

УДК 577.24

# Решение «ЖИЗНЬ-ИЛИ-СМЕРТЬ» в системе CD95: основные про- и антиапоптозные модуляторы

И. Лаврик<sup>#</sup>, П. Краммер

Отдел Иммуногенетики, Немецкий Центр Исследований Рака, Гейдельберг, Германия

<sup>#</sup> e-mail: i.lavrik@dkfz-heidelberg.de

**РЕФЕРАТ** Апоптоз (программируемая клеточная смерть) является неотъемлемым свойством многоклеточных организмов. Существует два основных сигнальных пути инициации апоптоза: т.н. внешний, передаваемый через рецепторы смерти (death receptors, DR), и внутренний (митохондриальный). CD95 (Fas/APO-1) является одним из рецепторов смерти. Данный обзор посвящен механизмам передачи сигнала апоптоза через CD95 (Fas/APO-1) и свойствам ключевых белков апоптоза, содержащих эффекторный домен смерти (Death Effector Domain, DED): про-апоптотического белка прокаспазы-8 и анти-апоптотического белка (с-FLIP). Нарушение передачи сигнала апоптоза характерно для многих болезней, в т. ч. и для аутоиммунных заболеваний, а также для рака и СПИДа, поэтому изучение апоптоза имеет важнейшее значение для борьбы с этими заболеваниями.

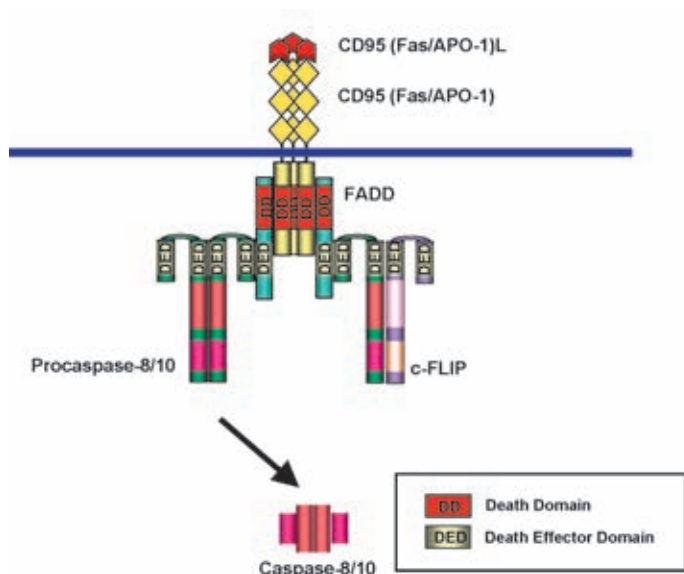
## ВВЕДЕНИЕ

Передача сигнала через CD95.

Белок CD95 (называемый также APO-1, Fas, fas antigen, TNFRSF6 и APT1) является представителем семейства рецепторов смерти, которое, в свою очередь, входит в состав суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей [1]. Цитоплазматическая часть рецепторов смерти содержит т. н. домены смерти (Death Domain, DD) [2, 3]. Домен смерти – это структурный мотив длиной около 80-100 аминокислотных остатков, который играет важную роль в передаче сигнала апоптоза. Домен смерти вместе с эффекторным доменом смерти (DED) и доменом активации и рекрутирования каспазы (CARD, caspase recruitment domain) по структурным характеристикам объединяют в суперсемейство домена смерти. Каждый из этих мотивов способен участвовать в т. н. гомотипических или однