (рис. 18з). Тем самым, мы получаем изменения, примерно схожие с изменениями во фракции клеточных органелл.

Анализ всех данных по выявлению функциональной значимости связывания каспазы-3 со своими партнерами в различных компартментах клеток головного мозга позволяет сделать некоторые заключения. Самым важным результатом работы явилось то, что каспаза-3 неравномерно распределена по компартментам клетки. Более того, распределение меняется в процессе онтогенеза. При этом у каспазы-3 в разных компартментах есть как ингибиторы, так и активаторы активности.

В результате нашего предыдущего эксперимента было выяснено, что каспаза-3 в клетке может находиться в связи с различными белками, предположительно ингибирующими ее активность. Более того, мы показали,

что спектр этих белков отличается в норме и при апоптозе. Следующим шагом стала иммунопреципитация каспазы-3 в комплексе с этими белками.

Фотография геля с образцами после иммунопреципитации представлена на рис. 19. Из полученных результатов мы делаем вывод о применимости данного метода для изучения взаимодействия каспазы-3 со своими партнерами. Более того, наличие полосок на дорожке 4 в диапазоне масс от 25 до 37 кДа говорит нам о том, что спектр белков, взаимодействующих с каспазой-3 в норме и после индукции апоптоза с помощью стауроспорина, различается.

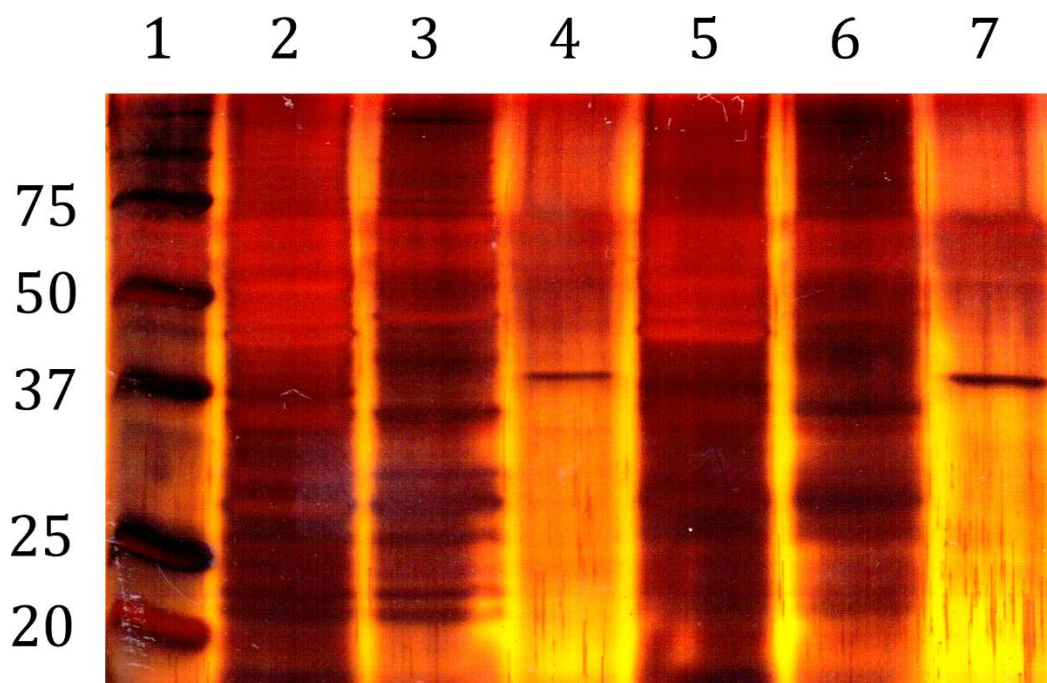


Рис. 19. Окраска геля нитратом серебра. Образцы: 1 – маркеры молекулярной массы, слева значения в кДа, 2 – лизат нейронов без обработки стауроспорином, 3 – несвязавшаяся с антителами фракция нейронов без обработки стауроспорином, 4 – связавшаяся с антителами фракция нейронов без обработки стауроспорином (элюат), 5 – лизат нейронов после обработки стауроспорином, 6 – несвязавшаяся с антителами фракция нейронов после обработки стауроспорином, 7 – связавшаяся с антителами фракция нейронов после обработки стауроспорином (элюат).

К настоящему времени не удалось идентифицировать белок – партнер каспазы-3 в нейронах, однако эта проблема, стоит надеяться, будет со временем решена. Дело в том, что для любого, даже самого чувствительного метода идентификации белка, существует минимальное количество белка, необходимое для получения достоверных результатов. Мы отчетливо видим, что белковая полоса белка-партнера каспазы-3 находится в диапазоне масс 35-45 кДа (рис. 19, дорожки 4 и 7), но пока не смогли идентифицировать этот белок. Мы считаем, что нашли белок-партнер каспазы-3, но в силу ограничения методов, использованных для анализа, не смогли его идентифицировать.

Анализ всех данных по выявлению функциональной значимости связывания каспазы-3 со своими партнерами в различных компартментах клеток головного мозга позволяет сделать некоторые заключения. Самым важным результатом работы явилось то, что каспаза-3 по-разному распределена по компартментам клетки. Более того, распределение меняется в процессе онтогенеза. При этом у каспазы-3 в разных компартментах есть как ингибиторы, так и активаторы активности.

### 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕАЗ МОЗГА, СПОСОБНЫХ РАСЩЕПЛЯТЬ СУБСТРАТ КАСПАЗЫ-3

Итак, мы продемонстрировали различие молекулярных партнеров каспазы-3 в разных физиологических ситуациях. Многообразие исполняемых каспазой-3 функций в клетке можно, таким образом, объяснить различием ее субстратов в разных ситуациях. Однако, остается еще одна возможность регуляции каспазной активности в клетке. А именно, возможно, что субстраты каспазы-3 в некоторых не связанных с апоптозом ситуациях расщепляют другие протеазы. В таком случае каспаза-3 является истинно апоптотическим ферментом, а за расщеплением ее субстратов в неапоптотических ситуациях стоят другие протеазы со сходной субстратной специфичностью. Эту гипотезу мы проверили в следующей серии экспериментов, предположив, что фактором, определяющим специфичность протеаз по отношению к субстрату каспазы-3 является рН.

#### **Влияние рН на расщепление субстрата каспазы-3 протеазами мозга**

Первый же эксперимент показал, что в головном мозге крыс присутствует фермент, расщепляющий синтетический субстрат Ас-DEVD-АМС при кислых значениях рН (рис. 20а, представлены результаты одного характерного эксперимента). Схожий профиль зависимости DEVDазной активности от рН получен и для клеток крысиной нейробластомы (данные не представлены). Чтобы исключить влияние состава буферного раствора на DEVDазную активность, мы провели аналогичные эксперименты с использованием цитратно-фосфатного и ацетатного буферов. Профиль DEVDазной активности при этом не изменился (данные не приведены). Таким образом, в клетках мозга есть фермент, способный расщеплять специфический субстрат каспазы-3 в условиях, не оптимальных для работы самой каспазы-3.

В следующем эксперименте мы попытались проверить специфичность DEVDазной активности при низких значениях pH в супернатантах гомогенатов мозга. Одним из способов проверки специфичности активности является определение доли ингибирования этой активности специфическим ингибитором каспазы-3 Ас-DEVD-СНО. Зависимость DEVDазной активности от концентрации Ас-DEVD-СНО в мозге при двух значениях pH представлена на рис. 20б. Наши результаты свидетельствуют, что микромолярные концентрации Ас-DEVD-СНО полностью ингибируют кислую DEVDазную активность. Таким образом, из представленных результатов можно сделать вывод о том, что в мозге присутствует фермент, который расщепляет субстрат каспазы-3 Ас-DEVD-АМС при кислых значениях pH, причем ингибитор каспазы-3 Ас-DEVD-СНО полностью ингибирует активность этого фермента.

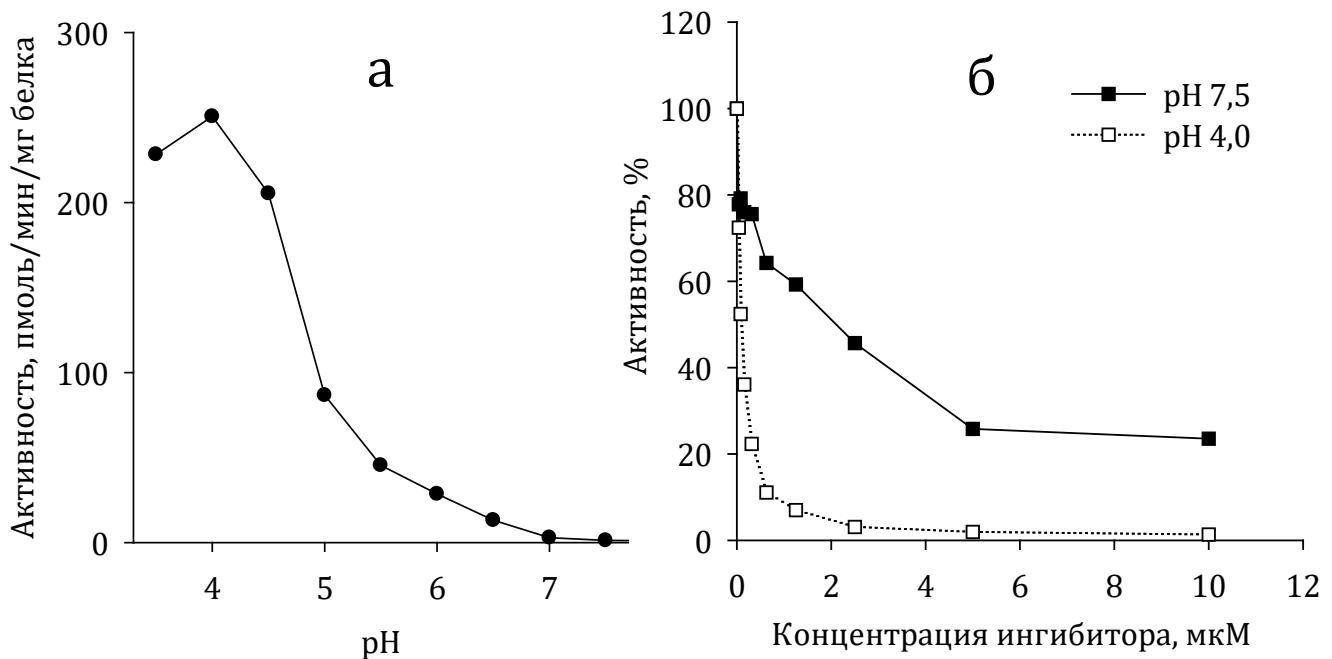


Рис. 20. а) Зависимость DEVDазной активности в мозге от pH и б) ингибирование DEVDазной активности в мозге специфическим ингибитором каспазы-3 Ас-DEVD-СНО при нейтральном и кислом значении pH, за 100 % принята активность в отсутствие ингибитора.

### **Идентификация протеаз, обладающих DEVDазной активностью в мозге**

Для того чтобы охарактеризовать фермент, обладающий кислой DEVDазной активностью, мы исследовали влияние на его активность некоторых функционально важных химических соединений. Активность ферментов семейства каспаз ингибируется ионами цинка, другие двухвалентные катионы не оказывают влияния на эти протеазы (Stennicke & Salvesen, 1997). DEVDазная активность в мозге при pH 4.0 имеет несколько иную зависимость от двухвалентных ионов. Кроме ингибирования ионами цинка, DEVDазная активность в мозге при pH 4.0 частично ингибируется также ионами магния и кальция (данные не представлены). Для DEVDазной активности при кислом значении pH характерна зависимость от SH-восстанавливающих реагентов. Наличие дитиотреитола или восстановленного глутатиона в концентрации свыше 10 мМ значительно увеличивает DEVDазную активность при pH 4.0. Более того, «кислая» DEVDазная активность падает в присутствии окисленного глутатиона, иодацетамида и N-этилмалеимида. Так, и это типично для цистеин-зависимых протеаз, концентрации этих реагентов выше 10 мМ существенно снижают «кислую» DEVDазную активность.

Используя приведенные данные можно сделать вывод о том, что фермент, обладающий кислой DEVDазной активностью в мозге, является кислой цистеиновой протеазой. Хорошо известно, что кислые цистеиновые протеазы локализованы в лизосомальном компартменте. Для того чтобы определить внутриклеточную локализацию фермента, ответственную за DEVDазную активность при pH 4.0, мы провели субклеточное фракционирование гомогената мозга крысы. Оказалось, что кислая DEVDазная активность принадлежит, в основном, лизосомальной фракции клеток головного мозга (данные не представлены).

На основании биохимических свойств и внутриклеточной локализации кислой DEVDазной активности можно сделать вывод, что фермент,

обладающий этой активностью, принадлежит семейству катепсинов. В результате очистки из гомогената (Popovic et al, 1996) была получена фракция, содержащая фермент, обладающий DEVDазной активностью при pH 4.0. Эта фракция была исследована методом SDS-ПААГ электрофореза с последующей окраской нитратом серебра (рис. 21). Две белковые полосы в геле принадлежат, наиболее вероятно, искомому ферменту. В обеих полосах идентифицирован катепсин В крысы, по оценкам программы Mascot рейтинг (score) составил 107 и 86 для верхней и нижней полос, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о том, что «кислая» DEVDазная активность в мозге принадлежит катепсину В.

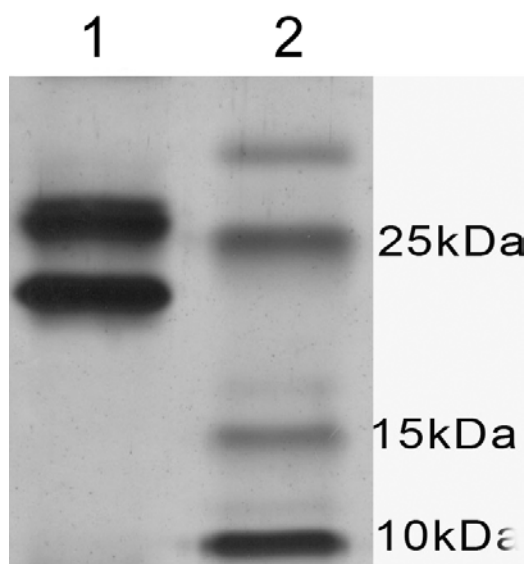


Рис. 21. Ds-Na-ПААГ-электрофорез фракции, содержащей DEVDазную активность; окраска нитратом серебра. 1 – очищенный фермент из мозга крысы, 2 – маркеры молекулярной массы.

Фермент, обладающий «кислой» DEVDазной активностью, также способен к расщеплению субстрата катепсина В при pH 4.0 (рис. 22), более того, и DEVDазная, и катепсиновая активность этой протеазы ингибируется и ингибитором каспазы-3 Ас-DEVD-СНО, и ингибитором катепсина СА-074. При этом при pH 7.5 фермент из выделенной фракции не расщепляет субстрат каспазы-3 Ас-DEVD-АМС (данные не представлены). Эти

результаты подтверждают заключение о том, что «кислая» DEVDаза и катепсин В в мозге являются одним и тем же ферментом.

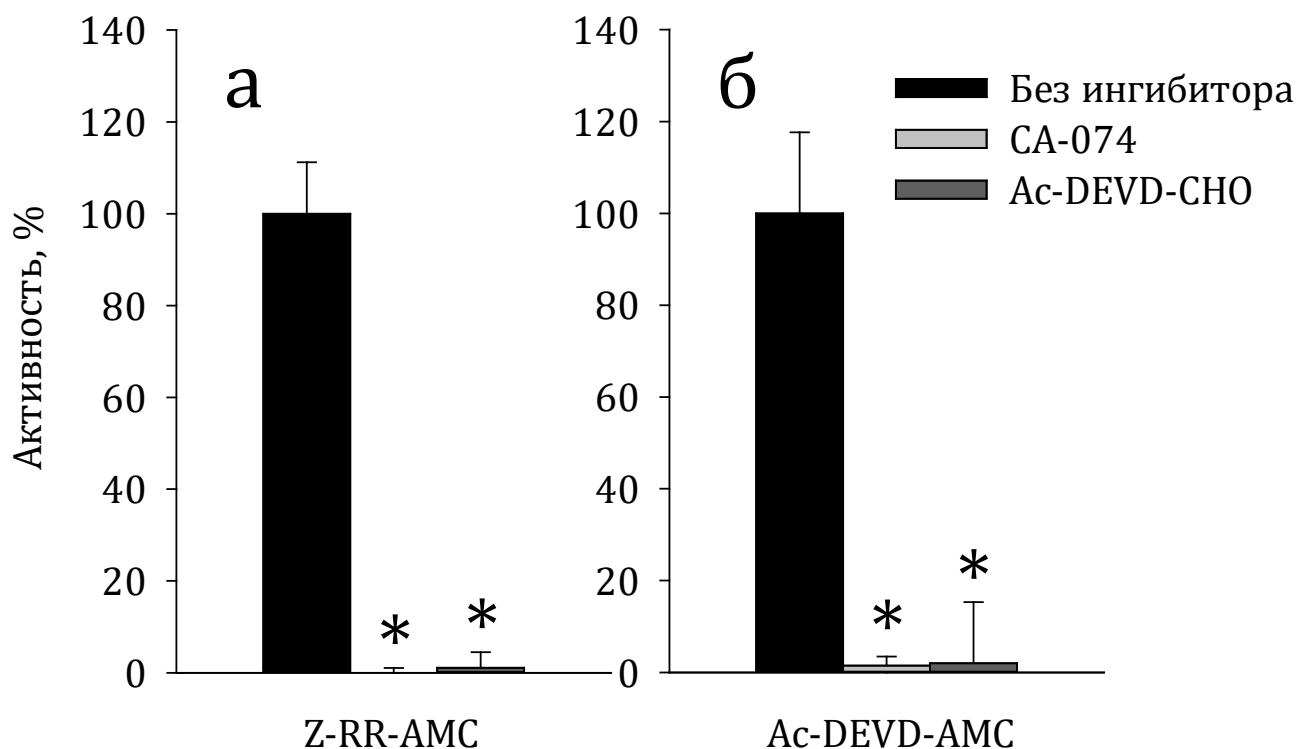


Рис. 22. Оценка способности выделенной фракции к расщеплению субстратов катепсина В и каспазы-3 при рН 4,0 и ингибирование этих активностей специфическими ингибиторами данных протеаз. \* -  $p < 0.05$ .

Дальнейшие исследования показали, что катепсин В является не единственной протеазой, способной расщеплять субстрат каспазы-3 при кислых значениях рН. Проведенная нами ионообменная хроматография показывает, что субстрат каспазы-3 при кислых значениях рН могут расщеплять как минимум две различных протеазы (рис. 23а, фракция 8 и фракция 22). Обычная каспаза локализована в 22 фракции (рис. 23б). При этом один из пиков активности протеасомы по отношению к своему субстрату приходится также на 22 фракцию (рис. 23в).



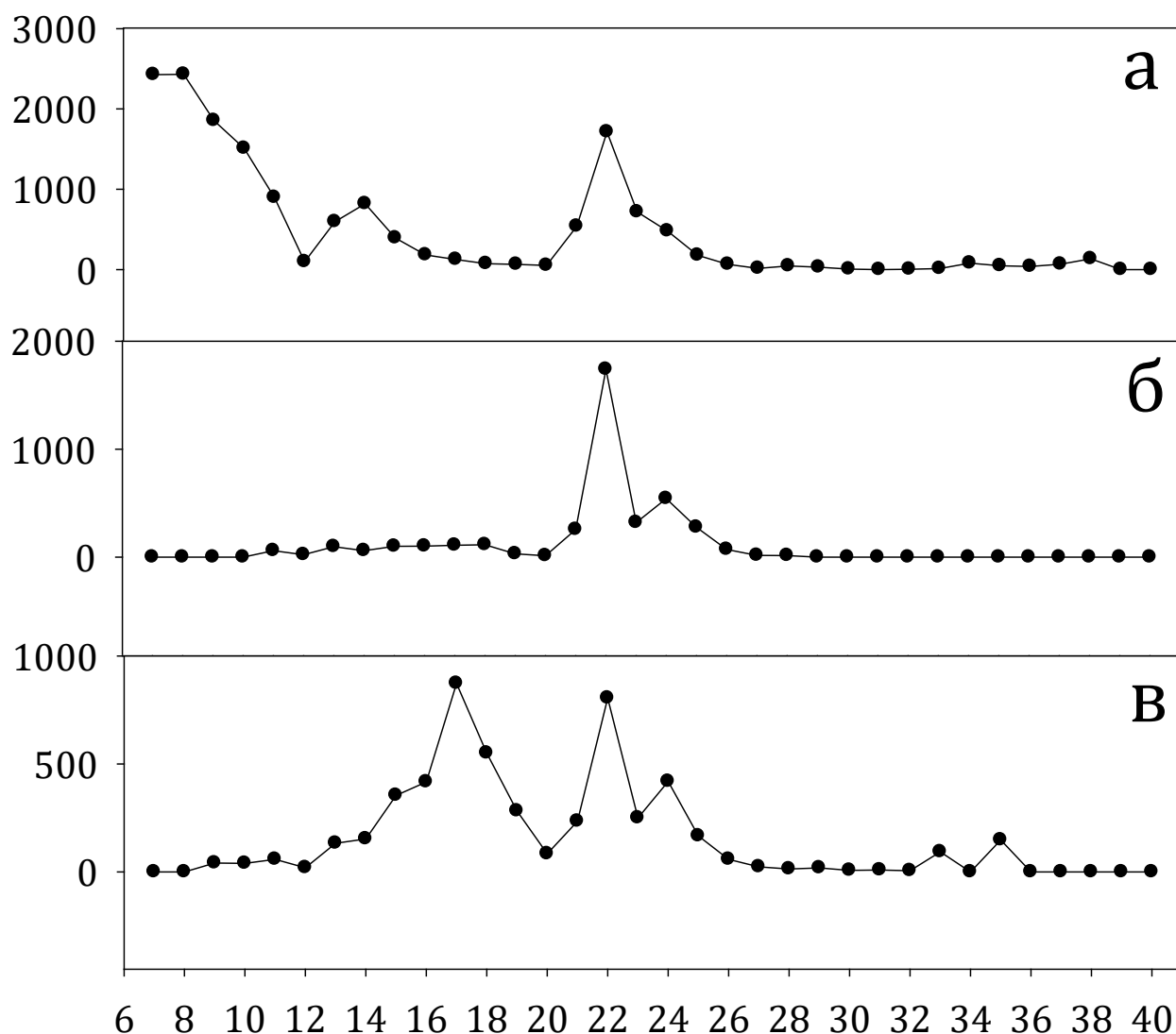


Рис. 23. Активность протеаз,  $\mu\text{моль}/\text{мин}/\text{мг}$  белка, во фракциях после ионообменной хроматографии, а – DEVDазная активность при pH 4.5, б – DEVDазная активность при pH 7.5, в – активность протеасомы. По оси абсцисс номер фракции.

Анализ с помощью Вестерн блоттинга показывает, что в 22 фракции именно протеасома (рис. 24а). Интересно, что часть DEVDазной активности при кислых pH может быть связана с какой-то неизвестной изоформой самой каспазы-3, так как 13 и 14 фракции окрашиваются антителами на каспазу-3 (рис. 23а и рис. 24б, фракции 13 и 14). Часть DEVDазной активности при кислых pH

связана, как мы говорили ранее, с катепсином В, мы предполагаем, что это активность во фракциях 8 и 9 (рис. 23а). Активность собственно каспазы-3 сосредоточена, в основном, во фракции 22, там же каспаза-3 выявляется иммунологически (рис. 23б и рис. 24б).

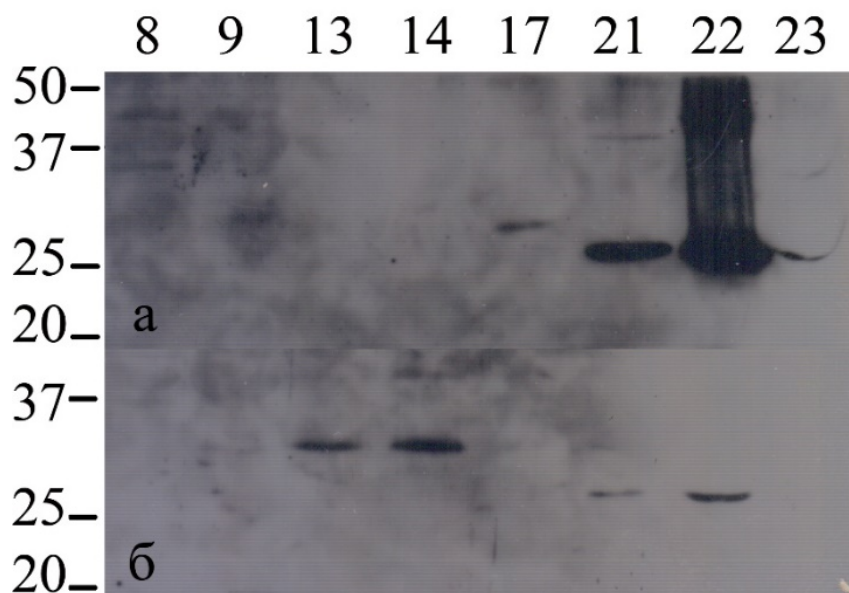


Рис. 24. Вестерн блоттинг некоторых фракций после ионообменной хроматографии, а – окрашивание антителами к альфа5 субъединице протеасомы, б – окрашивание антителами к каспазе-3. Слева маркеры молекулярной массы, кДа.

Распределение активностей по фракциям после гель-фильтрации представлено на рис. 25. Так же, как и при ионообменной хроматографии, активность по отношению к субстрату каспазы-3 в кислых условиях проявляет несколько протеаз (рис. 25а, фракции 10 и 20). Сама каспаза, по крайней мере, отчасти, локализована в 10 фракции (рис. 25б). Во фракции 10 кроме кислой DEVDазной активности также есть и протеасомная активность (рис. 25в). В этой же фракции по результатам Вестерн блоттинга находится протеасома (рис. 26). Фракция 10 после гель-фильтрации содержит самые крупные молекулы из образца, при калибровке в этой фракции выходит голубой декстран с массой около 2 000 кДа. Таким образом, нативная

протеасома, масса которой как раз около 2 000 кДа, должна выходить именно в этой фракции.

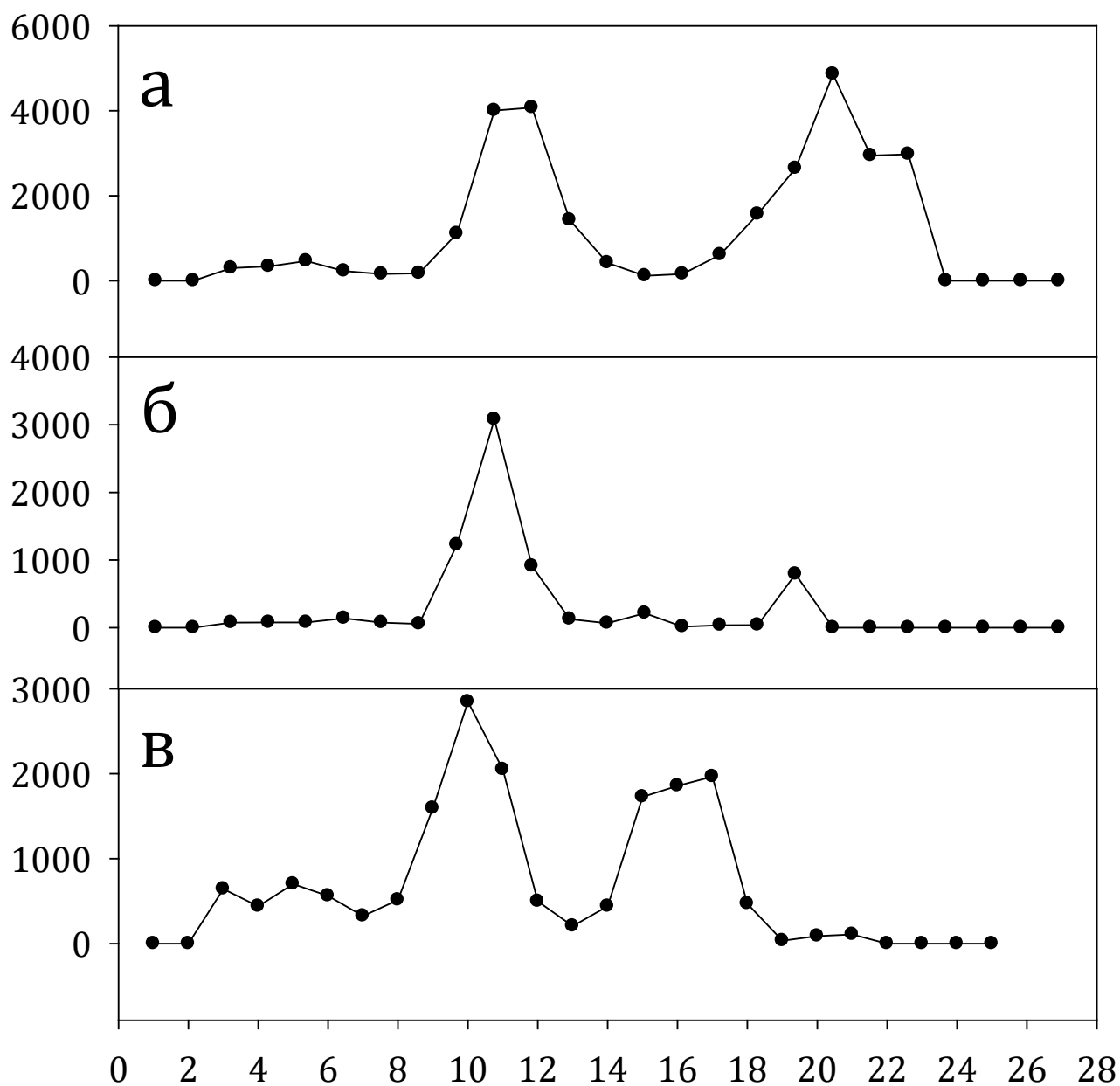


Рис. 25. Активность протеаз, пмоль/мин/мг белка, во фракциях после гель-фильтрации, а – DEVDазная активность при pH 4.5, б – DEVDазная активность при pH 7.5, в – активность протеасомы. По оси абсцисс номер фракции.

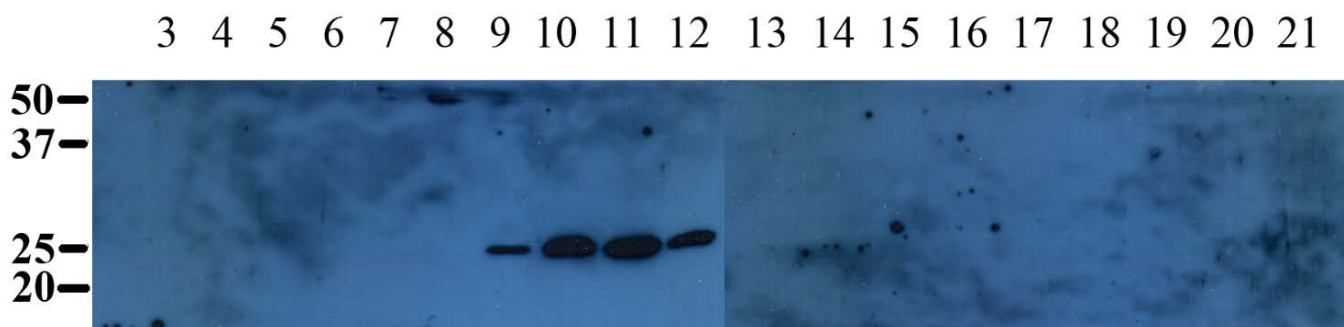


Рис. 26. Вестерн блоттинг фракций после гель-фильтрации, окрашивание антителами к альфа5 субъединице протеасомы. Слева маркеры молекулярной массы, кДа.

Таким образом, мы продемонстрировали, что катепсин В из мозга крысы способен расщеплять синтетический пептидный субстрат каспазы-3. Пептидазная активность катепсина В по отношению к этому субстрату проявляется при значении рН 4,0 и полностью ингибируется специфическим ингибитором каспазы-3 Ас-DEVD-СНО. Однако этот фермент не расщепляет субстрат каспазы-3 при нейтральных значениях рН. Остается неизвестным, может ли катепсин В расщеплять природные субстраты каспазы-3 внутри клетки. Тем не менее, известно, что при некоторых физиологических и патологических состояниях в клетке или в части ее компартментов происходит существенное изменение рН. Хорошо известно, что при ишемии головного мозга происходит значительное закисление нейронов и глии (Lipton, 1999). В зависимости от условий экспериментальной ишемии рН клеток может упасть до 6, а в некоторых клеточных компартментах и ниже, и практически во всех моделях ишемии на животных рН клеток мозга падает ниже 7 (Lipton, 1999).

Активация каспазы-3 и последующая апоптотическая клеточная гибель при ишемии в настоящее время не вызывает сомнений (Hengartner, 2000; Schwab et al, 2002). Тем более интересно, что при ишемии в нейронах может происходить одновременный запуск апоптотической программы с участием каспазы-3 и некротического сценария гибели с участием лизосомального

катепсина В (Unal-Cevik et al, 2004). В этой экспериментальной модели нарушается лизосомальная мембрана с последующим выходом катепсина В в цитоплазму и происходит внутриклеточное накопление каспазо-специфичных продуктов протеолитической деградации белков (Unal-Cevik et al, 2004).

Мы предполагаем, что в такой патологической ситуации как ишемия, катепсин В может принимать участие в расщеплении субстратов каспазы-3. В целом мы можем обрисовать предположительный сценарий развития нейрональной гибели при ишемии. При недостатке кислорода и глюкозы нейроны запускают программу апоптотической гибели с участием каспазы-3. Затем, при продолжительном недостатке питательных веществ, начинается закисление внутриклеточного содержимого нейронов, нарушение лизосомальной мембраны и выход катепсина В в цитоплазму. После этого катепсин В расщепляет внутриклеточные субстраты каспазы-3, усиливая степень повреждения нейронов при ишемии. При достаточной продолжительности ишемии в процессы повреждения нейронов включаются другие протеазы, расщепляющие другой набор субстратов, и гибель нейронов теряет черты апоптоза и становится некротической.

Нарушение целостности лизосомальной мембраны происходит не только при ишемии. В частности, на разных типах клеток показано нарушение лизосомальной мембраны и выход лизосомального содержимого в цитоплазму при окислительном стрессе (Blomgran et al, 2007; Castino et al, 2007; van Nierop et al, 2006). Как правило, выход лизосомального содержимого в цитоплазму приводит к клеточной гибели. Также показано, что окислительный стресс может вызывать снижение внутриклеточного рН (Clement et al, 1998). Таким образом, при окислительном стрессе катепсин В может выходить из лизосом в цитоплазму, где уже произошло снижение рН, и расщеплять цитоплазматические белки, в том числе, возможно, субстраты каспазы-3.

В настоящее время нет свидетельств того, что катепсин В расщепляет внутриклеточные субстраты каспазы-3, более того, не до конца понятно, какие следствия для функционирования клетки может иметь такое расщепление. Но, принимая во внимание результаты нашей работы и данные литературы, можно предположить, что субстратная специфичность двух протеаз лежит в основе одного из механизмов переключения между апоптотической и некротической программами гибели клеток.

Еще одним результатом работы является установление факта, что в мозге есть фермент, способный расщеплять субстрат каспазы-3 Ac-DEVD-AMC при значении pH 4.5, отличный от катепсина В. По результатам гель-фильтрации этот фермент имеет массу больше мегadalтона. По результатам ионообменной хроматографии и гель-фильтрации фракция с этим ферментом расщепляет субстрат протеасомы и окрашивается антителами к альфа5 субъединице протеасомы. По всем изложенным фактам мы делаем заключение, что протеасома также обладает кислой DEVDазной активностью.

### **Секреция протеазы, обладающей DEVDазной активностью**

Важным также остается вопрос о наличии в мозге секретлируемых протеиназ. Катепсины, в том числе и катепсин В, принимают участие в расщеплении белков внеклеточного матрикса (Buck et al, 1992), и секреция катепсинов может способствовать миграции клеток (Kawada et al, 1997). Показано, что клетки микроглии при активации могут секретировать катепсин В (Kingham & Rosock, 2001; Ryan et al, 1995). Неизвестно, обладают ли способностью секретировать катепсин В астроциты и нейроны. Тем не менее внутриклеточная локализация катепсина В в нейронах гиппокампа свидетельствует о его внелизосомальном распределении в теле клетки и дендритах, преимущественно в синапсах, а также частично в постсинаптическом пространстве (Graber et al, 2004). Более того,

секреторные везикулы нейронов содержат катепсины В и L, которые принимают участие в процессинге нейропептидов и  $\beta$ -амилоида (Hook et al, 2012). Целью нашей дальнейшей работы было выяснение возможности секреции катепсина В первичными нейроглиальными и глиальными культурами клеток мозжечка крыс, в частности, в неблагоприятных условиях, таких как ишемия/реоксигенация.

Расщепление субстрата каспазы-3 Ac-DEVD-AMC лизатами нейроглиальных культур значительно усиливается с уменьшением pH среды инкубации и достигает максимума при pH 4.0 (рис. 27а). Специфический ингибитор каспазы-3 Ac-DEVD-CHO эффективно блокирует расщепление субстрата каспазы-3 при pH 7.4 и pH 4.0. Расщепление Ac-DEVD-AMC при pH 7.4 в солевом растворе от нейроглиальных культур увеличивалось с длительностью инкубации монослоя клеток (рис. 27б). При pH 4.5 расщепление субстрата проходило интенсивнее и осуществлялось практически с одинаковой скоростью, начиная с первого часа инкубации культур в солевом растворе (рис. 27б). При этом гибель клеток, которая характеризовалась выходом ЛДГ в солевой раствор, в течение 0.5-5 ч была в пределах 2% потенциально возможной при лизисе клеток 1%-ным нонидетом и усиливалась к 10 ч инкубации (рис. 27б).

Интенсивность расщепления Ac-DEVD-AMC при pH 7.4 в солевом растворе от глиальных культур была максимальной через 1 и 3 ч инкубации в нем клеток. Более интенсивное расщепление субстрата при pH 4.5 также изменялось во времени. Выход ЛДГ в солевой раствор в течение 10 ч инкубации оставался одинаковым. Поскольку внутриклеточная Ac-DEVD-расщепляющая активность нейроглиальных и глиальных культур достоверно не изменялась в течение 10 ч инкубации в солевом растворе, данные не представлены.

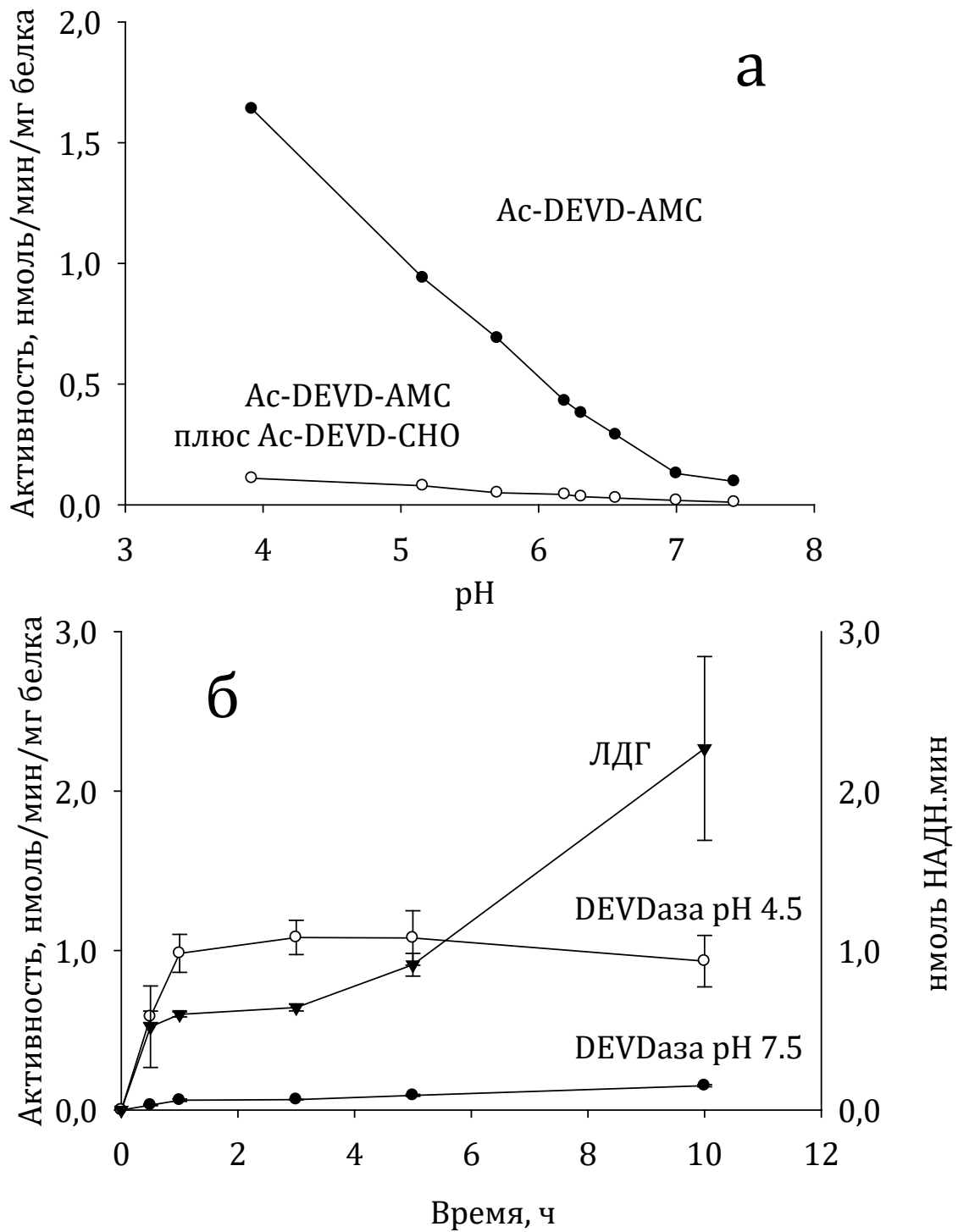


Рис. 27. а) Зависимость расщепления субстрата каспазы-3 Ac-DEVD-AMC от рН лизатами нейронов мозжечка без ингибитора и с добавлением специфического ингибитора каспазы-3 Ac-DEVD-CHO, б) Расщепление субстрата каспазы-3 Ac-DEVD-AMC в культуральной среде (BSS) нейронов мозжечка при рН 7.5 и рН 4.5 и активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ).



Сравнение DEVD-расщепляющей активности через 1 ч инкубации нейроглиальных культур в солевом растворе выявило достоверное превышение удельной активности при pH 4.5 в солевом растворе по сравнению с лизатом клеток и одинаковую по уровню удельную вне- и внутриклеточную активность в случае глиальных культур.

Инкубация нейроглиальных культур в течение 24 ч в присутствии различных концентраций проникающего в клетки ингибитора каспазы-3 FK010 (Z-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-FMK) при концентрациях 2-50 мкМ ингибирует на 60-71% DEVDазную активность лизатов клеток при pH 7.4 (рис. 28) и имеет более выраженный дозозависимый характер блокирования при этих концентрациях при pH 4.5 (32-87%) (рис. 28). Ингибитор катепсинов, преимущественно катепсина В, FK029 (Z-Phe-Ala-FMK) в меньшей степени снижал DEVDазную активность лизатов клеток при pH 7.4 (19-41%) (рис. 28), тогда как при pH 4.5 расщепление субстрата блокировал практически полностью (рис. 28).

Ингибитор каспазы-3 Ac-DEVD-CHO (5 мкМ) одинаково эффективно блокировал расщепление Ac-DEVD-AMC (50 мкМ) соевым раствором от глиальных культур при pH 7.4 и 4.5, а ингибитор катепсина В CA074 (5 мкМ) достоверно препятствовал расщеплению этого субстрата только при pH 4.5 (рис. 29). Расщепление субстрата катепсина В Z-RR-AMC (50 мкМ) при pH 7.4 происходило более интенсивно, чем при pH 4.5, и не зависело от присутствия Ac-DEVD-CHO (5 мкМ) при pH 7.4, но полностью блокировалось Ac-DEVD-CHO при pH 4.5. CA074 (5 мкМ) эффективно блокировал расщепление субстрата катепсина В Z-RR-AMC как при pH 7.4, так и при pH 4.5 (рис. 29).

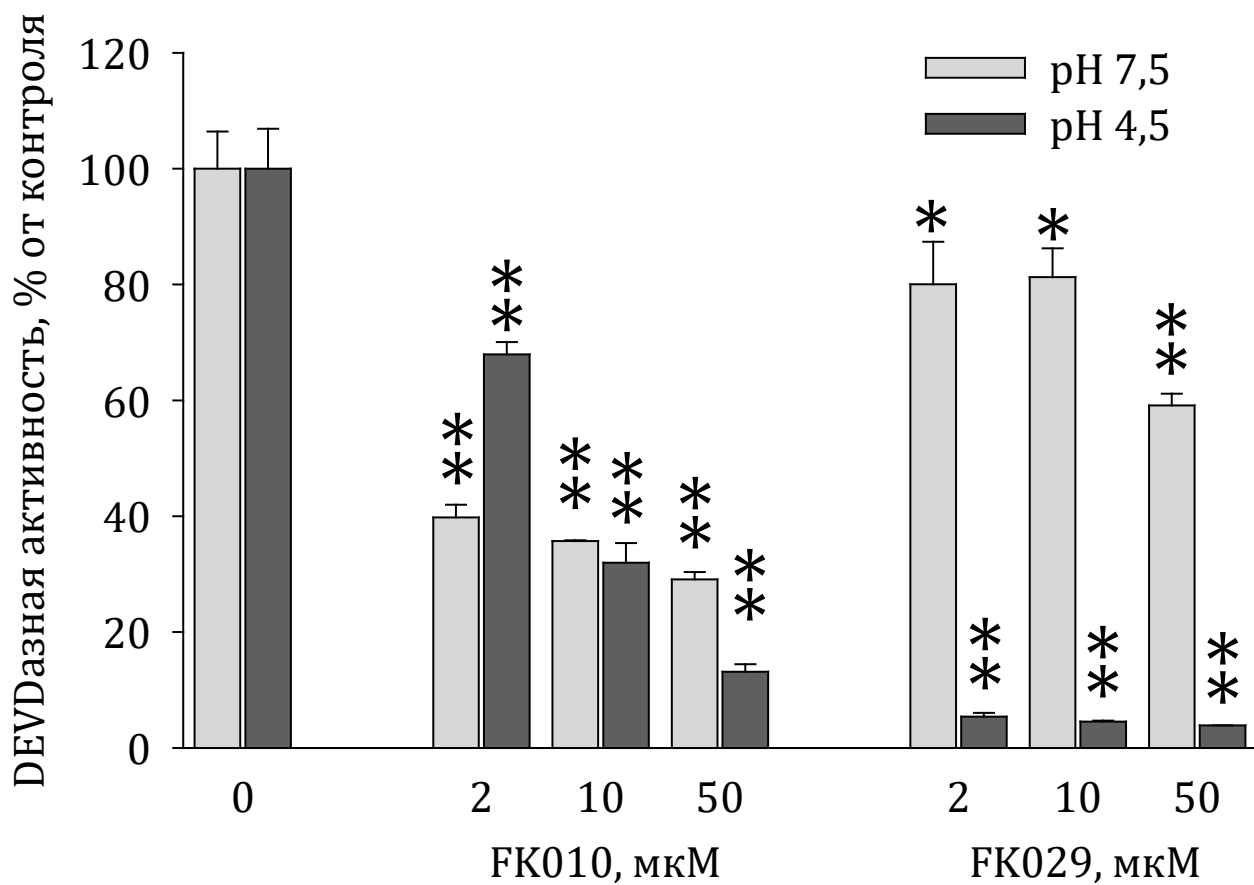


Рис. 28. DEVDазная активность лизатов нейронов мозжечка после инкубации клеток 24 часа в присутствии ингибитора каспазы-3 или ингибитора катепсина В при двух значениях pH, \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ . FK010 – специфический ингибитор каспазы-3, FK029 – специфический ингибитор катепсина В.

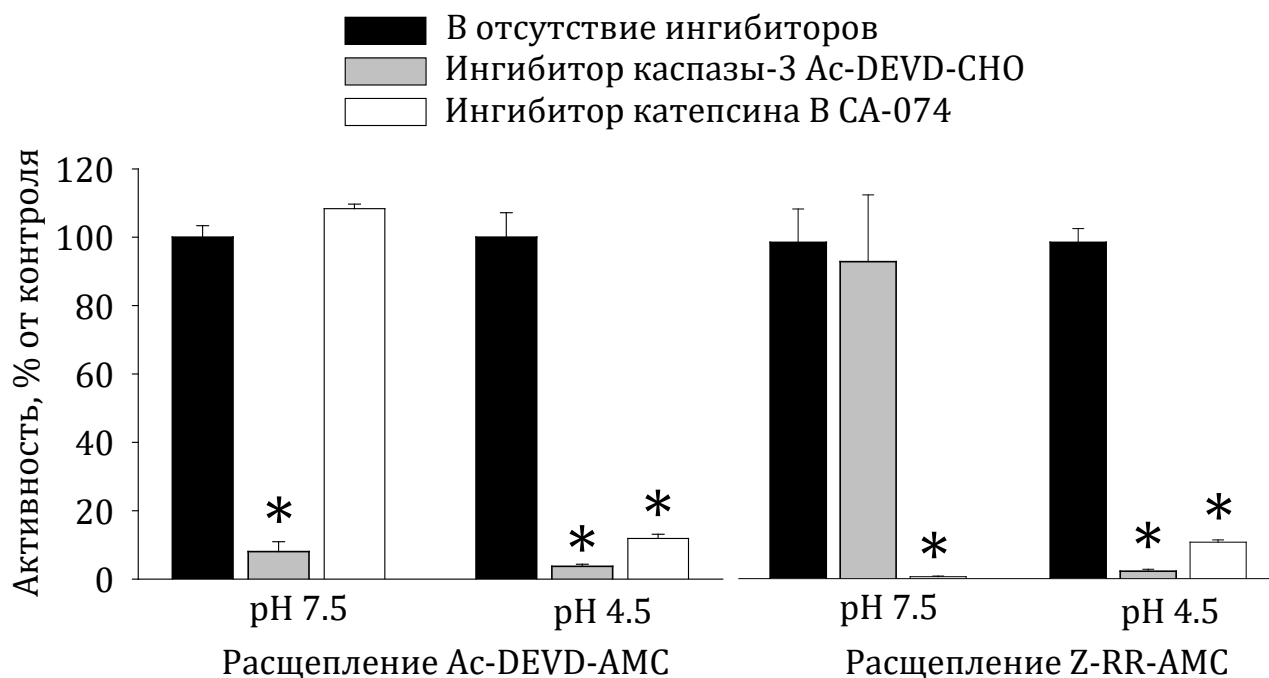


Рис. 29. Расщепление субстратов каспазы-3 и катепсина В культуральной средой от нейронов мозжечка при двух значениях pH в присутствии ингибиторов этих ферментов, \* -  $p < 0.01$ .

### Идентификация секретируемой протеазы

Мы выяснили, что клетки-зерна мозжечка могут секретировать катепсин В при депривации трофических факторов (Онуфриев М.В. et al, 2009). Однако неизвестно, какие еще протеазы могут секретировать нейроны в разных физиологических состояниях, в том числе, неблагоприятных для этих клеток. Мы предприняли попытку идентифицировать секретируемые нейронами протеазы. Идентификацию секретируемых протеаз производили в культуральной жидкости, собранной с первичных культур клеток-зерен. Для установления спектра протеолитических активностей, присутствующих в культуральной среде при обработке клеток глутаматом в BSS, изучали расщепление субстратов различных протеаз в культуральной среде при различных значениях pH. В исследованных условиях не было обнаружено

активности каспазы 3 (субстрат Ac-DEVD-AMC), калпаина (субстрат Suc-LY-AMC) и химотрипсина (субстрат Suc-LLVY-AMC) при значениях pH, соответствующих оптимальным для данных ферментов. Однако были обнаружены две протеолитические активности со специфичностью к субстрату Z-RR-AMC при pH 7.5 и pH 6.0. Из данных литературы следует, что подобную активность при pH 7.5 может иметь трипсин, а при pH 6.0 катепсин В. Для идентификации протеазы исследовали влияние ингибиторов катепсина В и трипсина на расщепление субстрата Z-RR-AMC при pH 7.5 и pH 6.0. Ни общий ингибитор сериновых протеаз PMSF (1 мМ), ни специфический ингибитор трипсина апротинин (10 мкг/мл) не подавляли протеолитическую активность при pH 7,5 (рис. 30). Окисленный глутатион (10 мМ) игибировал протеолитическую активность при pH 6.0 ( $p < 0.01$ ) не менее чем на 80 процентов, а специфический ингибитор катепсина В CA074 (10 мкМ) полностью ее подавлял (рис. 30). На основании этих данных мы считаем, что активность при pH 7.5 принадлежит не трипсину, а катепсину В, активность которого была подавлена неоптимальной для него кислотностью среды. Таким образом, клетки первичных культур клеток-зерен мозжечка секретируют в культуральную среду именно катепсин В.

Интенсивности расщепления субстрата каспазы-3 Ac-DEVD-AMC активной формой катепсина В были практически одинаковыми при pH 7.4 и 6.0 (рис. 30). Однако снижение pH до 4.5 более чем в 2 раза увеличило эту активность. Ингибитор каспазы-3 Ac-DEVD-CHO не влиял на расщепление Ac-DEVD-AMC при pH 7.4 и 6.0, но полностью подавлял его при pH 4.5. Достоверное снижение расщепления Ac-DEVD-AMC в присутствии ингибитора катепсина В CA074 происходило при pH 6.0 и 4.5. Протеолиз субстрата катепсина В Z-RR-AMC очищенным катепсином В при pH 7.4 и 6.0 практически на порядок превышал расщепление Ac-DEVD-AMC (рис. 29) с максимумом при pH 6.0. Эффективность блокирующего действия Ac-DEVD-CHO достоверно усиливалась, начиная с pH 6.0, в то время как ингибитор

катепсина В CA074 достоверно препятствовал расщеплению субстрата при всех значениях рН.

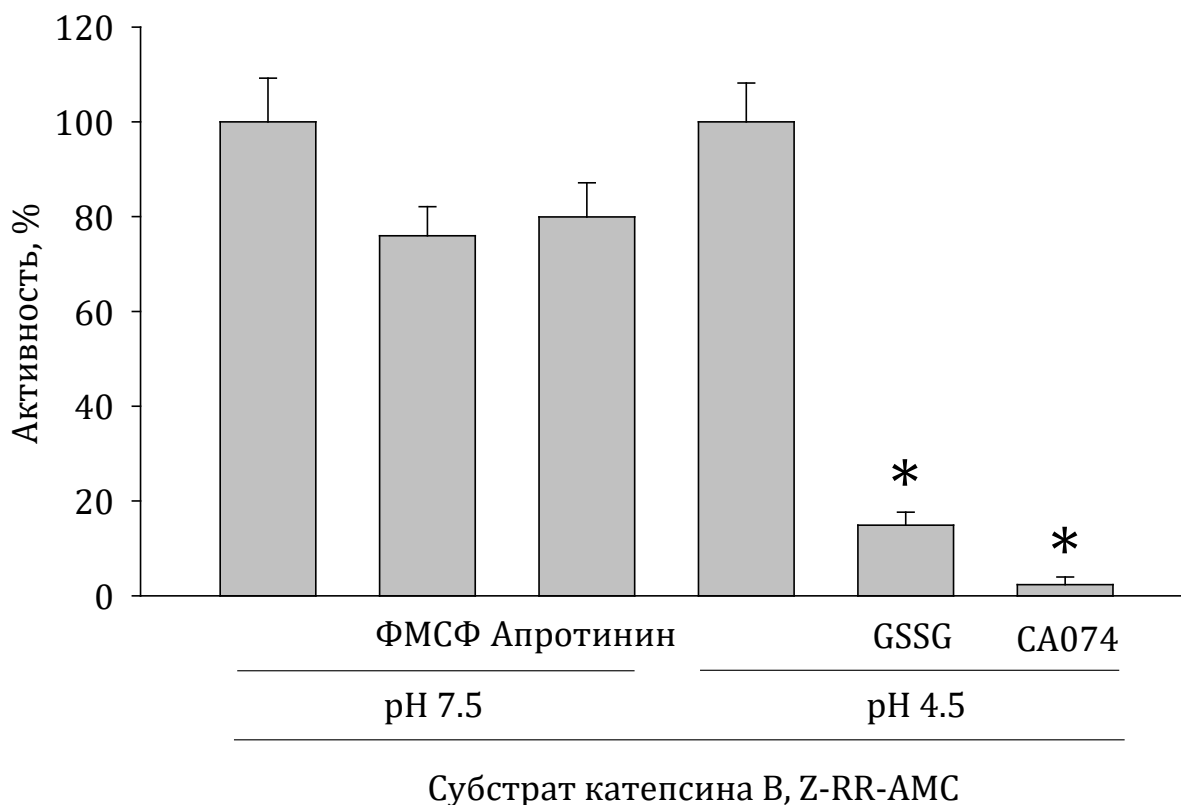


Рис. 30. Расщепление субстрата катепсина В культуральной средой от нейронов мозжечка при двух значениях рН в присутствии ингибиторов трипсина и катепсина В, \* -  $p < 0.01$ .

В результате кислородно-глюкозной депривации (КГД) нейроглиальных культур DEVD-расщепляющая активность в солевом растворе достоверно превышала контрольные значения на  $23.3 \pm 7.9\%$  при рН 7.4 (рис. 32), тогда как при рН 4.5 достоверно понизилась до  $30.6 \pm 2.1\%$ . Похожее по степени снижение наблюдалось и в случае расщепления субстрата катепсина В Z-RR-AMC при рН 6.0 (рис. 32). В период реоксигенации достоверное снижение протеолитической активности наблюдалось только при расщеплении Ac-DEVD-AMC и через 3 ч

реоксигенации составляло  $68.5 \pm 10.2\%$  активности в солевом растворе от контрольной группы клеток.

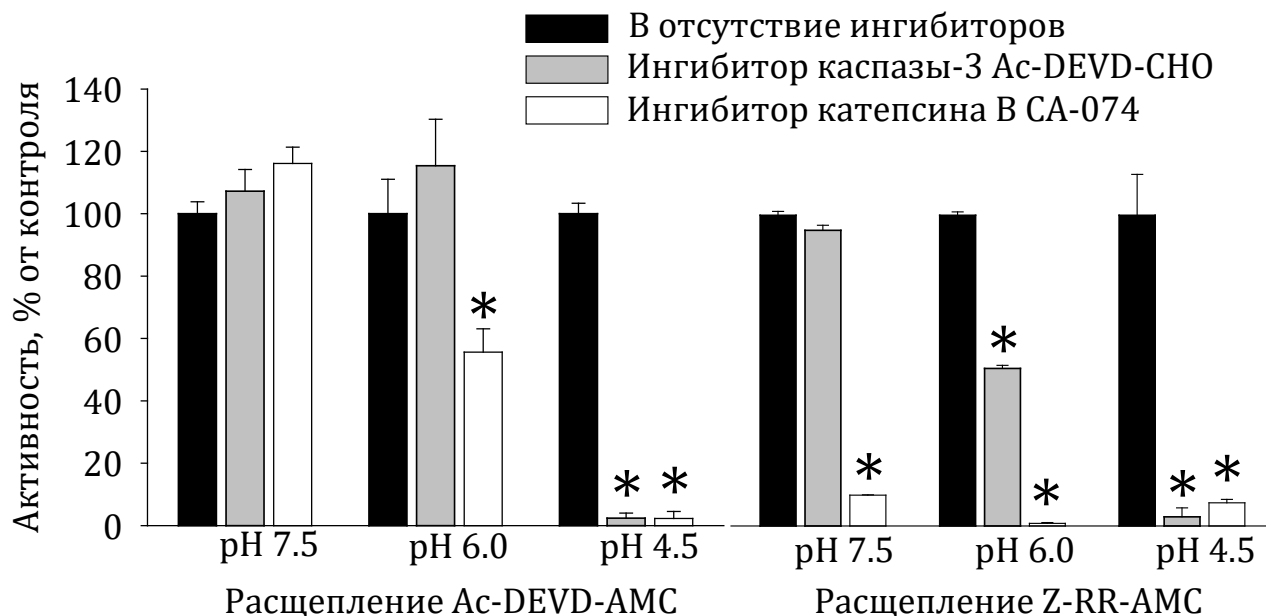


Рис. 31. Расщепление субстратов каспазы-3 и катепсина В катепсином В из коммерческого источника (селезенка быка), \* -  $p < 0.01$ .

Выход в солевой раствор ЛДГ повысился до  $9.5 \pm 1.0\%$  внутриклеточной активности во время ишемии, а через 3 и 5 ч реоксигенации достоверно превышал контрольный уровень ( $5.8 \pm 1.2\%$  и  $3.5 \pm 0.5\%$  соответственно) (рис. 32).

В следующих экспериментах по изучению секреции протеаз во внеклеточную среду, мы показали, что неблагоприятные условия (депривация трофических факторов и депривация трофических факторов и глюкозы) вызывают секрецию катепсина В (Yakovlev et al, 2013a). В первые часы после помещения нейронов в обедненный раствор не происходит усиления клеточной гибели (данные не представлены), но в то же время происходит накопление катепсина В во внеклеточной среде (рис. 33). Возможно, секреция катепсина В является адаптивной реакцией клетки и способствует дальнейшему выживанию (Yakovlev & Gulyaeva, 2015).

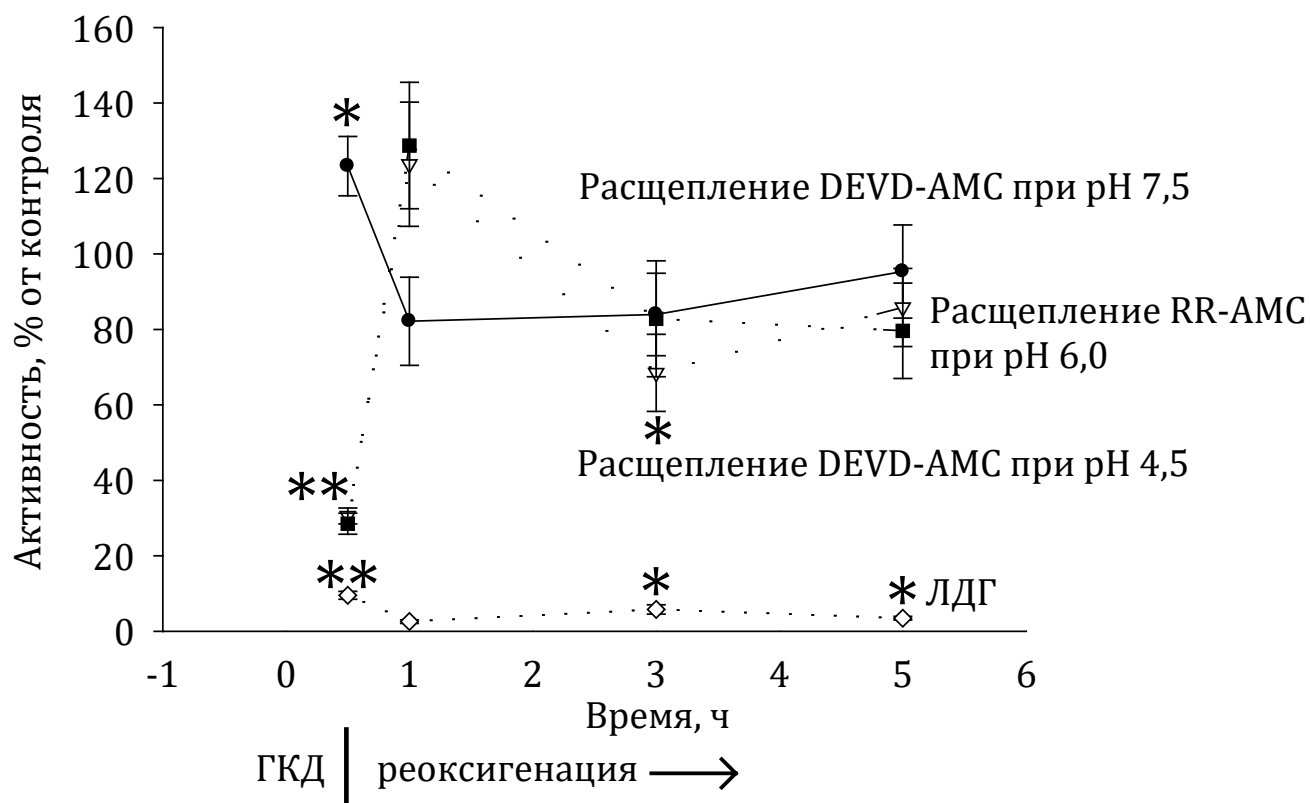


Рис. 32. Расщепление субстрата каспазы-3 при двух pH и катепсина В в культуральной среде, а также выход ЛДГ из нейронов мозжечка при ГКД/реоксигенации, \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ .

Согласно данным литературы (Obrenovitch, 2008), preconditioning повышает устойчивость клеток к неблагоприятным условиям среды. Из этого в свою очередь следует предположение, что секреция катепсина В является попыткой клетки адаптироваться к неблагоприятным условиям среды (и после preconditioning механизмы адаптации уже запущены и в секреции нет необходимости).

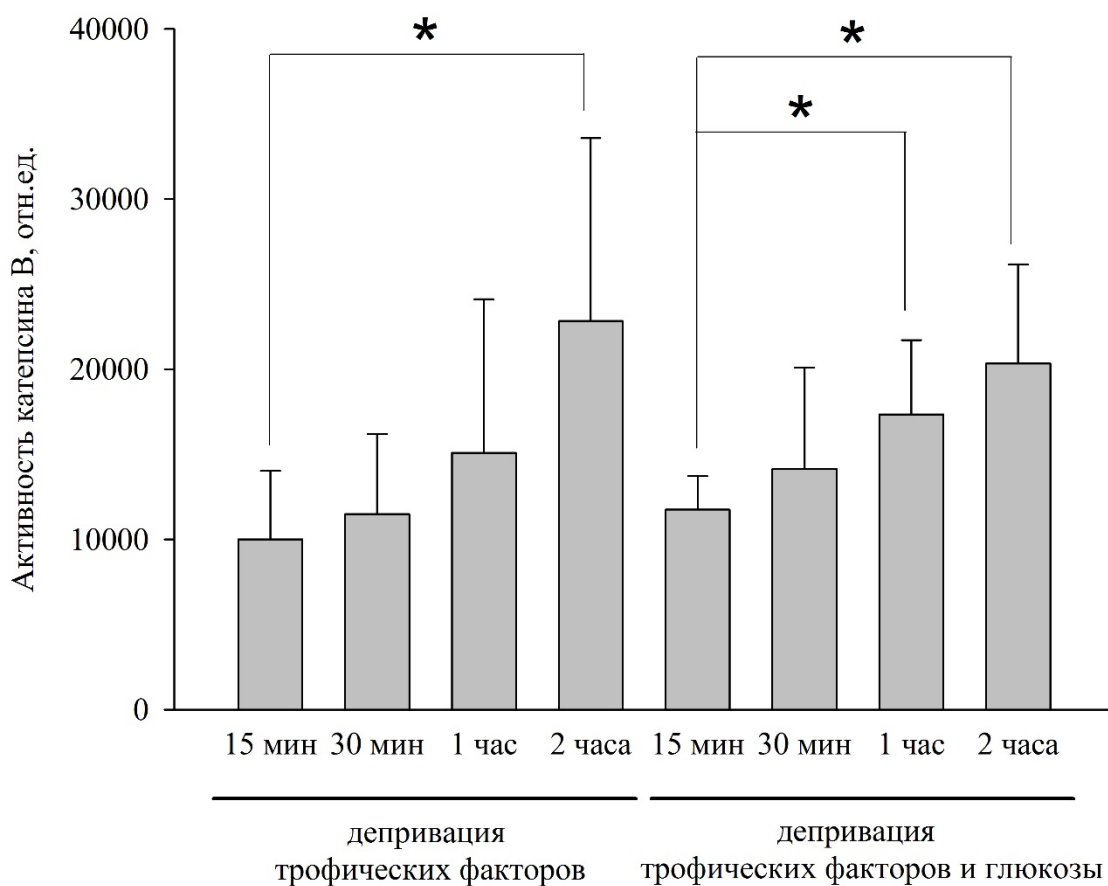


Рис. 33. Активность катепсина В в экстраклеточной жидкости от нейрональных культур после прекоондиционирования. Нейроны подвергали депривации трофических факторов или депривации трофических факторов и глюкозы на разные сроки, после чего возвращали в питательную среду, а экстраклеточную жидкость собирали и определяли в ней активность ферментов. \* -  $p < 0.05$  по тесту Манна-Уитни в сравнении с соответствующим контролем.

Вероятными мишенями катепсина В могут быть молекулы внеклеточного матрикса, перестройка которого начинается в условиях голодания клеток для обеспечения ангиогенеза. Кроме того, возможной мишенью катепсина В могут быть и рецепторы PAR2, активация которых на нейронах повышает устойчивость клеток к неблагоприятным условиям



среды (Afkhani-Goli et al, 2007). В литературе такая возможность не рассматривается, хотя катепсин В и трипсин имеют очень близкую субстратную специфичность. Катепсин В, как правило, не рассматривают в качестве фермента, в щелочных условиях расщепляющего пептидную связь после остатка аргинина, так как считается, что в этих условиях фермент необратимо денатурирует (Khan et al, 1992). Однако, в своих работах мы показываем, что при слабощелочных значениях рН катепсин В сохраняет заметную активность по отношению к этой пептидной связи. Более того, теоретический анализ специфичности катепсина В с помощью специальной программы выявляет сайты расщепления катепсином В именно на PAR2 (Verspurten et al, 2009). Таким образом, мы считаем, что катепсин В ранее напрасно не рассматривали в качестве протеазы, в норме расщепляющей пептидные связи вне клетки. По нашим данным эта протеаза не только переживает слабощелочную среду экстраклеточной жидкости, но и секретируется клеткой в описанных нами условиях.

Мы предприняли попытку охарактеризовать экспрессию рецепторов семейства PAR в нейронах в условиях депривации ростовых факторов (Давыдова О.Н. et al, 2010). С одной стороны, депривация ростовых факторов сама по себе является неблагоприятным воздействием на клетки, с другой, депривация является прекондиционированием к последующим более тяжелым воздействиям, например, глутаматной токсичности. Таким образом, модель депривации ростовых факторов на культуре нейронов позволяет изучать механизмы повреждения нейронов при неблагоприятных условиях среды, а также механизмы выработки устойчивости к таким неблагоприятным условиям, чем в выгодную сторону отличается от многих других моделей патологии в культуре клеток. Кроме того, модель депривации в культуре нейронов имеет высокую степень сходства с рядом моделей патологии мозга *in vivo*.

В эксперименте на культуре клеток мы показали наличие экспрессии мРНК всех 4 типов протеазных рецепторов, с преимущественной экспрессией рецептора PAR1 как в нейроно-глиальных, так и глиальных культурах. Сравнение сестринских культур показало, что уровень транскрипта PAR2 в глиальных культурах был на порядок выше, чем в нейроно-глиальных (данные не представлены). Кроме того, депривация ростовых факторов приводит к специфическому повышению уровня мРНК трипсинового рецептора, PAR2. Мы предполагаем, что данное воздействие является мощным стимулирующим фактором, запускающим в клетке адаптивные сигнальные каскады, и регуляция уровня данного рецептора является одной из составляющих этого процесса. Более того, если через сутки после депривации ростовых факторов индуцировать в нейронах глутаматную токсичность, то предварительно депривированные нейроны выживают значительно лучше. Мы предполагаем, что более чем четырехкратное увеличение экспрессии PAR2 непосредственно связано с большей выживаемостью нейронов в ситуации острой глутаматной токсичности. Как раз в такой ситуации, как следует из результатов других наших экспериментов, нейроны секретируют катепсин В, потенциальный агонист PAR2 рецепторов.

С вопросом секреции протеаз тесно связан вопрос о регуляции активности секретируемых протеаз с помощью экстраклеточных ингибиторов протеаз. Известно, что при некоторых заболеваниях из мозга в цереброспинальную жидкость могут попадать протеазы. Мы предположили, что цереброспинальная жидкость пациентов с тяжелыми нейродегенеративными заболеваниями содержит также и ингибиторы протеаз, с помощью этих ингибиторов происходит регуляция активности протеаз в ликворе как в норме, так и при патологии. Оказалось, что ликвор пациентов с боковым амиотрофическим склерозом содержит достоверно больше ингибитора(-ов) катепсина В и калпаина, чем ликвор контрольной

группы (данные не представлены). При этом мы не обнаружили увеличения в ликворе активности ЛДГ, что свидетельствует об отсутствии значимой клеточной гибели. Таким образом, нарушения в работе протеолитических систем имеют отношение и к развитию нейродегенеративных патологий.

Большинство лизосомальных цистеиновых протеиназ, в том числе и катепсин В, нестабильны и малоактивны при нейтральных значениях рН, их оптимум активации находится в кислых условиях (рН 5.5) (Turk et al, 1997). Полученные в работе данные свидетельствуют о том, что при снижении вне- и внутриклеточного рН в мозге возможно расширение спектра протеолитической активности катепсина В. В некоторых ситуациях *in vivo* такие изменения могут иметь функциональное значение. Например, поддержание стабильного значения рН необходимо для нормальной работы нейронов. При физиологических условиях внеклеточный рН в мозге составляет 7.3, в то время как внутриклеточный – 7.0 (Back et al, 2000; Chesler, 1990). Известно, что ишемия мозга сопровождается значительным снижением рН, а дефицит кислорода как результат снижения мозгового кровотока приводит к усилению анаэробного гликолиза и накоплению лактата (Siesjo et al, 1996; Tombaugh & Sapolsky, 1993). При ишемии мозга рН обычно уменьшается до 6.5 в нормогликемических условиях и до 6.0 или ниже при тяжелой форме ишемии или в гипергликемических условиях (Kraig et al, 1985; Nedergaard et al, 1991), причем степень и направленность изменений вне- и внутриклеточного рН не всегда совпадают. Так, при фокальной ишемии у крыс преимущественное снижение внеклеточного рН происходило быстрее снижения внутриклеточного рН в перинфарктной зоне мозга (Nedergaard et al, 1991). Выход катепсина В из лизосом при острой фокальной ишемии мозга в отсутствие реоксигенации свидетельствует о возможной роли катепсина В на ранних этапах формирования зоны инфаркта (Benchoua et al, 2004). В наших экспериментах действие ишемии (кислородно-глюкозной депривации) на нейроглиальные культуры

характеризовалось снижением активности и/или высвобождения в солевой раствор катепсина В до периода реоксигенации и сопровождалось повышением активности каспазы-3 в солевом растворе, что скорее всего было связано с разрушением клеток и увеличением выхода ЛДГ. Снижение активности катепсина В в солевом растворе во время ишемии может быть связано с выходом из разрушенных клеток ингибиторов лизосомальных цистеиновых протеиназ из семейства цистатинов (Chapman et al, 1997).

На рис. 34 представлена предполагаемая схема расщепления каспазных субстратов другими протеазами. В самом начале стоит отметить, что каспазы считаются ферментами, уникальными по распознаваемой и расщепляемой пептидной последовательности. Оказывается в некоторых ситуациях и другие ферменты могут распознавать и расщеплять каспазные субстраты. Согласно нашим результатам ключевым фактором, способствующим переключению других ферментов на расщепление каспазных субстратов является снижение внутриклеточного рН. Так, при слабом стрессовом воздействии нейроны начинают секретировать во внеклеточную среду содержимое лизосом, при этом возможно некоторое закисление экстраклеточного пространства. В такой ситуации субстраты каспазы-3 может расщеплять секретлируемый катепсин В. При более тяжелом повреждении в клетке происходит нарушение целостности мембран лизосом и содержимое лизосом оказывается в цитоплазме. При этом также происходит сильное снижение рН внутри клетки. В такой ситуации субстраты каспазы-3 могут расщеплять и катепсин В, и протеасома. Таким образом, нами впервые описана экспериментальная ситуация, в которой субстраты каспазы-3 расщепляют другие протеазы, а также предложена схема, по которой такое расщепление реализуется в организме.

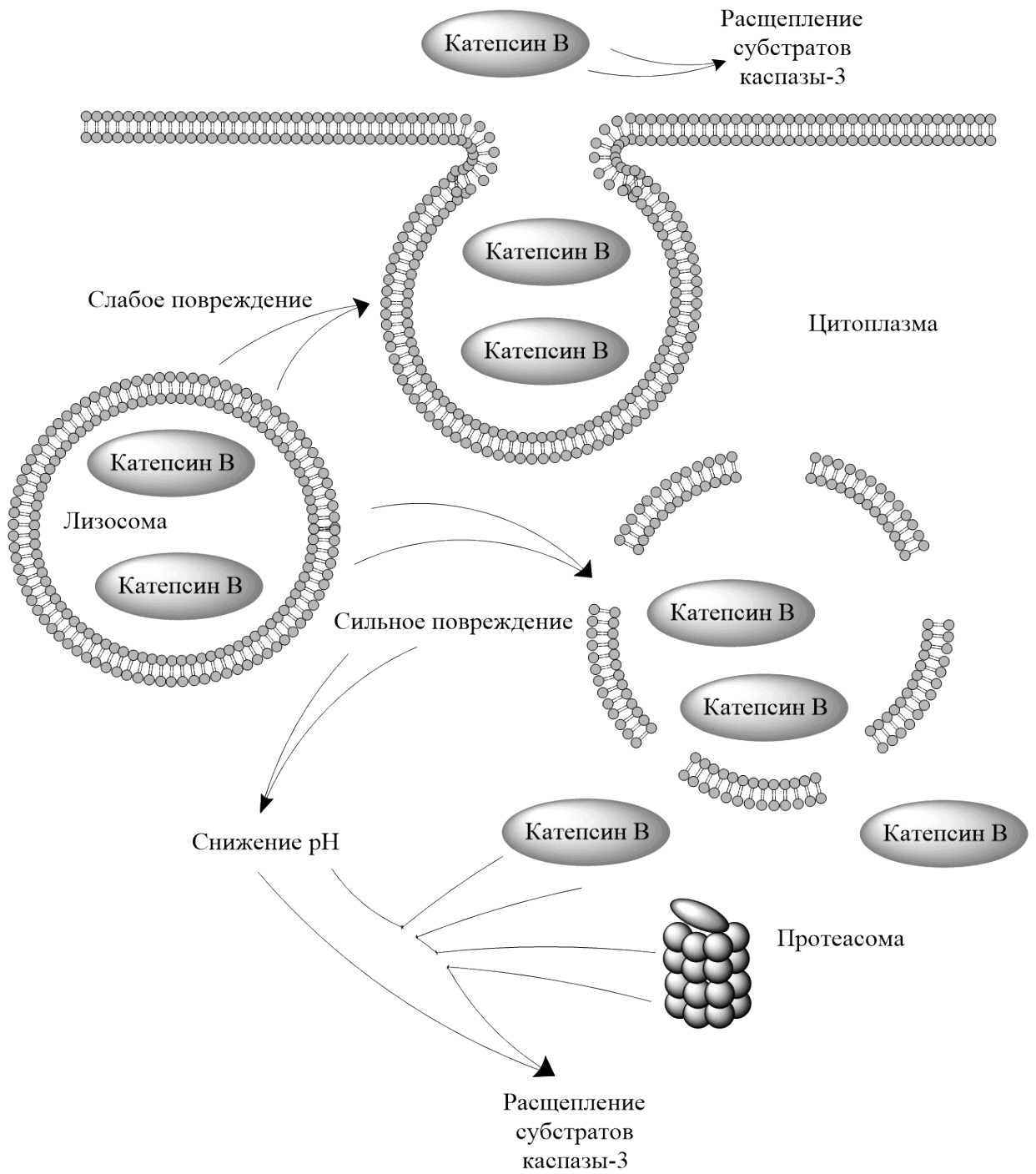


Рис. 34. Расщепление субстратов каспазы-3 другими протеазами.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Регуляция активности каспаз в клетке

Анализ данных литературы и собственных результатов приводят нас к заключению, что апоптотические протеиназы вовлечены в нормальное функционирование головного мозга. При этом механизмы вовлечения этих ферментов в реализацию процессов нормальной нейропластичности остаются практически неизвестными. Мы сформулировали новый подход к анализу механизмов вовлечения протеаз в различные регуляторные каскады в клетке (Yakovlev & Gulyaeva, 2011; 2015). Несколько экспериментальных и теоретических исследований приводят нас к тому, что реальным подходом к изучению функций апоптотических протеиназ, в частности, каспазы-3, является идентификация их субстратов в различных ситуациях. Именно природа расщепленного субстрата определяет направление передачи сигнала или изменения метаболизма, поэтому ключевым исследованием представляется идентификация молекулярных партнеров ферментов, а не измерение их активности, экспрессии соответствующих белков или мРНК. Этот подход позволит подойти к решению фундаментальной задачи исследования механизмов регуляции не только протеиназ, но и других плейотропных ферментов, которые, как правило, являются ферментами с широкой субстратной специфичностью.

В условиях живой клетки определяющим фактором сигнально-метаболических событий становится не столько активность конкретного фермента (тем более что субстратная специфичность перекрывается в существенной степени у ферментов многих семейств), а природа конкретного субстрата. Тот факт, что многие белки в клетке находятся в виде динамических белковых комплексов, подтверждает такое представление, указывая на возможность локальной регуляции сигнально-метаболических путей за счет пространственного приближения к ферменту именно «целевого» субстрата. Все сказанное выше полностью применимо к

различным протеинам, субстратами которых являются практически все белки организма.

Мы предполагаем, что функции каспазы-3 в каждом конкретном случае зависят от молекулярного партнера, взаимодействующего с ферментом в данный момент. Мы, разумеется, не исключаем, что и свойства самого фермента могут различаться в разных физиологических состояниях (Faleiro et al, 1997), но полагаем, что определяющую роль в функции каспазы-3 все же играет ближайшее окружение этого фермента – субстраты, активаторы, ингибиторы. Таким образом, мы считаем, что выявление партнеров каспазы-3 поможет понять механизм регуляции этого фермента в головном мозге.

Результаты о наличии у каспазы-3 внутриклеточных партнеров в ситуациях, не связанных с апоптозом, и, тем более, данные о регуляции этими белками активности каспазы-3 в литературе отсутствуют. В данной работе мы предприняли качественно новую попытку исследования неапоптотических функций каспазы-3 в нервной системе. Мы показали возможность применения кросс-линкеров для выявления партнеров каспазы-3 как в мозге, так и в культуре клеток.

Отвлекаясь от молекулярных механизмов реализации каспазами своих неапоптотических функций, можно сказать, что исследования на клетках различных типов доказали, что каспазы вовлечены в реализацию процессов дифференцировки. При этом механизмы переключения каспаз между апоптотическими и неапоптотическими функциями практически неизвестны. Одним из вероятных механизмов переключения каспаз между разными функциями является расщепление этими ферментами разных субстратов при апоптозе и при дифференцировке. При этом, субстратов, расщепляемых каспазами только при дифференцировке, еще не выявлено, то есть любой из субстратов каспаз при дифференцировке расщепляется и при апоптозе. Специфичным для гибели субстратом каспаз называют PARP, но и при дифференцировке в некоторых типах клеток каспазы расщепляют этот белок

(Zermati et al, 2001). Возможно, специфичный для дифференцировки субстрат каспаз еще не найден, но, что также вероятно, такого специфичного субстрата вообще не существует. В этом случае регуляция каспаз в клетке осуществляется не за счет переключения этих ферментов между разными субстратами.

Еще одним вероятным механизмом переключения каспаз между разными функциями является расщепление одних и тех же субстратов, но с разной интенсивностью при апоптозе и при дифференцировке. Может быть, имеет значение временная последовательность расщепления субстратов, когда расщепляется один белок, а только после него другой, и такая последовательность различается между апоптозом и дифференцировкой. Кроме того, расщепление одного и того же белка может происходить в различных внутриклеточных компартментах.

Примером точной регуляции расщепления субстратов каспазами может служить активация каспазами протеинкиназ. Известно, что каспаза-3 способна активировать некоторые протеинкиназы через отщепление их регуляторного С-концевого домена, или N-концевого домена (Cardone et al, 1997; Widmann et al, 1998). Хорошо известно, что каспазы активируют протеинкиназы семейства p38 MAPK в результате каскада активирующих реакций (Cardone et al, 1997; Frasch et al, 1998; Graves et al, 1998). В свою очередь, киназа p38 принимает участие во множестве внутриклеточных процессов, включая апоптоз и дифференцировку (Zarubin & Han, 2005). При этом какой сценарий будет реализован после активации киназы p38 – апоптоз или дифференцировка – зависит от контекста, в частности от типа клеток (Zarubin & Han, 2005). Некоторые другие активируемые каспазами киназы также способны реализовать и апоптоз, и дифференцировку. В миоцитах активируемая каспазами киназа MST1 способна реализовать или апоптоз, или дифференцировку (Fernando et al, 2002; Graves et al, 1998). Протеинкиназа PKC $\delta$  похожим образом активируется каспазой-3 и



опосредует и дифференцировку, и гибель (Okuyama et al, 2004). Киназа Rho активируется каспазой и также способна к индукции гибели или дифференцировки в клетках разных типов (Gabet et al, 2011; Riento & Ridley, 2003).

Разумеется, среди субстратов каспаз не только протеинкиназы могут определять переключение судьбы клетки между гибелью и дифференцировкой. Транскрипционный фактор Twist является одним из субстратов каспазы-3, и его расщепление может определять дальнейшие события в клетке (Demontis et al, 2006; Miraoui & Marie, 2010). Экспрессия этого транскрипционного фактора блокирует и апоптоз, и дифференцировку, так что расщепление Twist каспазой является необходимым для любого из этих сценариев (Demontis et al, 2006; Miraoui & Marie, 2010).

Таким образом, каспазы способны активироваться и при гибели клеток, и при дифференцировке, расщепляя зачастую один и тот же набор белков. Что же в таком случае определяет судьбу клетки после активации каспаз остается вопросом, на который можно предложить несколько реальных ответов. Самым простым и очевидным является предположение о том, что при дифференцировке каспазы активируется в меньшей степени и на менее продолжительное время. Действительно, для такой точки зрения накоплены некоторые доказательства. Так, при дифференцировке кератиноцитов и моноцитов в цитоплазме этих клеток происходит медленное нарастание концентрации цитохрома с с последующей активацией каспазы-3 (Sordet et al, 2002; Weber & Menko, 2005). Кроме того, временное непродолжительное увеличение активности каспазы-3 происходит при дифференцировке миобластов, остеокластов, стволовых клеток костного мозга и нейронов (Fernando et al, 2005; Fernando et al, 2002; Miura et al, 2004; Mogi & Togari, 2003). По контрасту при клеточной гибели активность каспазы гораздо выше (Weber & Menko, 2005). Однако, не при всякой дифференцировке активация каспаз напоминает менее выраженную апоптотическую активацию.

Например, по некоторым данным дифференцировка миобластов сопровождается снижением концентрации цитоплазматического цитохрома с, неизменной активностью каспаз -8 и -9, но повышенной активностью каспазы-3 (Bloemberg & Quadrilatero, 2014). Возможно, в некоторых сценариях дифференцировки активация каспаз напоминает менее выраженный апоптоз, в других же ситуациях каспазы работают по другой схеме. Возможно, в каждом типе клеток реализуется свой вариант.

Если клетка может выжить после активации каспаз, то логично предположить наличие некоего сенсора-ограничителя каспазной активности. Работа этого сенсора должна заключаться в предотвращении лавинообразного усиления активности каспаз, если каспазы активированы не очень сильно. В таком случае при невыраженной активации каспаз активность каспаз не сможет лавинообразно повыситься выше некоторого уровня, условной точки невозврата, и сможет быть реализован негибельный сценарий активации каспаз, в частности, дифференцировка. Если такого сенсора-ограничителя нет, то каждый раз при активации каспаз будет включаться механизм каскадного усиления каспазной активности, что всегда должно приводить к гибели. На роль такого сенсора по некоторым данным претендует белок RasGAP, белок активатор малых ГТФаз. Показано, что каспаза-3 активирует антиапоптотическую киназу Akt (Khalil et al, 2012). Протеинкиназа Akt (PKB), является эффектором фосфатидилинозитол-3-киназы и принимает участие в выживании клеток различных типов во многих, если не во всех типах тканей. В клетках нокаутных по гену каспазы-3 мышей в ответ на различные повреждающие стимулы существенно снижен уровень активной формы Akt, что в некоторых случаях приводит к гибели клеток и организма в целом (Khalil et al, 2012). Интересно, что мыши с мутацией RasGAP в сайте расщепления каспазой-3, демонстрируют похожие дефекты в активации Akt, и так же повреждения разных тканей у таких мышей вызывают более выраженную гибель клеток (Yang et al, 2005). С

белком RasGAP связан один из сценариев выживания клеток после активации каспазы-3 (Yang et al, 2004). А именно, при активации каспазы-3 происходит частичное расщепление RasGAP и один из образовавшихся фрагментов запускает активацию Akt и предотвращает дальнейшую активацию каспазы-3.

Для роли RasGAP как сенсора каспазной активности существенно, что у этого субстрата каспазы-3 есть второй сайт расщепления именно этой каспазой, но второй сайт становится доступным только после расщепления белка по первому сайту (Yang et al, 2004). Таким образом, при невысоком уровне активности каспазы-3 от белка RasGAP отщепляется фрагмент, повышающий выживаемость клеток и не позволяющий каспазе-3 активироваться далее (Yang et al, 2004). Если, как это случается при апоптозе, активность каспазы-3 продолжает возрастать, то белок RasGAP расщепляется по второму сайту, и образующиеся фрагменты уже не стимулируют Akt и не способны повысить выживаемость клетки. Активность каспазы-3 в таком сценарии уже ничто не ограничивает, и происходит клеточная гибель (Yang et al, 2005).

Стоит отметить, что RasGAP является распространенным клеточным белком и, вероятно, его расщепление является одним из первых событий после активации каспазы-3. Таким образом, регуляция активности каспазы-3 в клетке может осуществляться через такой как RasGAP сенсор-ограничитель практически в любой ситуации, с которой сталкивается клетка (Khalil et al, 2014). Однако, в ситуациях, связанных с дифференцировкой, и во многих других сценариях неапоптотической активации каспазы-3, роль белка RasGAP и функционально подобных ему белков еще не изучена.

Похожая роль сенсора в миобластах может принадлежать активируемой каспазой-3 киназе MST1 (Fernando et al, 2002). При не очень большой активации эта протеинкиназа запускает дифференцировку, тогда

как усиленная и продолжительная ее активация приводит клетку к гибели (Fernando et al, 2002).

Обобщая приведенные выше работы, можно сказать следующее. Значительная часть работ по неапоптотической роли каспазы-3 проведена на моделях дифференцировки клеток. Кроме того, участие каспаз в дифференцировке можно подразделять на две группы. В первую войдут процессы, так или иначе напоминающие или воспроизводящие черты апоптоза, во второй группе окажутся процессы в целом на апоптоз не похожие. Соответственно, процессы дифференцировки кератиноцитов, клеток хрусталика и эритроцитов во многом напоминают апоптоз, остановившийся на стадии разрушения ядра. В этих типах клеток при дифференцировке показано участие каспаз. Однако даже при дифференцировке клеток указанных типов функция каспаз может и не напоминать функцию каспаз при апоптозе. Так, введение каспазного ингибитора предотвращает дифференцировку эритроцитов на стадии раннее разрушения ядра, сходные результаты получены и при введении в клетку-предшественник миРНК каспазы-3 (Zermati et al, 2001). Очень похожая ситуация имеет место при дифференцировке клеток хрусталика, причем по некоторым наблюдениям, активация каспаз *in vivo* происходит на несколько дней раньше, чем активация протеолиза (Lee et al, 2001). На модели дифференцировки кератиноцитов показано, что происходит активация каспаз (Okuyama et al, 2004).

Авторы всех этих работ указывают на ключевые моменты при дифференцировке клеток указанных типов. А именно, активация каспаз строго ограничена по времени и период активации каспаз не совпадает с периодом разрушения ядра, т.е. в клетках при дифференцировке происходят процессы, существенно отличающиеся от апоптотических. Некоторым исследователям удалось идентифицировать некоторые субстраты каспаз при дифференцировке. Это ламин В и ацинус при дифференцировке эритроидных

клеток (Zermati et al, 2001), протеинкиназа Сдельта в кератиноцитах (Okuyama et al, 2004). Интересно, что в процессах дифференцировки эритроидных клеток и кератиноцитов PARP не расщепляется, но расщепляется при дифференцировке в клетках хрусталика.

### **«Каспазо-катепсиновая мимикрия»: в какой степени измеряемая в мозге активность принадлежит каспазе-3?**

Исследование каспазной активности при сниженном значении рН было проведено на культуре нейрональных клеток и на гомогенатах мозга. Мы показали, что субстрат каспазы-3 в мозге расщепляют катепсин В и протеасома. Более того, нейроны при определенных, не имеющих отношения к клеточной гибели, условиях могут секретировать во внешнюю среду фермент, расщепляющий субстрат каспазы-3 при сниженном значении рН (Onufriev et al, 2009; Yakovlev et al, 2013b). Этим ферментом также оказался катепсин В. Таким образом, «каспазой» активностью в мозге могут обладать и другие протеиназы и активность этих ферментов не всегда связана с апоптозом. Мы считаем, что локальное изменение рН является фактором, регулирующим каспазную активность в организме.

Тем не менее, не стоит считать, что неапоптотическая каспазная активность – это активность других ферментативных систем, ошибочно принятая за каспазную. Во множестве экспериментальных ситуаций показано, что тот же самый фермент, который исполняет апоптотическую программу, принимает участие и в неапоптотических процессах. Мы показали, что каспазная активность при дифференцировке принадлежит именно апоптотическому ферменту каспазе-3, тогда как при ингибировании долговременной потенциации ингибитором каспазы-3 неапоптотическую роль может играть какой-то другой фермент со сходной субстратной специфичностью (Kudryashov et al, 2003). Таким образом, тот факт, что при небольшом изменении рН одни и те же субстраты могут быть расщеплены

разными ферментами, служит еще одной иллюстрацией многообразия способов регуляции протеолитических ферментов.

С другой стороны, феномен переключения протеиназ, в частности катепсина В, с одного субстрата на другой при изменении pH (Onufriev et al, 2009; Yakovlev et al, 2008; Yakovlev et al, 2013b) заслуживает существенного внимания и тщательного дополнительного исследования и как принципиально новый механизм функционального участия протеиназ в сигнальных и метаболических процессах в клетке с возможностью переключения между путями – как основа плейотропности этих ферментов, и как механизм, который будучи расшифрован, сможет стать базисным для направленного влияния на патологические процессы, опосредованные протеиназами.

Еще одним, пока недостаточно исследованным фактором регуляции каспазной активности, является наличие ингибиторов каспаз в организме, по-разному экспрессируемых в органах и тканях в различных функциональных состояниях. Мы предприняли попытку найти такие ингибиторы в цереброспинальной жидкости человека (Brylev et al, 2009; Brylev et al, 2007) и показали наличие ранее неизвестных регуляторов активности протеолитических ферментов в ликворе, хотя и не выяснили их природу. Также остается неизвестным механизм регуляции экспрессии таких ингибиторов, предположительно пептидной природы, в организме.

Таким образом, в этих экспериментах продемонстрирована плейотропность протеаз головного мозга. Самое примечательное, что субстрат каспаз, считающихся уникальными по своей субстратной специфичности, расщепляют еще как минимум два фермента головного мозга. Плейотропностью в данном случае является зависимое от некоторых внешних условий, в этом смысле регулируемое, расщепление одного и того же субстрата различными протеазами. Центральную роль в такой ситуации

играет природа субстрата, а не специфичность фермента, так как одна и та же последовательность расщепляется совершенно различными протеазами.

Противоположная ситуация, когда протеиназа расщепляет различные субстраты в зависимости от физиологического состояния клетки, встречается также довольно часто. Более того, первые доказательства плеiotропности протеиназ мозга были получены как раз в таких экспериментальных моделях. Каспазы и в таком проявлении плеiotропности могут служить хорошим примером.

## ВЫВОДЫ

1. Каспаза-3 принимает участие в цАМФ-зависимой дифференцировке нейронов. Ингибирование каспазы-3 с помощью пептидного ингибитора или снижение экспрессии каспазы-3 с помощью миРНК существенно изменяет степень дифференцировки клеток в культуре, а также ингибирование каспазы-3 с помощью пептидного ингибитора блокирует долговременную потенциацию в срезах гиппокампа.

2. Каспаза-3 чувствительна к однократному введению морфина, причем только в стволе мозга и ни в каких других отделах.

3. Использование кросс-линкеров для идентификации внутриклеточных партнеров каспазы-3 позволило сделать заключение, что спектр внутриклеточных партнеров каспазы-3 различается в норме и при индукции апоптоза стауроспорином на первичных культурах мозжечка.

4. Показана регионарная специфичность внутриклеточных взаимодействий каспазы-3 в головном мозге. Установлено, что, по крайней мере, один внутриклеточный партнер каспазы-3 обладает способностью ее ингибировать.

5. Субстрат каспазы-3 в головном мозге расщепляют и некоторые другие протеиназы, в частности катепсин В и протеасома, при этом активность этих ферментов не обязательно связана с апоптозом. При этом каждая протеаза расщепляет субстрат каспазы-3 только в своем оптимуме рН.

6. Фермент, секретируемый нейронами при неблагоприятных условиях внешней среды и обладающий каспазной активностью, является катепсином В, а локальное изменение рН является фактором, регулирующим каспазоподобную активность катепсина В.

7. Расщепление одного субстрата различными протеазами, так же как и расщепление одной протеазой различных субстратов являются основой плейотропности протеолитических ферментов головного мозга в разных физиологических состояниях клетки.



8. Широкая субстратная специфичность (расщепление одной протеазой различных субстратов), а также перекрестная субстратная специфичность (расщепление одного субстрата различными протеазами) являются молекулярной основой функциональной плеiotропности протеаз в мозге.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор не устанет благодарить своих коллег, оказавших неоценимую помощь в проведении экспериментов, подготовке публикаций и написании диссертации. Спасибо коллективам лаборатории клеточной инженерии ИТЭБ РАН, и лично зав. лаб. д.б.н. И. П. Белецкому, лаборатории экспериментальной нейробиологии НЦ неврологии РАМН, и лично зав. лаб. д.б.н. Л. Г. Хаспекову, лаборатории биохимии НЦ наркологии Минздрава РФ, и лично зав. лаб. академику РАМН Л. Ф. Панченко. Автор навсегда останется в неоплатном долгу перед коллективом лаборатории функциональной биохимии нервной системы ИВНДиНФ РАН и лично перед Натальей Валерьевной Гуляевой.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Acarin, L., Villapol, S., Faiz, M., Rohn, T., Castellano, B. & Gonzalez, B. (2007) Caspase-3 activation in astrocytes following postnatal excitotoxic damage correlates with cytoskeletal remodeling but not with cell death or proliferation. *Glia*, 55(9), 954-965.
- Acehan, D., Jiang, X. J., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X. D. & Akey, C. W. (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: Implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular Cell*, 9(2), 423-432.
- Afkhami-Goli, A., Noorbakhsh, F., Keller, A. J., Vergnolle, N., Westaway, D., Jhamandas, J. H., Andrade-Gordon, P., Hollenberg, M. D., Arab, H., Dyck, R. H. & Power, C. (2007) Proteinase-activated receptor-2 exerts protective and pathogenic cell type-specific effects in Alzheimer's disease. *Journal of Immunology*, 179(8), 5493-5503.
- Alam, A., Cohen, L. Y., Aouad, S. & Sekaly, R. P. (1999) Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 190(12), 1879-1890.
- Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B. C. & Peter, M. E. (2002) Apoptosis-independent functions of killer caspases. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(6), 721-726.
- Allombert-Blaise, C., Tamiji, S., Mortier, L., Fauvel, H., Tual, M., Delaporte, E., Piette, F., DeLassale, E. M., Formstecher, P., Marchetti, P. & Polakowska, R. (2003) Terminal differentiation of human epidermal keratinocytes involves mitochondria- and caspase-dependent cell death pathway. *Cell Death and Differentiation*, 10(7), 850-852.
- Alvarado-Kristensson, M. & Andersson, T. (2005) Protein phosphatase 2A regulates apoptosis in neutrophils by dephosphorylating both p38 MAPK and its substrate caspase 3. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 6238-6244.
- Alvarado-Kristensson, M., Melander, F., Leandersson, K., Ronnstrand, L., Wernstedt, C. & Andersson, T. (2004) p38-MAPK signals survival by

phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils. *Journal of Experimental Medicine*, 199(4), 449-458.

Ameisen, J. C. (2002) On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death and Differentiation*, 9(4), 367-393.

Ammon-Treiber, S., Grecksch, G., Stumm, R., Riechert, U., Tischmeyer, H., Reichenauer, A. & Holtt, V. (2004) Rapid, transient, and dose-dependent expression of Hsp70 messenger RNA in the rat brain after morphine treatment. *Cell Stress & Chaperones*, 9(2), 182-197.

Andreeva, N., Khodorov, B., Stelmashook, E., Cragoe, E. & Victorov, I. (1991) INHIBITION OF  $Na^+/Ca^{2+}$  EXCHANGE ENHANCES DELAYED NEURONAL DEATH ELICITED BY GLUTAMATE IN CEREBELLAR GRANULE CELL-CULTURES. *Brain Research*, 548(1-2), 322-325.

Aranha, M. M., Sola, S., Low, W. C., Steer, C. J. & Rodrigues, C. M. P. (2009) Caspases and p53 Modulate FOXO3A/Id1 Signaling During Mouse Neural Stem Cell Differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 107(4), 748-758.

Arlet, J.-B., Ribeil, J.-A., Guillem, F., Negre, O., Hazoume, A., Marcion, G., Beuzard, Y., Dussiot, M., Moura, I. C., Demarest, S., de Beauchene, I. C., Belaid-Choucair, Z., Sevin, M., Maciel, T. T., Auclair, C., Leboulch, P., Chretien, S., Tchertanov, L., Baudin-Creuzat, V., Seigneuric, R., Fontenay, M., Garrido, C., Hermine, O. & Courtois, G. (2014) HSP70 sequestration by free alpha-globin promotes ineffective erythropoiesis in beta-thalassaemia. *Nature*, 514(7521), 242-+.

Atici, S., Cinel, L., Cinel, I., Doruk, N., Aktekin, M., Akca, A., Camdeviren, H. & Oral, U. (2004) Opioid neurotoxicity: Comparison of morphine and tramadol in an experimental rat model. *International Journal of Neuroscience*, 114(8), 1001-+.

Back, T., Hoehn, M., Mies, G., Busch, E., Schmitz, B., Kohno, K. & Hossmann, K. A. (2000) Penumbral tissue alkalosis in focal cerebral ischemia: Relationship to

energy metabolism, blood flow, and steady potential. *Annals of Neurology*, 47(4), 485-492.

Bajic, D., Commons, K. & Soriano, S. (2013) Morphine-enhanced apoptosis in selective brain regions of neonatal rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 31(4), 258-266.

Bassnett, S. & Mataic, D. (1997) Chromatin degradation in differentiating fiber cells of the eye lens. *Journal of Cell Biology*, 137(1), 37-49.

Basu, S., Rajakaruna, S., De Arcangelis, A., Zhang, L., Georges-Labouesse, E. & Menko, A. S. (2014) alpha 6 Integrin Transactivates Insulin-like Growth Factor Receptor-1 (IGF-1R) to Regulate Caspase-3-mediated Lens Epithelial Cell Differentiation Initiation. *Journal of Biological Chemistry*, 289(7), 3842-3855.

Basu, S., Rajakaruna, S. & Menko, A. S. (2012) Insulin-like Growth Factor Receptor-1 and Nuclear Factor kappa B Are Crucial Survival Signals That Regulate Caspase-3-mediated Lens Epithelial Cell Differentiation Initiation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 8384-8397.

Beaujouin, M., Baghdiguan, S., Glondu-Lassis, M., Berchem, G. & Liaudet-Coopman, E. (2006) Overexpression of both catalytically active and -inactive cathepsin D by cancer cells enhances apoptosis-dependent chemo-sensitivity. *Oncogene*, 25(13), 1967-1973.

Benchoua, A., Braudeau, J., Reis, A., Couriaud, C. & Onteniente, B. (2004) Activation of proinflammatory caspases by cathepsin B in focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 24(11), 1272-1279.

Bergsbaken, C. L., Sommers, S. L. & Law, P. Y. (1993) EFFECT OF FORSKOLIN AND ISOBUTYLMETHYLYXANTHINE ON DELTA-OPIOID RECEPTOR ACTIVITY IN NEUROBLASTOMA X GLIOMA NG108-15 CELLS. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 264(3), 1474-1483.

Beyer, C. & Karolczak, M. (2000) Estrogenic stimulation of neurite growth in midbrain dopaminergic neurons depends on cAMP/protein kinase A signalling. *Journal of Neuroscience Research*, 59(1), 107-116.

- Bierczynska-Krzysik, A., John, J. P. P., Silberring, J., Kotlinska, J., Dylag, T., Cabatic, M. & Lubec, G. (2006) Proteomic analysis of rat cerebral cortex, hippocampus and striatum after exposure to morphine. *International Journal of Molecular Medicine*, 18(4), 775-784.
- Bloemberg, D. & Quadriatero, J. (2014) Mitochondrial pro-apoptotic indices do not precede the transient caspase activation associated with myogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1843(12), 2926-2936.
- Blomgran, R., Zheng, L. & Stendahl, O. (2007) Cathepsin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(5), 1213-1223.
- Boehm, D., Mazurier, C., Giarratana, M.-C., Darghouth, D., Faussat, A.-M., Harmand, L. & Douay, L. (2013) Caspase-3 Is Involved in the Signalling in Erythroid Differentiation by Targeting Late Progenitors. *Plos One*, 8(5).
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Bravarenko, N., Onufriev, M., Stepanichev, M., Ierusalimsky, V., Balaban, P. & Gulyaeva, N. (2006) Caspase-like activity is essential for long-term synaptic plasticity in the terrestrial snail *Helix*. *European Journal of Neuroscience*, 23(1), 129-140.
- Brenner, D. & Mak, T. W. (2009) Mitochondrial cell death effectors. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6), 871-877.
- Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., De Guevara, R. L., Cepero, E. & Boise, L. H. (2013) Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *Bmc Cell Biology*, 14.
- Broker, L. E., Huisman, C., Span, S. W., Rodriguez, J. A., Kruyt, F. A. E. & Giaccone, G. (2004) Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Research*, 64(1), 27-30.

- Brylev, L. V., Nelkina, E. N., Yakovlev, A. A., Onufriev, M. V., Shabalina, A. A., Kostyreva, M. V., Zakharova, M. N., Zavalishin, I. A. & Gulyaeva, N. V. (2009) Modulators of cystein proteases and cell-death markers in the cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochemical Journal*, 3(2), 133-138.
- Brylev, L. V., Yakovlev, A. A., Onufriev, M. V., Gulyaeva, N. V. & Zakharova, M. N. (2007) Proteolytic enzymes, involved in neuronal cell death, in the cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neurology*, 14, 257-258.
- Buck, M. R., Karustis, D. G., Day, N. A., Honn, K. V. & Sloane, B. F. (1992) DEGRADATION OF EXTRACELLULAR-MATRIX PROTEINS BY HUMAN CATHEPSIN-B FROM NORMAL AND TUMOR-TISSUES. *Biochemical Journal*, 282, 273-278.
- Callus, B. A. & Vaux, D. L. (2007) Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical. *Cell Death and Differentiation*, 14(1), 73-78.
- Campbell, D. S. & Holt, C. E. (2003) Apoptotic pathway and MAPKs differentially regulate chemotropic responses of retinal growth cones. *Neuron*, 37(6), 939-952.
- Campbell, D. S. & Okamoto, H. (2013) Local caspase activation interacts with Slit-Robo signaling to restrict axonal arborization. *Journal of Cell Biology*, 203(4), 657-672.
- Cardone, M. H., Salvesen, G. S., Widmann, C., Johnson, G. & Frisch, S. M. (1997) The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell*, 90(2), 315-323.
- Castino, R., Bellio, N., Nicotra, G., Follo, C., Trincheri, N. & Isidoro, C. (2007) Cathepsin D-Bax death pathway in oxidative stressed neuroblastoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(9), 1305-1316.
- Cathelin, S., Rebe, C., Haddaoui, L., Simioni, N., Verdier, F., Fontenay, M., Launay, S., Mayeux, P. & Solary, E. (2006) Identification of proteins cleaved

- downstream of caspase activation in monocytes undergoing macrophage differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(26), 17779-17788.
- Chan, S., Griffin, W. & Mattson, M. (1999) Evidence for caspase-mediated cleavage of AMPA receptor subunits in neuronal apoptosis and Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research*, 57(3), 315-323.
- Chan, S. & Mattson, M. (1999) Caspase and calpain substrates: Roles in synaptic plasticity and cell death. *Journal of Neuroscience Research*, 58(1), 167-190.
- Chandler, J. M., Cohen, G. M. & MacFarlane, M. (1998) Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver. *Journal of Biological Chemistry*, 273(18), 10815-10818.
- Chang, L., Zhang, X., Liu, W., Song, Y., Gao, X., Ling, W. & Wu, Y. (2012) Immunoreactivity of Ki-67/beta-tubulin and immunocolocalization with active caspase-3 in rat dentate gyrus during postnatal development. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 46(1-2), 10-18.
- Chapman, H. A., Riese, R. J. & Shi, G. P. (1997) Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annual Review of Physiology*, 59, 63-88.
- Chen, J., Nagayama, T., Jin, K., Stetler, R., Zhu, R., Graham, S. & Simon, R. (1998) Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience*, 18(13), 4914-4928.
- Chen, L., Smith, L., Wang, Z. & Smith, J. B. (2003) Preservation of caspase-3 subunits from degradation contributes to apoptosis evoked by lactacystin: Any single lysine or lysine pair of the small subunit is sufficient for ubiquitination. *Molecular Pharmacology*, 64(2), 334-345.
- Chen, M.-C., Lin, H., Hsu, F.-N., Huang, P.-H., Lee, G.-S. & Wang, P. S. (2010) Involvement of cAMP in nerve growth factor-triggered p35/Cdk5 activation and differentiation in PC12 cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 299(2), C516-C527.



- Chen, N.-J., Chio, I. I. C., Lin, W.-J., Duncan, G., Chau, H., Katz, D., Huang, H.-L., Pike, K. A., Hao, Z., Su, Y.-W., Yamamoto, K., de Pooter, R. F., Zuniga-Pflucker, J. C., Wakeham, A., Yeh, W.-C. & Mak, T. W. (2008) Beyond tumor necrosis factor receptor: TRADD signaling in toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(34), 12429-12434.
- Chen, S. X., Cherry, A., Tari, P. K., Podgorski, K., Kwong, Y. K. K. & Haas, K. (2012) The Transcription Factor MEF2 Directs Developmental Visually Driven Functional and Structural Metaplasticity. *Cell*, 151(1), 41-55.
- Chen, Y. & Sommer, C. (2009) The Role of Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) in Morphine Tolerance and Dependence. *Molecular Neurobiology*, 40(2), 101-107.
- Cheng, J., Tian, L., Ma, J., Gong, Y., Zhang, Z., Chen, Z., Xu, B., Xiong, H., Li, C. & Huang, Q. (2015) Dying tumor cells stimulate proliferation of living tumor cells via caspase-dependent protein kinase C delta activation in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular Oncology*, 9(1), 105-114.
- Chesler, M. (1990) THE REGULATION AND MODULATION OF PH IN THE NERVOUS-SYSTEM. *Progress in Neurobiology*, 34(5), 401-427.
- Choi, S. Y., Choi, B. H., Suh, B. C., Chae, H. D., Kim, J. S., Shin, M. J., Kang, S. S., Negishi, M. & Kim, K. T. (2001) Potentiation of PGE(2)-mediated cAMP production during neuronal differentiation of human neuroblastoma SK-N-BE(2)C cells. *Journal of Neurochemistry*, 79(2), 303-310.
- Cinar, B., Fang, P.-K., Lutchman, M., Di Vizio, D., Adam, R. M., Pavlova, N., Rubin, M. A., Yelick, P. C. & Freeman, M. R. (2007) The pro-apoptotic kinase Mst1 and its caspase cleavage products are direct inhibitors of Akt1. *Embo Journal*, 26(21), 4523-4534.
- Clark, R., Kochanek, P., Watkins, S., Chen, M., Seidberg, N., Mellick, J., Loeffert, E. & Graham, S. (1999) Caspase-3 mediated programmed-cell death (apoptosis) after traumatic brain injury in rats. *Critical Care Medicine*, 27(1), A53-A53.

- Clem, R. J., Cheng, E. H. Y., Karp, C. L., Kirsch, D. G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M. B., Griffin, D. E., Earnshaw, W. C., Veluona, M. A. & Hardwick, J. M. (1998) Modulation of cell death by Bcl-x(L) through caspase interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(2), 554-559.
- Clement, M. V., Ponton, A. & Pervaiz, S. (1998) Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. *Febs Letters*, 440(1-2), 13-18.
- Cowan, K. N., Leung, W. C. Y., Mar, C., Bhattacharjee, R., Zhu, Y. H. & Rabinovitch, M. (2005) Caspases from apoptotic myocytes degrade extracellular matrix: a novel remodeling paradigm. *Faseb Journal*, 19(10), 1848-+.
- Cui, J., Chen, Q., Yu, L.-C. & Zhang, Y. (2008) Chronic morphine application is protective against cell death in primary human neurons. *Neuroreport*, 19(18), 1745-1749.
- Cusack, C. L., Swahari, V., Henley, W. H., Ramsey, J. M. & Deshmukh, M. (2013) Distinct pathways mediate axon degeneration during apoptosis and axon-specific pruning. *Nature Communications*, 4.
- D'Amelio, M., Cavallucci, V. & Cecconi, F. (2010) Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death and Differentiation*, 17(7), 1104-1114.
- D'Amelio, M., Cavallucci, V., Middei, S., Marchetti, C., Pacioni, S., Ferri, A., Diamantini, A., De Zio, D., Carrara, P., Battistini, L., Moreno, S., Bacci, A., Ammassari-Teule, M., Marie, H. & Cecconi, F. (2011) Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, 14(1), 69-U97.
- Dahm, R. & Prescott, A. R. (2002) Morphological changes and nuclear pore clustering during nuclear degradation in differentiating bovine lens fibre cells. *Ophthalmic Research*, 34(5), 288-294.
- Danial, N. N. & Korsmeyer, S. J. (2004) Cell death: Critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.

- Dash, P., Blum, S. & Moore, A. (2000) Caspase activity plays an essential role in long-term memory. *Neuroreport*, 11(12), 2811-2816.
- Datta, D., Scheer, J. M., Romanowski, M. J. & Wells, J. A. (2008) An allosteric circuit in caspase-1. *Journal of Molecular Biology*, 381(5), 1157-1167.
- Datta, R., Kojima, H., Yoshida, K. & Kufe, D. (1997) Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20317-20320.
- Davies, B. J., Pickard, B. S., Steel, R., Morris, R. G. M. & Lathe, R. (1998) Serine proteases in rodent hippocampus. *Journal of Biological Chemistry*, 273(36), 23004-23011.
- de Botton, S., Sabri, S., Daugas, E., Zermati, Y., Guidotti, J. E., Hermine, O., Kroemer, G., Vainchenker, W. & Debili, N. (2002) Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood*, 100(4), 1310-1317.
- de la Vega, L., Hornung, J., Kremmer, E., Milanovic, M. & Schmitz, M. L. (2013) Homeodomain-interacting protein kinase 2-dependent repression of myogenic differentiation is relieved by its caspase-mediated cleavage. *Nucleic Acids Research*, 41(11), 5731-5745.
- De Maria, R., Zeuner, A., Eramo, A., Domenichelli, C., Bonci, D., Grignani, F., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Testa, U. & Peschle, C. (1999) Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*, 401(6752), 489-493.
- DeChant, A. K., Dee, K. & Weyman, C. M. (2002) Raf-induced effects on the differentiation and apoptosis of skeletal myoblasts are determined by the level of Raf signaling: abrogation of apoptosis by Raf is downstream of caspase 3 activation. *Oncogene*, 21(34), 5268-5279.
- Dehmelt, L., Smart, F. M., Ozer, R. S. & Halpain, S. (2003) The role of microtubule-associated protein 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation. *Journal of Neuroscience*, 23(29), 9479-9490.

- Demontis, S., Rigo, C., Piccinin, S., Mizzau, M., Sonogo, M., Fabris, M., Brancolini, C. & Maestro, R. (2006) Twist is substrate for caspase cleavage and proteasome-mediated degradation. *Cell Death and Differentiation*, 13(2), 335-345.
- Deveraux, Q. L. & Reed, T. C. (1999) IAP family proteins - suppressors of apoptosis. *Genes & Development*, 13(3), 239-252.
- DeVries, T. A., Neville, M. C. & Reyland, M. E. (2002) Nuclear import of PKC delta is required for apoptosis: identification of a novel nuclear import sequence. *Embo Journal*, 21(22), 6050-6060.
- Di Bacco, A. M. A. & Cotter, T. G. (2002) p53 expression in K562 cells is associated with caspase-mediated cleavage of c-ABL and BCR-ABL protein kinases. *British Journal of Haematology*, 117(3), 588-597.
- Di Pietro, R., di Giacomo, V., Caravatta, L., Sancilio, S., Rana, R. A. & Cataldi, A. (2007) Cyclic nucleotide response element binding (CREB) protein activation is involved in K562 erythroleukemia cells differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 100(4), 1070-1079.
- Dickman, D. K. & Davis, G. W. (2009) The Schizophrenia Susceptibility Gene dysbindin Controls Synaptic Homeostasis. *Science*, 326(5956), 1127-1130.
- Dickman, D. K., Tong, A. & Davis, G. W. (2012) Snapin is Critical for Presynaptic Homeostatic Plasticity. *Journal of Neuroscience*, 32(25), 8716-8724.
- Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M. & Zeiher, A. M. (1997) Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *Journal of Experimental Medicine*, 185(4), 601-607.
- Donato, A. L., Huang, Q., Liu, X., Li, F., Zimmerman, M. A. & Lii, C.-Y. (2014) Caspase 3 Promotes Surviving Melanoma Tumor Cell Growth after Cytotoxic Therapy. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(6), 1686-1692.
- Duan, W. Z., Rangnekar, V. M. & Mattson, M. P. (1999) Prostate apoptosis response-4 production in synaptic compartments following apoptotic and

excitotoxic insults: Evidence for a pivotal role in mitochondrial dysfunction and neuronal degeneration. *Journal of Neurochemistry*, 72(6), 2312-2322.

Dudek, H., Datta, S. R., Franke, T. F., Birnbaum, M. J., Yao, R. J., Cooper, G. M., Segal, R. A., Kaplan, D. R. & Greenberg, M. E. (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*, 275(5300), 661-665.

Earnshaw, W., Martins, L. & Kaufmann, S. (1999) Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 383-424.

Eckelman, B. P., Salvesen, G. S. & Scott, F. L. (2006) Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *Embo Reports*, 7(10), 988-994.

Eckhart, L., Declercq, W., Ban, J., Rendl, M., Lengauer, B., Mayer, C., Lippens, S., Vandenabeele, P. & Tschachler, E. (2000) Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase-14 activation. *Journal of Investigative Dermatology*, 115(6), 1148-1151.

Elmore, S. (2007) Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.

Emoto, Y., Manome, Y., Meinhardt, G., Kisaki, H., Kharbanda, S., Robertson, M., Ghayur, T., Wong, W. W., Kamen, R., Weichselbaum, R. & Kufe, D. (1995) Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *Embo Journal*, 14(24), 6148-6156.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391(6662), 43-50.

Ertuerk, A., Wang, Y. & Sheng, M. (2014) Local Pruning of Dendrites and Spines by Caspase-3-Dependent and Proteasome-Limited Mechanisms. *Journal of Neuroscience*, 34(5), 1672-1688.

Eymin, B., Sordet, O., Droin, N., Munsch, B., Haugg, M., Van de Craen, M., Vandenabeele, P. & Solary, E. (1999) Caspase-induced proteolysis of the cyclin-

dependent kinase inhibitor p27(Kip1) mediates its anti-apoptotic activity. *Oncogene*, 18(34), 4839-4847.

Fadeel, B., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B. (2000) The most unkindest cut of all\*: on the multiple roles of mammalian caspases. *Leukemia*, 14(8), 1514-1525.

Faleiro, L., Kobayashi, R., Fearnhead, H. & Lazebnik, Y. (1997) Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells. *Embo Journal*, 16(9), 2271-2281.

Fan, X. L., Zhang, J. S., Zhang, X. Q. & Ma, L. (2003) Chronic morphine treatment and withdrawal induce up-regulation of c-Jun N-terminal kinase 3 gene expression in rat brain. *Neuroscience*, 122(4), 997-1002.

Farzaneh, F., Zalin, R., Brill, D. & Shall, S. (1982) DNA STRAND BREAKS AND ADP-RIBOSYL TRANSFERASE ACTIVATION DURING CELL-DIFFERENTIATION. *Nature*, 300(5890), 362-366.

Feldman, T., Kabaleeswaran, V., Jang, S. B., Antczak, C., Djaballah, H., Wu, H. & Jiang, X. (2012) A Class of Allosteric Caspase Inhibitors Identified by High-Throughput Screening. *Molecular Cell*, 47(4), 585-595.

Feng, X., Tian, L., Zhang, Z., Yu, Y., Cheng, J., Gong, Y., Li, C.-Y. & Huang, Q. (2015) Caspase 3 in dying tumor cells mediates post-irradiation angiogenesis. *Oncotarget*, 6(32), 32353-32367.

Fernando, P., Brunette, S. & Megeney, L. A. (2005) Neural stem cell differentiation is dependent upon endogenous caspase-3 activity. *Faseb Journal*, 19(10), 1671-+.

Fernando, P., Kelly, J. F., Balazsi, K., Slack, R. S. & Megeney, L. A. (2002) Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11025-11030.

Fernando, P. & Megeney, L. A. (2007) Is caspase-dependent apoptosis only cell differentiation taken to the extreme? *Faseb Journal*, 21(1), 8-17.

Finckbone, V., Oomman, S., Strahlendorf, H. & Strahlendorf, J. (2009) Regional differences in the temporal expression of non-apoptotic caspase-3-positive

Bergmann glial cells in the developing rat cerebellum. *Frontiers in Neuroanatomy*, 3.

Fischer, U., Janicke, R. & Schulze-Osthoff, K. (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation*, 10(1), 76-100.

Flint, M. S., Baum, A., Chambers, W. H. & Jenkins, F. J. (2007) Induction of DNA damage, alteration of DNA repair and transcriptional activation by stress hormones. *Psychoneuroendocrinology*, 32(5), 470-479.

Frasch, S. C., Nick, J. A., Fadok, V. A., Bratton, D. L., Worthen, G. S. & Henson, P. M. (1998) p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent intracellular signal transduction pathways leading to apoptosis in human neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 273(14), 8389-8397.

Fridman, A., Pak, I., Butts, B., Hoek, M., Nicholson, D. & Mehmet, H. (2013) MerCASBA: an updated and refined database of caspase substrates. *Apoptosis*, 18(3), 369-371.

Fuchs, Y. & Steller, H. (2011) Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell*, 147(4), 742-758.

Fujita, J., Crane, A. M., Souza, M. K., Dejosez, M., Kyba, M., Flavell, R. A., Thomson, J. A. & Zwaka, T. P. (2008) Caspase activity mediates the differentiation of embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2(6), 595-601.

Gabet, A. S., Coulon, S., Fricot, A., Vandekerckhove, J., Chang, Y., Ribeil, J. A., Lordier, L., Zermati, Y., Asnafi, V., Belaid, Z., Debili, N., Vainchenker, W., Varet, B., Hermine, O. & Courtois, G. (2011) Caspase-activated ROCK-1 allows erythroblast terminal maturation independently of cytokine-induced Rho signaling. *Cell Death and Differentiation*, 18(4), 678-689.

Gallo, R., Serafini, M., Castellani, L., Falcone, G. & Alema, S. (1999) Distinct effects of Rac1 on differentiation of primary avian myoblasts. *Molecular Biology of the Cell*, 10(10), 3137-3150.

- Garrido, C. & Kroemer, G. (2004) Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(6), 639-646.
- Gdynia, G., Grund, K., Eckert, A., Bock, B., Funke, B., Macher-Goeppinger, S., Sieber, S., Herold-Mende, C., Wiestler, B., Wiestler, O. & Roth, W. (2007) Basal caspase activity promotes migration and invasiveness in glioblastoma cells. *Molecular Cancer Research*, 5(12), 1232-1240.
- Gemma, C., Bachstetter, A., Cole, M., Fister, M., Hudson, C. & Bickford, P. (2007) Blockade of caspase-1 increases neurogenesis in the aged hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 26(10), 2795-2803.
- Gemma, C., Fister, M., Hudson, C. & Bickford, P. (2005) Improvement of memory for context by inhibition of caspase-1 in aged rats. *European Journal of Neuroscience*, 22(7), 1751-1756.
- Ghayur, T., Hugunin, M., Talanian, R. V., Ratnofsky, S., Quinlan, C., Emoto, Y., Pandey, P., Datta, R., Huang, Y. Y., Kharbanda, S., Allen, H., Kamen, R., Wong, W. & Kufe, D. (1996) Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 184(6), 2399-2404.
- Gilman, C. P. & Mattson, M. P. (2002) Do apoptotic mechanisms regulate synaptic plasticity and growth-cone motility? *Neuromolecular Medicine*, 2(2), 197-214.
- Glazner, G. W., Chan, S. L., Lu, C. B. & Mattson, M. P. (2000) Caspase-mediated degradation of AMPA receptor subunits: A mechanism for preventing excitotoxic necrosis and ensuring apoptosis. *Journal of Neuroscience*, 20(10), 3641-3649.
- Gonzalez, G. A. & Montminy, M. R. (1989) CYCLIC-AMP STIMULATES SOMATOSTATIN GENE-TRANSCRIPTION BY PHOSPHORYLATION OF CREB AT SERINE-133. *Cell*, 59(4), 675-680.
- Graber, S., Maiti, S. & Halpain, S. (2004) Cathepsin B-like proteolysis and MARCKS degradation in sublethal NMDA-induced collapse of dendritic spines. *Neuropharmacology*, 47(5), 706-713.



- Graves, J. D., Gotoh, Y., Draves, K. E., Ambrose, D., Han, D. K. M., Wright, M., Chernoff, J., Clark, E. A. & Krebs, E. G. (1998) Caspase-mediated activation and induction of apoptosis by the mammalian Ste20-like kinase Mst1. *Embo Journal*, 17(8), 2224-2234.
- Gregoli, P. A. & Bondurant, M. C. (1999) Function of caspases in regulating apoptosis caused by erythropoietin deprivation in erythroid progenitors. *Journal of Cellular Physiology*, 178(2), 133-143.
- Gregory, T., Yu, C. N., Ma, A., Orkin, S. H., Blobel, G. A. & Weiss, M. J. (1999) GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-x(L) expression. *Blood*, 94(1), 87-96.
- Grutter, M. (2000) Caspases: key players in programmed cell death. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(6), 649-655.
- Gulyaeva, N., Kudryashov, I. & Kudryashova, I. (2003) Caspase activity is essential for long-term potentiation. *Journal of Neuroscience Research*, 73(6), 853-864.
- Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G., Henderson, J., Woo, M., Soengas, M., Elia, A., de la Pompa, J., Kagi, D., Khoo, W., Potter, J., Yoshida, R., Kaufman, S., Lowe, S., Penninger, J. & Mak, T. (1998) Differential requirement for Caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*, 94(3), 339-352.
- Hall, A. & Nobes, C. D. (2000) Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 355(1399), 965-970.
- Han, M.-H., Jiao, S., Jia, J.-M., Chen, Y., Chen, C. Y., Gucek, M., Markey, S. P. & Li, Z. (2013) The Novel Caspase-3 Substrate Gap43 is Involved in AMPA Receptor Endocytosis and Long-Term Depression. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(12), 3719-3731.
- Han, Z. Y., Malik, N., Carter, T., Reeves, W. H., Wyche, J. H. & Hendrickson, E. A. (1996) DNA-dependent protein kinase is a target for a CPP32-like apoptotic protease. *Journal of Biological Chemistry*, 271(40), 25035-25040.

- Hao, Z. Y., Duncan, G. S., Chang, C. C., Elia, A., Fang, M., Wakeham, A., Okada, H., Calzascia, T., Jang, Y. J., Annick, Y. T., Yeh, W. C., Ohashi, P., Wang, X. D. & Mak, T. W. (2005) Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome c reveals a differential requirement for cytochrome c and apaf-1 in apoptosis. *Cell*, 121(4), 579-591.
- Hardy, J. A., Lam, J., Nguyen, J. T., O'Brien, T. & Wells, J. A. (2004) Discovery of an allosteric site in the caspases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34), 12461-12466.
- Hartmann, A., Hunot, S., Michel, P., Muriel, M., Vyas, S., Faucheux, B., Mouatt-Prigent, A., Turmel, H., Srinivasan, A., Ruberg, M., Evan, G., Agid, Y. & Hirsch, E. (2000) Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6), 2875-2880.
- Hengartner, M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-776.
- Henshall, D., Chen, J. & Simon, R. (2000) Involvement of caspase-3-like protease in the mechanism of cell death following focally evoked limbic seizures. *Journal of Neurochemistry*, 74(3), 1215-1223.
- Hook, V., Funkelstein, L., Wegrzyn, J., Bark, S., Kindy, M. & Hook, G. (2012) Cysteine Cathepsins in the secretory vesicle produce active peptides: Cathepsin L generates peptide neurotransmitters and cathepsin B produces beta-amyloid of Alzheimer's disease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1824(1), 89-104.
- Hoppe, J., Hoppe, V. & Schafer, R. (2001) Selective degradation of the PKC-epsilon isoform during cell death in AKR-2B fibroblasts. *Experimental Cell Research*, 266(1), 64-73.
- Hou, W., Han, J., Lu, C., Goldstein, L. A. & Rabinowich, H. (2010) Autophagic degradation of active caspase-8 A crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy*, 6(7), 891-900.

- Hsu, S. L., Yu, C. T. R., Yin, S. C., Tang, M. J., Tien, A. C., Wu, Y. M. & Huang, C. Y. F. (2006) Caspase 3, periodically expressed and activated at G2/M transition, is required for nocodazole-induced mitotic checkpoint. *Apoptosis*, 11(5), 765-771.
- Hu, S., Sheng, W., Lokensgard, J. & Peterson, P. (2002) Morphine induces apoptosis of human microglia and neurons. *Neuropharmacology*, 42(6), 829-836.
- Hu, W.-Y., He, Z.-Y., Yang, L.-J., Zhang, M., Xing, D. & Xiao, Z.-C. (2015) The Ca<sup>2+</sup> channel inhibitor 2-APB reverses beta-amyloid-induced  $\Delta\Pi$  deficit in hippocampus by blocking BAX and caspase-3 hyperactivation. *British Journal of Pharmacology*, 172(9), 2273-2285.
- Huang, H. K., Joazeiro, C. A. P., Bonfoco, E., Kamada, S., Levenson, J. D. & Hunter, T. (2000) The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7. *Journal of Biological Chemistry*, 275(35), 26661-26664.
- Huang, Q., Li, F., Liu, X., Li, W., Shi, W., Liu, F.-F., O'Sullivan, B., He, Z., Peng, Y., Tan, A.-C., Zhou, L., Shen, J., Han, G., Wang, X.-J., Thorburn, J., Thorburn, A., Jimeno, A., Raben, D., Bedford, J. S. & Li, C.-Y. (2011) Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nature Medicine*, 17(7), 860-U231.
- Huang, Z., Pinto, J. T., Deng, H. & Richie, J. P., Jr. (2008) Inhibition of caspase-3 activity and activation by protein glutathionylation. *Biochemical Pharmacology*, 75(11), 2234-2244.
- Huesmann, G. & Clayton, D. (2006) Dynamic role of postsynaptic caspase-3 and BIRC4 in zebra finch song-response habituation. *Neuron*, 52(6), 1061-1072.
- Impens, F., Van Damme, P., Demol, H., Van Damme, J., Vandekerckhove, J. & Gevaert, K. (2008) Mechanistic insight into taxol-induced cell death. *Oncogene*, 27(33), 4580-4591.
- Ishizaki, Y., Jacobson, M. D. & Raff, M. C. (1998) Role for caspases in lens fiber differentiation. *Journal of Cell Biology*, 140(1), 153-158.

- Jang, M., Park, B. C., Lee, A. Y., Na, K. S., Kang, S., Bae, K.-H., Myung, P. K., Chung, B. C., Cho, S., Lee, D. H. & Park, S. G. (2007) Caspase-7 mediated cleavage of proteasome subunits during apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(2), 388-394.
- Jin, Z. Y. & El-Deiry, W. S. (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy*, 4(2), 139-163.
- Jo, J., Whitcomb, D. J., Olsen, K. M., Kerrigan, T. L., Lo, S.-C., Bru-Mercier, G., Dickinson, B., Scullion, S., Sheng, M., Collingridge, G. & Cho, K. (2011) A beta(1-42) inhibition of  $\Delta\Pi$  is mediated by a signaling pathway involving caspase-3, Akt1 and GSK-3 beta. *Nature Neuroscience*, 14(5), 545-547.
- Jost, P. J., Grabow, S., Gray, D., McKenzie, M. D., Nachbur, U., Huang, D. C. S., Bouillet, P., Thomas, H. E., Borner, C., Silke, J., Strasser, A. & Kaufmann, T. (2009) XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature*, 460(7258), 1035-U128.
- Juo, P., Kuo, C. J., Yuan, J. Y. & Blenis, J. (1998) Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Current Biology*, 8(18), 1001-1008.
- Kandel, E. R. (2001) Neuroscience - The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. *Science*, 294(5544), 1030-1038.
- Kang, T. B., Ben-Moshe, T., Varfolomeev, E. E., Pewzner-Jung, Y., Yogev, N., Jurewicz, A., Waisman, A., Brenner, O., Haffner, R., Gustafsson, E., Ramakrishnan, P., Lapidot, T. & Wallach, D. (2004) Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *Journal of Immunology*, 173(5), 2976-2984.
- Kauer, J. A. & Malenka, R. C. (2007) Synaptic plasticity and addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(11), 844-858.
- Kawada, A., Hara, K., Kominami, E., Hiruma, M., Akiyama, M., Ishibashi, A., Abe, H., Ichikawa, E., Nakamura, Y., Watanabe, S., Yamamoto, T. & Nishioka, K. (1997) Expression of cathepsin D and B in invasion and metastasis of squamous cell carcinoma. *British Journal of Dermatology*, 137(3), 361-366.

- Kennedy, N. J., Kataoka, T., Tschopp, J. & Budd, R. C. (1999) Caspase activation is required for T cell proliferation. *Journal of Experimental Medicine*, 190(12), 1891-1895.
- Kersse, K., Vanden Berghe, T., Lamkanfi, M. & Vandenabeele, P. (2007) A phylogenetic and functional overview of inflammatory caspases and caspase-1-related CARD-only proteins. *Biochemical Society Transactions*, 35, 1508-1511.
- Khalil, H., Bertrand, M. J. M., Vandenabeele, P. & Widmann, C. (2014) Caspase-3 and RasGAP: a stress-sensing survival/demise switch. *Trends in Cell Biology*, 24(2), 83-89.
- Khalil, H., Peltzer, N., Walicki, J., Yang, J.-Y., Dubuis, G., Gardiol, N., Held, W., Bigliardi, P., Marsland, B., Liaudet, L. & Widmann, C. (2012) Caspase-3 Protects Stressed Organs against Cell Death. *Molecular and Cellular Biology*, 32(22), 4523-4533.
- Khan, M. Y., Agarwal, S. K. & Ahmad, S. (1992) STRUCTURE ACTIVITY RELATIONSHIP IN BUFFALO SPLEEN CATHEPSIN-B. *Journal of Biochemistry*, 111(6), 732-735.
- Khan, Z. & Francis, G. E. (1987) CONTRASTING PATTERNS OF DNA STRAND BREAKAGE AND ADP-RIBOSYLATION DEPENDENT DNA LIGATION DURING GRANULOCYTE AND MONOCYTE DIFFERENTIATION. *Blood*, 69(4), 1114-1119.
- Kidd, V. (1998) Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annual Review of Physiology*, 60, 533-573.
- Kim, J. S., Chae, H. D., Choi, S. Y. & Kim, K. T. (1996) Transcriptional enhancement of tyrosine hydroxylase by prostaglandin E(2) in SK-N-BE(2)C cells. *Molecular Brain Research*, 39(1-2), 177-184.
- Kim, M., Murphy, K., Liu, F., Parker, S. E., Dowling, M. L., Baff, W. & Kao, G. D. (2005) Caspase-mediated specific cleavage of BubR1 is a determinant of mitotic progression. *Molecular and Cellular Biology*, 25(21), 9232-9248.

- Kim, M. S., Cheong, Y. P., So, H. S., Lee, K. M., Kim, T. Y., Jaymin, O., Chung, Y. T., Son, Y., Kim, B. R. & Park, R. (2001) Protective effects of morphine in peroxynitrite-induced apoptosis of primary rat neonatal astrocytes: potential involvement of G protein and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 kinase). *Biochemical Pharmacology*, 61(7), 779-786.
- Kim, Y. M., Talanian, R. V. & Billiar, T. R. (1997) Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 272(49), 31138-31148.
- Kingham, P. & Pocock, J. (2001) Microglial secreted cathepsin B induces neuronal apoptosis. *Journal of Neurochemistry*, 76(5), 1475-1484.
- Kole, A. J., Swahari, V., Hammond, S. M. & Deshmukh, M. (2011) miR-29b is activated during neuronal maturation and targets BH3-only genes to restrict apoptosis. *Genes & Development*, 25(2), 125-130.
- Kraig, R. P., Pulsinelli, W. A. & Plum, F. (1985) HYDROGEN-ION BUFFERING DURING COMPLETE BRAIN ISCHEMIA. *Brain Research*, 342(2), 281-290.
- Krantz, S. B. (1991) ERYTHROPOIETIN. *Blood*, 77(3), 419-434.
- Kudryashov, I. E., Yakovlev, A. A., Kudryashova, I. V. & Gulyaeva, N. V. (2002) Footshock stress alters early postnatal development of electrophysiological responses and caspase-3 activity in rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, 332(2), 95-98.
- Kudryashov, I. E., Yakovlev, A. A., Kudryashova, I. V. & Gulyaeva, N. V. (2003) Caspase-3 inhibition blocks long-term potentiation in hippocampal slices. *Zhurnal Vysshei Nervnoi Deyatelnosti Imeni I P Pavlova*, 53(5), 537-540.
- Kuida, K., Haydar, T., Kuan, C., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M., Rakic, P. & Flavell, R. (1998) Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking Caspase 9. *Cell*, 94(3), 325-337.
- Kuida, K., Zheng, T. S., Na, S. Q., Kuan, C. Y., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P. & Flavell, R. A. (1996) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*, 384(6607), 368-372.

- Kummer, T. T., Misgeld, T. & Sanes, J. R. (2006) Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: paradigm lost. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(1), 74-82.
- Kuo, C. T., Zhu, S., Younger, S., Jan, L. Y. & Jan, Y. N. (2006) Identification of E2/E3 ubiquitinating enzymes and caspase activity regulating *Drosophila* sensory neuron dendrite pruning. *Neuron*, 51(3), 283-290.
- Lamprecht, R. & LeDoux, J. (2004) Structural plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(1), 45-54.
- Larsen, B. D. & Megeney, L. A. (2010) Parole terms for a killer: Directing caspase3/CAD induced DNA strand breaks to coordinate changes in gene expression. *Cell Cycle*, 9(15), 2940-2945.
- Larsen, B. D., Rampalli, S., Burns, L. E., Brunette, S., Dilworth, F. J. & Megeney, L. A. (2010) Caspase 3/caspase-activated DNase promote cell differentiation by inducing DNA strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), 4230-4235.
- Laurent-Matha, V., Maruani-Herrmann, S., Prebois, C., Beaujouin, M., Glondu, M., Noel, A., Alvarez-Gonzalez, M. L., Blacher, S., Coopman, P., Baghdiguian, S., Gilles, C., Loncarek, J., Freiss, G., Vignon, F. & Liaudet-Coopman, E. (2005) Catalytically inactive human cathepsin D triggers fibroblast invasive growth. *Journal of Cell Biology*, 168(3), 489-499.
- Lee, A., Morrow, J. & Fowler, V. (2001) Caspase remodeling of the spectrin membrane skeleton during lens development and aging. *Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 20735-20742.
- Lee, H.-Y., Hwang, I.-Y., Im, H., Koh, J.-Y. & Kim, Y.-H. (2007) Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, 101(5), 1236-1247.
- Leist, M. & Nicotera, P. (1998) Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Experimental Cell Research*, 239(2), 183-201.

- Li, F., Huang, Q., Chen, J., Peng, Y., Roop, D. R., Bedford, J. S. & Li, C.-Y. (2010a) Apoptotic Cells Activate the "Phoenix Rising" Pathway to Promote Wound Healing and Tissue Regeneration. *Science Signaling*, 3(110).
- Li, Q., Zhao, X., Zhong, L.-J., Yang, H.-Y., Wang, Q. & Pu, X.-P. (2009) Effects of chronic morphine treatment on protein expression in rat dorsal root ganglia. *European Journal of Pharmacology*, 612(1-3), 21-28.
- Li, Z., Jo, J., Jia, J., Lo, S., Whitcomb, D., Jiao, S., Cho, K. & Sheng, M. (2010b) Caspase-3 Activation via Mitochondria Is Required for Long-Term Depression and AMPA Receptor Internalization. *Cell*, 141(5), 859-871.
- Lippens, S., Kockx, M., Knaapen, M., Mortier, L., Polakowska, R., Verheyen, A., Garmyn, M., Zwijsen, A., Formstecher, P., Huylebroeck, D., Vandenabeele, P. & Declercq, W. (2000) Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death and Differentiation*, 7(12), 1218-1224.
- Lipton, P. (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews*, 79(4), 1431-1568.
- Liu, X. S., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. D. (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 89(2), 175-184.
- Liu, Y., Guo, Y., An, S., Kuang, Y., He, X., Ma, H., Li, J., Lv, J., Zhang, N. & Jiang, C. (2013) Targeting Caspase-3 as Dual Therapeutic Benefits by RNAi Facilitating Brain-Targeted Nanoparticles in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Plos One*, 8(5).
- Liu, Y., Li, J., Yang, L., Ji, F., Bu, X., Zhang, N. & Zhang, B. (2008) Inhibition of PKC $\gamma$  membrane translocation mediated morphine preconditioning-induced neuroprotection against oxygen-glucose deprivation in the hippocampus slices of mice. *Neuroscience Letters*, 444(1), 87-91.
- Lo, A. S., Gorak-Stolinska, P., Bachy, V., Ibrahim, M. A., Kemeny, D. M. & Maher, J. (2007) Modulation of dendritic cell differentiation by colony-stimulating



- factor-1: role of phosphatidylinositol 3'-kinase and delayed caspase activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(6), 1446-1454.
- Lo, S.-C., Wang, Y., Weber, M., Larson, J. L., Scarce-Levie, K. & Sheng, M. (2015) Caspase-3 Deficiency Results in Disrupted Synaptic Homeostasis and Impaired Attention Control. *Journal of Neuroscience*, 35(5), 2118-2132.
- Los, M., Mozoluk, M., Ferrari, D., Stepczynska, A., Stroh, C., Renz, A., Herceg, Z., Wang, Z. Q. & Schulze-Osthoff, K. (2002) Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: A molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 13(3), 978-988.
- Los, M., Stroh, C., Janicke, R. U., Engels, I. H. & Schulze-Osthoff, K. (2001) Caspases: more than just killers? *Trends in Immunology*, 22(1), 31-34.
- Louneva, N., Cohen, J. W., Han, L.-Y., Talbot, K., Wilson, R. S., Bennett, D. A., Trojanowski, J. Q. & Arnold, S. E. (2008) Caspase-3 Is Enriched in Postsynaptic Densities and Increased in Alzheimer's Disease. *American Journal of Pathology*, 173(5), 1488-1495.
- Lu, C., Fu, W., Salvesen, G. & Mattson, M. (2002) Direct cleavage of AMPA receptor subunit GluR1 and suppression of AMPA currents by caspase-3 - Implications for synaptic plasticity and excitotoxic neuronal death. *Neuromolecular Medicine*, 1(1), 69-79.
- Lu, C. B., Wang, Y., Furukawa, K., Fu, W. M., Ouyang, X. & Mattson, M. P. (2006) Evidence that caspase-1 is a negative regulator of AMPA receptor-mediated long-term potentiation at hippocampal synapses. *Journal of Neurochemistry*, 97(4), 1104-1110.
- Luethi, A. U., Cullen, S. P., McNeela, E. A., Duriez, P. J., Afonina, I. S., Sheridan, C., Brumatti, G., Taylor, R. C., Kersse, K., Vandenabeele, P., Lavelle, E. C. & Martin, S. J. (2009) Suppression of Interleukin-33 Bioactivity through Proteolysis by Apoptotic Caspases. *Immunity*, 31(1), 84-98.

- Lupardus, P. J., Shen, A., Bogyo, M. & Garcia, K. C. (2008) Small molecule-induced allosteric activation of the *Vibrio cholerae* RTX cysteine protease domain. *Science*, 322(5899), 265-268.
- Luthi, A. & Martin, S. (2007) The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation*, 14(4), 641-650.
- Lynch, M. A. (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews*, 84(1), 87-136.
- Magnifico, S., Saias, L., Deleglise, B., Duplus, E., Kilinc, D., Miquel, M.-C., Viovy, J.-L., Brugg, B. & Peyrin, J.-M. (2013) NAD(+) acts on mitochondrial SirT3 to prevent axonal caspase activation and axonal degeneration. *Faseb Journal*, 27(12), 4712-4722.
- Mahrus, S., Trinidad, J. C., Barkan, D. T., Sali, A., Burlingame, A. L. & Wells, J. A. (2008) Global Sequencing of proteolytic cleavage sites in apoptosis by specific Labeling of protein N termini. *Cell*, 134(5), 866-876.
- Malenka, R. C. & Bear, M. F. (2004) ДП and ДД: An embarrassment of riches. *Neuron*, 44(1), 5-21.
- Mannick, J. B., Hausladen, A., Liu, L. M., Hess, D. T., Zeng, M., Miao, Q. X., Kane, L. S., Gow, A. J. & Stamler, J. S. (1999) Fas-induced caspase denitrosylation. *Science*, 284(5414), 651-654.
- Mao, J. R., Sung, B. K., Ji, R. R. & Lim, G. (2002) Chronic morphine induces downregulation of spinal glutamate transporters: Implications in morphine tolerance and abnormal pain sensitivity. *Journal of Neuroscience*, 22(18), 8312-8323.
- Mao, P., Smith, L., Xie, W. & Wang, M. (2013) Dying endothelial cells stimulate proliferation of malignant glioma cells via a caspase 3-mediated pathway. *Oncology Letters*, 5(5), 1615-1620.
- Mattson, M. & Duan, W. (1999) "Apoptotic" biochemical cascades in synaptic compartments: Roles in adaptive plasticity and neurodegenerative disorders. *Journal of Neuroscience Research*, 58(1), 152-166.

- Mattson, M. P., Keller, J. N. & Begley, J. G. (1998) Evidence for synaptic apoptosis. *Experimental Neurology*, 153(1), 35-48.
- McDonald, T. F., Pelzer, S., Trautwein, W. & Pelzer, D. J. (1994) REGULATION AND MODULATION OF CALCIUM CHANNELS IN CARDIAC, SKELETAL, AND SMOOTH-MUSCLE CELLS. *Physiological Reviews*, 74(2), 365-507.
- McLaughlin, B., Hartnett, K., Erhardt, J., Legos, J., White, R., Barone, F. & Aizenman, E. (2003) Caspase 3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(2), 715-720.
- McStay, G., Salvesen, G. & Green, D. (2008) Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways. *Cell Death and Differentiation*, 15(2), 322-331.
- Meng, F. J., Li, J. F., Zhang, B. X. & Ji, F. (2006) nPKC epsilon, and NMDA receptors participate in neuroprotection induced by morphine pretreatment. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology*, 18(2), 119-124.
- Meyer, E., Gahring, L. & Rogers, S. (2002) Nicotine preconditioning antagonizes activity-dependent caspase proteolysis of a glutamate receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(13), 10869-10875.
- Mihalik, R., Imre, G., Petak, I., Szende, B. & Kopper, L. (2004) Cathepsin B-independent abrogation of cell death by CA-074-OMe upstream of lysosomal breakdown. *Cell Death and Differentiation*, 11(12), 1357-1360.
- Miller, M. A., Karacay, B., Zhu, X., O'Dorisio, M. S. & Sandler, A. D. (2006) Caspase 8L, a novel inhibitory isoform of caspase 8, is associated with undifferentiated neuroblastoma. *Apoptosis*, 11(1), 15-24.
- Miraoui, H. & Marie, P. J. (2010) Pivotal role of Twist in skeletal biology and pathology. *Gene*, 468(1-2), 1-7.
- Miura, M., Chen, X. D., Allen, M. R., Bi, Y. M., Gronthos, S., Seo, B. M., Lakhani, S., Flavell, R. A., Feng, X. H., Robey, P. G., Young, M. & Shi, S. T. (2004) A

crucial role of caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells. *Journal of Clinical Investigation*, 114(12), 1704-1713.

Mizuno, K., Noda, K., Araki, T., Imaoka, T., Kobayashi, Y., Akita, Y., Shimonaka, M., Kishi, S. & Ohno, S. (1997) Proteolytic cleavage of protein kinase C isotypes, which generates kinase and regulatory fragments, correlates with Fas-mediated and 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-induced apoptosis. *European Journal of Biochemistry*, 250(1), 7-18.

Mnich, K., Carleton, L. A., Kavanagh, E. T., Doyle, K. M., Samali, A. & Gorman, A. M. (2014) Nerve growth factor-mediated inhibition of apoptosis post-caspase activation is due to removal of active caspase-3 in a lysosome-dependent manner. *Cell Death & Disease*, 5.

Mogi, M. & Togari, A. (2003) Activation of caspases is required for osteoblastic differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 47477-47482.

Montminy, M. R., Sevarino, K. A., Wagner, J. A., Mandel, G. & Goodman, R. H. (1986) IDENTIFICATION OF A CYCLIC-AMP-RESPONSIVE ELEMENT WITHIN THE RAT SOMATOSTATIN GENE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(18), 6682-6686.

Moron, J. A., Abul-Husn, N. S., Rozenfeld, R., Dolios, G., Wang, R. & Devi, L. A. (2007) Morphine administration alters the profile of hippocampal postsynaptic density-associated proteins - A proteomics study focusing on endocytic proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(1), 29-42.

Motoyama, N., Kimura, T., Takahashi, T., Watanabe, T. & Nakano, T. (1999) bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *Journal of Experimental Medicine*, 189(11), 1691-1698.

Mouledous, L., Neasta, J., Uttenweiler-Joseph, S., Stella, A., Matondo, M., Corbani, M., Monsarrat, B. & Meunier, J. C. (2005) Long-term morphine treatment enhances proteasome-dependent degradation of G beta in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Correlation with onset of adenylate cyclase sensitization. *Molecular Pharmacology*, 68(2), 467-476.

- Mukai, M., Kusama, T., Hamanaka, Y., Koga, T., Endo, H., Tatsuta, M. & Inoue, M. (2005) Cross talk between apoptosis and invasion signaling in cancer cells through caspase-3 activation. *Cancer Research*, 65(20), 9121-9125.
- Murray, T. V. A., McMahon, J. M., Howley, B. A., Stanley, A., Ritter, T., Mohr, A., Zwacka, R. & Fearnhead, H. O. (2008) A non-apoptotic role for caspase-9 in muscle differentiation. *Journal of Cell Science*, 121(22), 3786-3793.
- Nagai, T., Noda, Y., Ishikawa, K., Miyamoto, Y., Yoshimura, M., Ito, M., Takayanagi, M., Takuma, K., Yamada, K. & Nabeshima, T. (2005) The role of tissue plasminogen activator in methamphetamine-related reward and sensitization. *Journal of Neurochemistry*, 92(3), 660-667.
- Nagai, T., Yamada, K., Yoshimura, M., Ishikawa, K., Miyamoto, Y., Hashimoto, K., Noda, Y., Nitta, A. & Nabeshima, T. (2004) The tissue plasminogen activator-plasmin system participates in the rewarding effect of morphine by regulating dopamine release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), 3650-3655.
- Nagata, S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental Cell Research*, 256(1), 12-18.
- Nagerl, U. V., Eberhorn, N., Cambridge, S. B. & Bonhoeffer, T. (2004) Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron*, 44(5), 759-767.
- Nakamura, T., Wang, L., Wong, C., Scott, F., Eckelman, B., Han, X., Tzitzilonis, C., Meng, F., Gu, Z., Holland, E., Clemente, A., Okamoto, S., Salvesen, G., Riek, R., Yates, J. & Lipton, S. (2010) Transnitrosylation of XIAP Regulates Caspase-Dependent Neuronal Cell Death. *Molecular Cell*, 39(2), 184-195.
- Neasta, J., Uttenweiler-Joseph, S., Chaoui, K., Monsarrat, B., Meunier, J.-C. & Mouldous, L. (2006) Effect of long-term exposure of SH-SY5Y cells to morphine: a whole cell proteomic analysis. *Proteome Science*, 4.

- Nedergaard, M., Kraig, R. P., Tanabe, J. & Pulsinelli, W. A. (1991) DYNAMICS OF INTERSTITIAL AND INTRACELLULAR PH IN EVOLVING BRAIN INFARCT. *American Journal of Physiology*, 260(3), R581-R588.
- Netea, M. G., Lewis, E. C., Azam, T., Joosten, L. A. B., Jaekal, J., Bae, S.-Y., Dinarello, C. A. & Kim, S.-H. (2008) Interleukin-32 induces the differentiation of monocytes into macrophage-like cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(9), 3515-3520.
- Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A., Munday, N. A., Raju, S. M., Smulson, M. E., Yamin, T. T., Yu, V. L. & Miller, D. K. (1995) IDENTIFICATION AND INHIBITION OF THE ICE/CED-3 PROTEASE NECESSARY FOR MAMMALIAN APOPTOSIS. *Nature*, 376(6535), 37-43.
- Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D. D. M. & Tessier-Lavigne, M. (2009) APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature*, 457(7232), 981-U1.
- Nyman, M. & Whittaker, V. (1963) The distribution of adenosine triphosphate in subcellular fractions of brain tissue. *Biochemical Journal*, 87(2), 8.
- Obrenovitch, T. P. (2008) Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia. *Physiological Reviews*, 88(1), 211-247.
- Okuyama, R., Nguyen, B. C., Talora, C., Ogawa, E., di Vignano, A. T., Lioumi, M., Chiorino, G., Tagami, H., Woo, M. & Dotto, G. P. (2004) High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a notch1-caspase 3 regulatory mechanism. *Developmental Cell*, 6(4), 551-562.
- Olguin, H. C. (2011) Regulation of Pax7 protein levels by caspase-3 and proteasome activity in differentiating myoblasts. *Biological Research*, 44(4), 323-327.
- Onufriev, M., Lyzhin, A., Stepanichev, M., Khaspekov, L. & Gulyaeva, N. (2009) A Secreted Caspase-3-Substrate-Cleaving Activity at Low pH Belongs to

- Cathepsin B: a Study on Primary Brain Cell Cultures. *Journal of Neurochemistry*, 110, 22-23.
- Oomman, S., Finckbone, V., Dertien, J., Attridge, J., Henne, W., Medina, M., Mansouri, B., Singh, H., Strahlendorf, H. & Strahlendorf, J. (2004) Active caspase-3 expression during postnatal development of rat cerebellum is not systematically or consistently associated with apoptosis. *Journal of Comparative Neurology*, 476(2), 154-173.
- Oomman, S., Strahlendorf, H., Dertien, J. & Strahlendorf, J. (2006) Bergmann glia utilize active caspase-3 for differentiation. *Brain Research*, 1078, 19-34.
- Oomman, S., Strahlendorf, H., Finckbone, V. & Strahlendorf, J. (2005) Non-lethal active caspase-3 expression in Bergmann glia of postnatal rat cerebellum. *Developmental Brain Research*, 160(2), 130-145.
- Orth, K., Chinnaiyan, A. M., Garg, M., Froelich, C. J. & Dixit, V. M. (1996) The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *Journal of Biological Chemistry*, 271(28), 16443-16446.
- Pan, S. & Berk, B. C. (2007) Glutathiolation regulates tumor necrosis factor-alpha-induced caspase-3 cleavage and apoptosis - Key role for glutaredoxin in the death pathway. *Circulation Research*, 100(2), 213-219.
- Parcellier, A., Tintignac, L. A., Zhuravleva, E. & Hemmings, B. A. (2008) PKB and the mitochondria: AKTing on apoptosis. *Cellular Signalling*, 20(1), 21-30.
- Park, H.-A., Licznerski, P., Alavian, K. N., Shanabrough, M. & Jonas, E. A. (2015) Bcl-xL Is Necessary for Neurite Outgrowth in Hippocampal Neurons. *Antioxidants & Redox Signaling*, 22(2), 93-108.
- Peltier, J., O'Neill, A. & Schaffer, D. V. (2007) PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation. *Developmental Neurobiology*, 67(10), 1348-1361.
- Perry, D. K., Smyth, M. J., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Duriez, P., Poirier, G. G. & Hannun, Y. A. (1997) Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease,

- caspase-3 - A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18530-18533.
- Pevny, L., Simon, M. C., Robertson, E., Klein, W. H., Tsai, S. F., Dagati, V., Orkin, S. H. & Costantini, F. (1991) ERYTHROID-DIFFERENTIATION IN CHIMERIC MICE BLOCKED BY A TARGETED MUTATION IN THE GENE FOR TRANSCRIPTION FACTOR GATA-1. *Nature*, 349(6306), 257-260.
- Pinan-Lucarre, B., Gabel, C. V., Reina, C. P., Hulme, S. E., Shevkoplyas, S. S., Slone, R. D., Xue, J., Qiao, Y., Weisberg, S., Roodhouse, K., Sun, L., Whitesides, G. M., Samuel, A. & Driscoll, M. (2012) The Core Apoptotic Executioner Proteins CED-3 and CED-4 Promote Initiation of Neuronal Regeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Plos Biology*, 10(5).
- Pop, C. & Salvesen, G. (2009) Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(33), 21777-21781.
- Popovic, T., Puizdar, V., Ritonja, A. & Brzin, J. (1996) Simultaneous isolation of human kidney cathepsins B, H, L and C and their characterisation. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, 681(2), 251-262.
- Poreba, M., Strozyk, A., Salvesen, G. & Drag, M. (2013) Caspase Substrates and Inhibitors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(8).
- Porn-Ares, M. I., Samali, A. & Orrenius, S. (1998) Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 5(12), 1028-1033.
- Powell, W. C., Fingleton, B., Wilson, C. L., Boothby, M. & Matrisian, L. M. (1999) The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Current Biology*, 9(24), 1441-1447.
- Prasad, K. N., Hovland, A. R., La Rosa, F. G. & Hovland, P. G. (1998) Prostaglandins as putative neurotoxins in Alzheimer's disease. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 219(2), 120-125.
- Prokai, L., Zharikova, A. & Stevens, S. (2005) Effect of chronic morphine exposure on the synaptic plasma-membrane subproteome of rats: a quantitative protein



profiling study based on isotope-coded affinity tags and liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 40(2), 169-175.

Pugazhenthii, S., Nesterova, A., Sable, C., Heidenreich, K. A., Boxer, L. M., Heasley, L. E. & Reusch, J. E. B. (2000) Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 10761-10766.

Qi, J., Wu, A., Wang, D., Wang, L., Li, S. & Xu, F. (2004) Correlation between neuronal injury and Caspase-3 after focal ischemia in human hippocampus. *Chinese Medical Journal*, 117(10), 1507-1512.

Qiu, Z., Sylwestrak, E. L., Lieberman, D. N., Zhang, Y., Liu, X.-Y. & Ghosh, A. (2012) The Rett Syndrome Protein MeCP2 Regulates Synaptic Scaling. *Journal of Neuroscience*, 32(3), 989-994.

Qu, G., Yan, H. & Strauch, A. R. (1997) Actin isoform utilization during differentiation and remodeling of BC3H1 myogenic cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 67(4), 514-527.

Rambhia, S., Mantione, M. L., Stefano, G. B. & Cadet, P. (2005) Morphine modulation of the ubiquitin-proteasome complex is neuroprotective. *Medical Science Monitor*, 11(11), BR386-BR396.

Rautajoki, K. J., Marttila, E. M., Nyman, T. A. & Lahesmaa, R. (2007) Interleukin-4 inhibits caspase-3 by regulating several proteins in the Fas pathway during initial stages of human T helper 2 cell differentiation. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(2), 238-251.

Ravni, A., Vaudry, D., Gerdin, M. J., Eiden, M. V., Falluel-Morel, A., Gonzalez, B. J., Vaudry, H. & Eiden, L. E. (2008) A cAMP-dependent, protein kinase A-independent signaling pathway mediating neuritogenesis through Egr1 in PC12 cells. *Molecular Pharmacology*, 73(6), 1688-1708.

Rebe, C., Cathelin, S., Launay, S., Filomenko, R., Prevotat, L., L'Ollivier, C., Gyan, E., Micheau, O., Grant, S., Dubart-Kupperschmitt, A., Fontenay, M. & Solary, E.

- (2007) Caspase-8 prevents sustained activation of NF-kappa B in monocytes undergoing macrophagic differentiation. *Blood*, 109(4), 1442-1450.
- Ribeil, J.-A., Zermati, Y., Vandekerckhove, J., Cathelin, S., Kersual, J., Dussiot, M., Coulon, S., Moura, I. C., Zeuner, A., Kirkegaard-Sorensen, T., Varet, B., Solary, E., Garrido, C. & Hermine, O. (2007) Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*, 445(7123), 102-105.
- Riento, K. & Ridley, A. J. (2003) Rocks: Multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(6), 446-456.
- Robinson, T. E. & Kolb, B. (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology*, 47, 33-46.
- Rossiter, J. P., Anderson, L. L., Yang, F. & Cole, G. M. (2000) Caspase-cleaved actin (fractin) immunolabelling of Hirano bodies. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 26(4), 342-346.
- Rozman-Pungercar, J., Kopitar-Jerala, N., Bogyo, M., Turk, D., Vasiljeva, O., Stefe, I., Vandenabeele, P., Bromme, D., Puizdar, V., Fonovic, M., Trstenjak-Prebanda, M., Dolenc, I., Turk, V. & Turk, B. (2003) Inhibition of papain-like cysteine proteases and legumain by caspase-specific inhibitors: when reaction mechanism is more important than specificity. *Cell Death and Differentiation*, 10(8), 881-888.
- Ryan, R., Sloane, B., Sameni, M. & Wood, P. (1995) MICROGLIAL CATHEPSIN-B - AN IMMUNOLOGICAL EXAMINATION OF CELLULAR AND SECRETED SPECIES. *Journal of Neurochemistry*, 65(3), 1035-1045.
- Samraj, A. K., Keil, E., Ueffing, N., Schulze-Osthoff, K. & Schmitz, I. (2006) Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(40), 29652-29659.
- Sanchez, S., Jimenez, C., Carrera, A. C., Diaz-Nido, J., Avila, J. & Wandosell, F. (2004) A cAMP-activated pathway, including PKA and PI3K, regulates neuronal differentiation. *Neurochemistry International*, 44(4), 231-242.

- Santambrogio, L., Potalicchio, I., Fessler, S. P., Wong, S. H., Raposo, G. & Strominger, J. L. (2005) Involvement of caspase-cleaved and intact adaptor protein 1 complex in endosomal remodeling in maturing dendritic cells. *Nature Immunology*, 6(10), 1020-1028.
- Sappino, A. P., Madani, R., Huarte, J., Belin, D., Kiss, J. Z., Wohlwend, A. & Vassalli, J. D. (1993) EXTRACELLULAR PROTEOLYSIS IN THE ADULT MURINE BRAIN. *Journal of Clinical Investigation*, 92(2), 679-685.
- Scheer, J. M., Romanowski, M. J. & Wells, J. A. (2006) A common allosteric site and mechanism in caspases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(20), 7595-7600.
- Schile, A. J., Garcia-Fernandez, M. & Steller, H. (2008) Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity. *Genes & Development*, 22(16), 2256-2266.
- Schotte, P., Declercq, W., Van Huffel, S., Vandenabeele, P. & Beyaert, R. (1999) Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases. *Febs Letters*, 442(1), 117-121.
- Schwab, B., Guerini, D., Didszun, C., Bano, D., Ferrando-May, E., Fava, E., Tam, J., Xu, D., Xanthoudakis, S., Nicholson, D., Carafoli, E. & Nicotera, P. (2002) Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis. *Cell Death and Differentiation*, 9(8), 818-831.
- Seamon, K. B., Padgett, W. & Daly, J. W. (1981) FORSKOLIN - UNIQUE DITERPENE ACTIVATOR OF ADENYLATE-CYCLASE IN MEMBRANES AND IN INTACT-CELLS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 78(6), 3363-3367.
- Sheng, M. & Ertuerk, A. (2014) Long-term depression: a cell biological view. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 369(1633).
- Sheppard, A., Wu, J., Rutishauser, U. & Lynch, G. (1991) PROTEOLYTIC MODIFICATION OF NEURAL CELL-ADHESION MOLECULE (NCAM) BY THE INTRACELLULAR PROTEINASE CALPAIN. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1076(1), 156-160.

- Shimizu, K. & Sawasaki, T. (2013) Nek5, a novel substrate for caspase-3, promotes skeletal muscle differentiation by up-regulating caspase activity. *Febs Letters*, 587(14), 2219-2225.
- Shimohama, S., Tanino, H. & Fujimoto, S. (1999) Changes in caspase expression in Alzheimer's disease: Comparison with development and aging. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 256(2), 381-384.
- Shimohama, S., Tanino, H. & Fujimoto, S. (2001a) Differential expression of rat brain caspase family proteins during development and aging. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289(5), 1063-1066.
- Shimohama, S., Tanino, H. & Fujimoto, S. (2001b) Differential subcellular localization of caspase family proteins in the adult rat brain. *Neuroscience Letters*, 315(3), 125-128.
- Shiozaki, E. N., Chai, J. J. & Shi, Y. (2002) Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(7), 4197-4202.
- Siesjo, B. K., Katsura, K. & Kristian, T. (1996) Acidosis-related damage. *Cellular and Molecular Mechanisms of Ischemic Brain Damage*, 71, 209-236.
- Simon, D. J., Weimer, R. M., McLaughlin, T., Kallop, D., Stanger, K., Yang, J., O'Leary, D. D. M., Hannoush, R. N. & Tessier-Lavigne, M. (2012) A Caspase Cascade Regulating Developmental Axon Degeneration. *Journal of Neuroscience*, 32(49), 17540-17553.
- Smillie, K. J. & Cousin, M. A. (2012) Akt/PKB Controls the Activity-Dependent Bulk Endocytosis of Synaptic Vesicles. *Traffic*, 13(7), 1004-1011.
- Soden, M. E. & Chen, L. (2010) Fragile X Protein FMRP Is Required for Homeostatic Plasticity and Regulation of Synaptic Strength by Retinoic Acid. *Journal of Neuroscience*, 30(50), 16910-16921.
- Sordet, O., Rebe, C., Plenchette, S., Zermati, Y., Hermine, O., Vainchenker, W., Garrido, C., Solary, E. & Dubrez-Daloz, L. (2002) Specific involvement of

- caspsases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood*, 100(13), 4446-4453.
- Spada, A. (1998) Growth factors and human pituitary adenomas. *European Journal of Endocrinology*, 138(3), 255-257.
- Spencer, S. L., Gaudet, S., Albeck, J. G., Burke, J. M. & Sorger, P. K. (2009) Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature*, 459(7245), 428-U144.
- Stanger, K., Steffek, M., Zhou, L., Pozniak, C. D., Quan, C., Franke, Y., Tom, J., Tam, C., Elliott, J. M., Lewcock, J. W., Zhang, Y., Murray, J. & Hannoush, R. N. (2012) Allosteric peptides bind a caspase zymogen and mediate caspase tetramerization. *Nature Chemical Biology*, 8(7), 655-660.
- Stennicke, H. R. & Salvesen, G. S. (1997) Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *Journal of Biological Chemistry*, 272(41), 25719-25723.
- Stepanichev, M., Kudryashova, I., Yakovlev, A., Onufriev, M., Khaspekov, L., Lyzhin, A., Lazareva, N. & Gulyaeva, N. (2005) Central administration of a caspase inhibitor impairs shuttle-box performance in rats. *Neuroscience*, 136(2), 579-591.
- Stork, P. J. S. & Schmitt, J. M. (2002) Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends in Cell Biology*, 12(6), 258-266.
- Suberbielle, E., Sanchez, P. E., Kravitz, A. V., Wang, X., Ho, K., Eilertson, K., Devidze, N., Kreitzer, A. C. & Mucke, L. (2013) Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid-beta. *Nature Neuroscience*, 16(5), 613-+.
- Sun, M., Zhao, Y. & Xu, C. (2008) Cross-talk between calpain and caspase-3 in penumbra and core during focal cerebral ischemia-reperfusion. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 28(1), 71-85.

- Sun, N., Hao, J. R., Li, X. Y., Yin, X. H., Zong, Y. Y., Zhang, G. Y. & Gao, C. (2013) GluR6-FasL-Trx2 mediates denitrosylation and activation of procaspase-3 in cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Cell Death & Disease*, 4.
- Tanaka, C. & Nishizuka, Y. (1994) THE PROTEIN-KINASE-C FAMILY FOR NEURONAL SIGNALING. *Annual Review of Neuroscience*, 17, 551-567.
- Tasken, K. & Aandahl, E. M. (2004) Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiological Reviews*, 84(1), 137-167.
- Tawa, P., Hell, K., Giroux, A., Grimm, E., Han, Y., Nicholson, D. W. & Xanthoudakis, S. (2004) Catalytic activity of caspase-3 is required for its degradation: stabilization of the active complex by synthetic inhibitors. *Cell Death and Differentiation*, 11(4), 439-447.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), 231-241.
- Thornberry, N. (1997) Structure, function and inhibition of the caspase family of cysteine proteases. *Faseb Journal*, 11(9), A1444-A1444.
- Thornberry, N. & Lazebnik, Y. (1998) Caspases: Enemies within. *Science*, 281(5381), 1312-1316.
- Tombaugh, G. C. & Sapolsky, R. M. (1993) EVOLVING CONCEPTS ABOUT THE ROLE OF ACIDOSIS IN ISCHEMIC NEUROPATHOLOGY. *Journal of Neurochemistry*, 61(3), 793-803.
- Toro, R., Konyukh, M., Delorme, R., Leblond, C., Chaste, P., Fauchereau, F., Coleman, M., Leboyer, M., Gillberg, C. & Bourgeron, T. (2010) Key role for gene dosage and synaptic homeostasis in autism spectrum disorders. *Trends in Genetics*, 26(8), 363-372.
- Tremblay, R. G., Sikorska, M., Sandhu, J. K., Lanthier, P., Ribocco-Lutkiewicz, M. & Bani-Yaghoub, M. (2010) Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, 186(1), 60-67.
- Troy, C. & Salvesen, G. (2002) Caspases on the brain. *Journal of Neuroscience Research*, 69(2), 145-150.

- Tschopp, J., Irmeler, M. & Thome, M. (1998) Inhibition of Fas death signals by FLIPs. *Current Opinion in Immunology*, 10(5), 552-558.
- Turk, B., Turk, V. & Turk, D. (1997) Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biological Chemistry*, 378(3-4), 141-150.
- Tzeng, T., Tsay, H., Chang, L., Hsu, C., Lai, T., Huang, F. & Shiao, Y. (2013) Caspase 3 involves in neuroplasticity, microglial activation and neurogenesis in the mice hippocampus after intracerebral injection of kainic acid. *Journal of Biomedical Science*, 20.
- Unal-Cevik, I., Kilinc, M., Can, A., Gursoy-Ozdemir, Y. & Dalkara, T. (2004) Apoptotic and necrotic death mechanisms are concomitantly activated in the same cell after cerebral ischemia. *Stroke*, 35(9), 2189-2194.
- Unsain, N. & Barker, P. A. (2015) New Views on the Misconstrued: Executioner Caspases and Their Diverse Non-apoptotic Roles. *Neuron*, 88(3), 461-474.
- Unsain, N., Higgins, J. M., Parker, K. N., Johnstone, A. D. & Barker, P. A. (2013) XIAP Regulates Caspase Activity in Degenerating Axons. *Cell Reports*, 4(4), 751-763.
- Uruse, K., Kouroku, Y., Fujita, E. & Momoi, T. (2003) Region of caspase-3 activation and programmed cell death in the early development of the mouse forebrain. *Developmental Brain Research*, 145(2), 241-248.
- Van Damme, P., Martens, L., Van Damme, J., Hugelier, K., Staes, A., Vandekerckhove, J. & Gevaert, K. (2005) Caspase-specific and nonspecific in vivo protein processing during Fas-induced apoptosis. *Nature Methods*, 2(10), 771-777.
- van den Eijnde, S. M., van den Hoff, M. J. B., Reutelingsperger, C. P. M., van Heerde, W. L., Henfling, M. E. R., Vermeij-Keers, C., Schutte, B., Borgers, M. & Ramaekers, F. C. S. (2001) Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation. *Journal of Cell Science*, 114(20), 3631-3642.

- van Nierop, K., Muller, F. J. M., Stap, J., Van Noorden, C. J. F., van Eijk, M. & de Groot, C. (2006) Lysosomal destabilization contributes to apoptosis of germinal center B-lymphocytes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 54(12), 1425-1435.
- Vanags, D. M., PornAres, M. I., Coppola, S., Burgess, D. H. & Orrenius, S. (1996) Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 271(49), 31075-31085.
- Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., Brodianski, V. M., Kemper, O. C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K. B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P. & Wallach, D. (1998) Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*, 9(2), 267-276.
- Verspurten, J., Gevaert, K., Declercq, W. & Vandenabeele, P. (2009) SitePredicting the cleavage of proteinase substrates. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(7), 319-323.
- Vortherms, T. A. & Watts, V. J. (2004) Sensitization of neuronal A(2A) adenosine receptors after persistent D-2 dopamine receptor activation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 308(1), 221-227.
- Voss, O. H., Kim, S., Wewers, M. D. & Doseff, A. I. (2005) Regulation of monocyte apoptosis by the protein kinase C delta-dependent phosphorylation of caspase-3. *Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 17371-17379.
- Walsh, J., Cullen, S., Sheridan, C., Luthi, A., Gerner, C. & Martin, S. (2008) Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(35), 12815-12819.
- Wang, J.-Y., Chen, F., Fu, X.-Q., Ding, C.-S., Zhou, L., Zhang, X.-H. & Luo, Z.-G. (2014) Caspase-3 Cleavage of Dishevelled Induces Elimination of Postsynaptic Structures. *Developmental Cell*, 28(6), 670-684.



- Wang, J. T., Medress, Z. A. & Barres, B. A. (2012) Axon degeneration: Molecular mechanisms of a self-destruction pathway. *Journal of Cell Biology*, 196(1), 7-18.
- Wang, K. K. W., Posmantur, R., Nadimpalli, R., Nath, R., Mohan, P., Nixon, R. A., Talanian, R. V., Keegan, M., Herzog, L. & Allen, H. (1998) Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 356(2), 187-196.
- Weber, G. F. & Menko, A. S. (2005) The canonical intrinsic mitochondrial death pathway has a non-apoptotic role in signaling lens cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(23), 22135-22145.
- Wei, X. W., Yan, H., Xu, B., Wu, Y. P., Li, C. & Zhang, G. Y. (2012) Neuroprotection of co-activation of GABA receptors by preventing caspase-3 denitrosylation in KA-induced seizures. *Brain Research Bulletin*, 88(6), 617-623.
- Weil, M., Raff, M. C. & Braga, V. M. M. (1999) Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Current Biology*, 9(7), 361-364.
- Westphal, D., Sytnyk, V., Schachner, M. & Leshchyns'ka, I. (2010) Clustering of the Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) at the Neuronal Cell Surface Induces Caspase-8- and -3-dependent Changes of the Spectrin Meshwork Required for NCAM-mediated Neurite Outgrowth. *Journal of Biological Chemistry*, 285(53), 42046-42057.
- White, M. J., McArthur, K., Metcalf, D., Lane, R. M., Cambier, J. C., Herold, M. J., van Delft, M. F., Bedoui, S., Lessene, G., Ritchie, M. E., Huang, D. C. S. & Kile, B. T. (2014) Apoptotic Caspases Suppress mtDNA-Induced STING-Mediated Type I IFN Production. *Cell*, 159(7), 1549-1562.
- Widmann, C., Gerwins, P., Johnson, L., Jarpe, M. B. & Johnson, G. L. (1998) MEK kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 18(4), 2416-2429.
- Williams, D. W., Kondo, S., Krzyzanowska, A., Hiromi, Y. & Truman, J. W. (2006) Local caspase activity directs engulfment of dendrites during pruning. *Nature Neuroscience*, 9(10), 1234-1236.

- Williams, J. T., Christie, M. J. & Manzoni, O. (2001) Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiological Reviews*, 81(1), 299-343.
- Wolf, B., Schuler, M., Echeverri, F. & Green, D. (1999) Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 274(43), 30651-30656.
- Wood, D. E. & Newcomb, E. W. (1999) Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 274(12), 8309-8315.
- Wright, K. M., Smith, M. I., Farrag, L. & Deshmukh, M. (2007) Chromatin modification of Apaf-1 restricts the apoptotic pathway in mature neurons. *Journal of Cell Biology*, 179(5), 825-832.
- Xiao, R., Ferry, A. L. & Dupont-Versteegden, E. E. (2011) Cell death-resistance of differentiated myotubes is associated with enhanced anti-apoptotic mechanisms compared to myoblasts. *Apoptosis*, 16(3), 221-234.
- Yagamihiromasa, T., Sato, T., Kurisaki, T., Kamijo, K., Nabeshima, Y. & Fujisawasehara, A. (1995) A METALLOPROTEASE-DISINTEGRIN PARTICIPATING IN MYOBLAST FUSION. *Nature*, 377(6550), 652-656.
- Yakovlev, A., Kvichansky, A., Lyzhin, A., Khaspekov, L. & Gulyaeva, N. (2013a) Glutamate treatment and preconditioning differently affect cathepsin B release and intracellular proteases in primary cultures of cerebellar granular cells. *Neurochemical Journal*, 7(2), 111-120.
- Yakovlev, A., Lyzhin, A., Khaspekov, L. & Gulyaeva, N. (2010) Use of Crosslinkers for the Identification of Intracellular Partners of Caspase-3. *Neurochemical Journal*, 4(3), 185-188.
- Yakovlev, A., Ota, K., Wang, G., Movsesyan, V., Bao, W., Yoshihara, K. & Faden, A. (2001) Differential expression of apoptotic protease-activating factor-1 and caspase-3 genes and susceptibility to apoptosis during brain development and after traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience*, 21(19), 7439-7446.

- Yakovlev, A. A., Gorokhovatsky, A. Y., Onufriev, M. V., Beletsky, I. P. & Gulyaeva, N. V. (2008) Brain cathepsin B cleaves a caspase substrate. *Biochemistry-Moscow*, 73(3), 332-336.
- Yakovlev, A. A. & Gulyaeva, N. V. (2011) Pleiotropic functions of brain proteinases: Methodological considerations and search for caspase substrates. *Biochemistry-Moscow*, 76(10), 1079-1086.
- Yakovlev, A. A. & Gulyaeva, N. V. (2015) Possible role of proteases in preconditioning of brain cells to pathological conditions. *Biochemistry-Moscow*, 80(2), 163-171.
- Yakovlev, A. A., Kvichansky, A. A., Lyzhin, A. A., Khaspekov, L. G. & Gulyaeva, N. V. (2013b) Glutamate treatment and preconditioning differently affect cathepsin B release and intracellular proteases in primary cultures of cerebellar granular cells. *Neurochemical Journal*, 7(2), 111-120.
- Yamada, K., Nagai, T. & Nabeshima, T. (2005) Drug dependence, synaptic plasticity, and tissue plasminogen activator. *Journal of Pharmacological Sciences*, 97(2), 157-161.
- Yamamoto-Tanaka, M., Makino, T., Motoyama, A., Miyai, M., Tsuboi, R. & Hibino, T. (2014) Multiple pathways are involved in DNA degradation during keratinocyte terminal differentiation. *Cell Death & Disease*, 5.
- Yan, X., Najbauer, J., Woo, C., Dashtipour, K., Ribak, C. & Leon, M. (2001) Expression of active caspase-3 in mitotic and postmitotic cells of the rat forebrain. *Journal of Comparative Neurology*, 433(1), 4-22.
- Yanase, N., Ohshima, K., Ikegami, H. & Mizuguchi, J. (2000) Cytochrome c release, mitochondrial membrane depolarization, caspase-3 activation, and Bax-alpha cleavage during IFN-alpha-induced apoptosis in Daudi B lymphoma cells. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 20(12), 1121-1129.
- Yang, J., Dominguez, B., de Winter, F., Gould, T. W., Eriksson, J. E. & Lee, K.-F. (2011) Nestin negatively regulates postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature Neuroscience*, 14(3), 324-330.

- Yang, J. Y., Michod, D., Walicki, J., Murphy, B. A., Kasibhatla, S., Martin, S. J. & Widmann, C. (2004) Partial cleavage of RasGAP by caspases is required for cell survival in mild stress conditions. *Molecular and Cellular Biology*, 24(23), 10425-10436.
- Yang, J. Y., Walicki, J., Michod, D., Dubuis, G. & Widmann, C. (2005) Impaired Akt activity down-modulation, caspase-3 activation, and apoptosis in cells expressing a caspase-resistant mutant of RasGAP at position 157. *Molecular Biology of the Cell*, 16(8), 3511-3520.
- Yang, J. Y. & Widmann, C. (2001) Antiapoptotic signaling generated by caspase-induced cleavage of RasGAP. *Molecular and Cellular Biology*, 21(16), 5346-5358.
- Yang, J. Y. & Widmann, C. (2002) The RasGAP N-terminal fragment generated by caspase cleavage protects cells in a Ras/PI3K/Akt-dependent manner that does not rely on NF kappa B activation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(17), 14641-14646.
- Yang, Y., Fang, S. Y., Jensen, J. P., Weissman, A. M. & Ashwell, J. D. (2000) Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science*, 288(5467), 874-877.
- Yeh, W. C., de la Pompa, J. L., McCurrach, M. E., Shu, H. B., Elia, A. J., Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., El-Deiry, W. S., Lowe, S. W., Goeddel, D. V. & Mak, T. W. (1998) FADD: Essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science*, 279(5358), 1954-1958.
- Yin, D., Woodruff, M., Zhang, Y., Whaley, S., Miao, J., Ferslew, K., Zhao, J. & Stuart, C. (2006) Morphine promotes Jurkat cell apoptosis through pro-apoptotic FADD/P53 and anti-apoptotic PI3K/Akt/NF-kappa B pathways. *Journal of Neuroimmunology*, 174(1-2), 101-107.
- Yuan, B. Z., Chapman, J. & Reynolds, S. H. (2009) Proteasome inhibitors induce apoptosis in human lung cancer cells through a positive feedback mechanism and the subsequent Mcl-1 protein cleavage. *Oncogene*, 28(43), 3775-3786.

- Yuan, J. & Yankner, B. (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407(6805), 802-809.
- Yun, N., Lee, Y. & Oh, Y. (2009) The Identification Of Potential Caspase-3 Substrates: Involvement Of Anamorsin Cleavage In Models Of Neurodegenerative Diseases. *Journal of Neurochemistry*, 110, 207-208.
- Yung, H. S., Lai, K. H., Chow, K. B. S., Ip, N. Y., Tsim, K. W. K., Wong, Y. H., Wu, Z. & Wise, H. (2010) Nerve Growth Factor-Induced Differentiation of PC12 Cells Is Accompanied by Elevated Adenylyl Cyclase Activity. *Neurosignals*, 18(1), 32-42.
- Zandy, A. J., Lakhani, S., Zheng, T., Flavell, R. A. & Bassnett, S. (2005) Role of the executioner caspases during lens development. *Journal of Biological Chemistry*, 280(34), 30263-30272.
- Zarubin, T. & Han, J. H. (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research*, 15(1), 11-18.
- Zermati, Y., Garrido, C., Amsellem, S., Fishelson, S., Bouscary, D., Valensi, F., Varet, B., Solary, E. & Hermine, O. (2001) Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *Journal of Experimental Medicine*, 193(2), 247-254.
- Zhang, Y. J., Center, D. M., Wu, D. M. H., Cruikshank, W. W., Yuan, J. Y., Andrews, D. W. & Kornfeld, H. (1998) Processing and activation of pro-interleukin-16 by caspase-3. *Journal of Biological Chemistry*, 273(2), 1144-1149.
- Zhao, P., Huang, Y. & Zuo, Z. (2006) Opioid preconditioning induces opioid receptor-dependent delayed neuroprotection against ischemia in rats. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 65(10), 945-952.
- Zhou, B. B., Li, H. L., Yuan, J. Y. & Kirschner, M. W. (1998a) Caspase-dependent activation of cyclin-dependent kinases during fas-induced apoptosis in Jurkat cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 6785-6790.

Zhou, Q., Homma, K. J. & Poo, M. M. (2004) Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*, 44(5), 749-757.

Zhou, Q., Krebs, J. F., Snipas, S. J., Price, A., Alnemri, E. S., Tomaselli, K. J. & Salvesen, G. S. (1998b) Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex. *Biochemistry*, 37(30), 10757-10765.

Давыдова О.Н., Яковлев А.А., Лыжин А.А., Хаспеков Л.Г. & Н.В., Г. (2010) Депривация ростовых факторов приводит к специфическому повышению экспрессии мРНК рецептора par-2 в первичных клеточных культурах мозжечка. *Нейрохимия*, 27(4), 6.

Онуфриев М.В., Яковлев А.А., Лыжин А.А., Степаничев М.Ю., Хаспеков Л.Г. & Н.В., Г. (2009) Секретируемая каспаза-3-подобная активность при кислых значениях рН принадлежит катепсину В: исследование на первичных клеточных культурах мозга.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кудряшов И.Е., Яковлев А.А., Кудряшова И.В., Гуляева Н.В. Ингибирование каспазы-3 блокирует длительную потенциацию в срезах гиппокампа. Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова, 2003, том 53, № 5, с. 537-540. (Kudryashov I.E., Yakovlev A.A., Kudryashova I.V., Gulyaeva N.V. Inhibition of caspase-3 blocks long-term potentiation in hippocampal slices. Neuroscience and behavioral physiology. 2004. V. 34. N 9. P. 877-880).
2. Яковлев А.А., Перегуд Д.И., Пирожков С.В., Гуляева Н.В., Панченко Л.Ф. Активация каспазы-3 в отделах мозга крыс после однократного введения морфина. Наркология, 2004, № 9, с. 26-28.
3. Stepanichev M.Y., Kudryashova I.V., Yakovlev A.A., Onufriev M.V., Khaspekov L.G., Lyzhin A.A., Lazareva N.A., Gulyaeva N.V. Central administration of a caspase inhibitor impairs shuttle-box performance in rats. Neuroscience. 2005. V. 136. N 2. P. 579-591.
4. Степаничев М.Ю., Кудряшова И.В., Яковлев А.А., Воронцова О.Н., Лазарева Н.А., Гуляева Н.В. Исследование влияния интрацеребровентрикулярного введения ингибитора каспазы-3 Z-DEVD-FMK на поведение крыс. Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова, 2006, Т. 56, № 2, с. 247-256.
5. Яковлев А.А., Гороховатский А.Ю., Онуфриев М.В., Белецкий И.П., Гуляева Н.В. Катепсин мозга способен расщеплять субстрат каспазы. Биохимия. 2008.Т. 73.№ 3. с. 408-413. (Yakovlev A.A., Gorokhovatsky A.Y., Onufriev M.V., Beletsky I.P., Gulyaeva N.V. Brain cathepsin B cleaves a caspase substrate. Biochemistry (Mosc). 2008. V. 73. N. 3. P. 332-336.)
6. Онуфриев М.В., Яковлев А.А., Лыжин А.А., Степаничев М.Ю., Хаспеков Л.Г., Гуляева Н.В. Секретируемая каспаза-3-подобная активность при кислых значениях рН принадлежит катепсину В: исследование на первичных клеточных культурах мозга. Биохимия. 2009.Т. 74.№ 3.с. 346-354.

(Onufriev M.V., Yakovlev A.A., Lyzhin A.A., Stepanichev M.Yu., Khaspekov L.G., Gulyaeva N.V. A secreted caspase-3-substrate-cleaving activity at low pH belongs to cathepsin B: a study on primary brain cell cultures. *Biochemistry (Mosc)*. 2009. V. 74. N. 3. P. 281-287.)

7. Яковлев А.А. Кросс-линкеры и их использование для исследования межмолекулярных взаимодействий. *Нейрохимия*. 2009. Т. 26. № 2. с. 149-155. (Yakovlev A.A. Crosslinkers and their utilization for studies of intermolecular interactions. *Neurochem. J.* 2009. V. 3. N. 2. P. 139-144.)

8. Давыдова О.Н., Яковлев А.А. Активируемые протеазами рецепторы и нейропластичность: PAR рецепторы как возможная мишень для катепсина В. *Нейрохимия*. 2010. Т. 27. № 1. с. 1-9. (Davydova O.N., Yakovlev A.A. Protease-activated receptors and neuroplasticity: Protease-activated receptors as a possible target for cathepsin B. *Neurochem. J.* 2010. V. 4. N. 1. P. 1-7.)

9. Яковлев А.А., Лыжин А.А., Хаспеков Л.Г., Гуляева Н.В. Использование кросс-линкеров для идентификации внутриклеточных партнеров каспазы-3. *Нейрохимия*. 2010. Т. 27. № 3. с. 209-213. (Yakovlev A.A., Lyzhin A.A., Khaspekov L.G., Gulyaeva N.V. Use of crosslinkers for the identification of intracellular partners of caspase-3. *Neurochem. J.* 2010. V. 4. N. 3. P. 185-188.)

10. Давыдова О.Н., Яковлев А.А., Лыжин А.А., Хаспеков Л.Г., Гуляева Н.В. Депривация ростовых факторов приводит к специфическому повышению экспрессии мРНК рецептора PAR-2 в первичных клеточных культурах мозжечка. *Нейрохимия*. 2010. Т. 27. № 4. с. 309-314. (Davydova O.N., Yakovlev A.A., Lyzhin A.A., Khaspekov L.G., Gulyaeva N.V. Growth factors deprivation induces a specific increase in PAR2 receptor mRNA expression in primary cerebellar cultures. *Neurochem. J.* 2010. V. 4. N. 3. P. 279-283.)

11. Яковлев А.А., Перегуд Д.И., Панченко Л.Ф., Гуляева Н.В. Внутриклеточные протеолитические системы мозга в механизмах действия опиатов: каспазы. *Нейрохимия*. 2011. Т. 28. № 4. с. 1-6. (Yakovlev A.A.,



Peregud D.I., Panchenko L.F., Gulyaeva N.V. Involvement of Brain Intracellular Proteolytic Systems in the Effects of Opiates: Caspases. *Neurochem. J.* 2011. V. 5. N. 4. P. 240-244.)

12. Яковлев А.А., Гуляева Н.В. Исследование плейотропных функций протеиназ мозга: методические подходы и поиск субстратов каспазы. *Биохимия.* 2011.Т. 76.№ 10. с. 1325-1334. (Yakovlev A.A., Gulyaeva N.V. Pleiotropic Functions of Brain Proteinases: Methodological Considerations and Search for Caspase Substrates. *Biochemistry (Mosc).* 2011. V. 76. N. 10. P. 1079-1086.)

13. Яковлев А.А., Гороховатский А.Ю., Тризна Ю.А., Белецкий И.П., Гуляева Н.В. Протеасома может расщеплять каспазы-3. *Нейрохимия.* 2012. Т.29. № 3. с. 1-4. (Yakovlev A.A., Gorokhovatsky A.Y., Trizna Yu.A., Beletsky I.P., Gulyaeva N.V. The Proteasome Can Cleave a Caspase-3 Substrate. *Neurochem. J.* 2012. V. 6. N. 3. P. 261-264.)

14. Yakovlev A.A., Kvichansky A.A., Lyzhin A.A., Khaspekov L.G., Gulyaeva N.V. Glutamate treatment and preconditioning differently affect cathepsin B release and intracellular proteases in primary cultures of cerebellar granular cells. *Нейрохимия.* 2013. Т. 30. № 2. С. 117-120.

15. Яковлев А.А., Гуляева Н.В. Прекондиционирование клеток мозга патологическим воздействиям: вовлеченность протеаз. *Биохимия.* 2015. Т. 80. № 2. С. 204-213. (Yakovlev A.A., Gulyaeva N.V. Possible role of proteases in preconditioning of brain cells to pathological conditions. *Biochemistry (Mosc).* 2015. V. 80. № 2. P. 163-171).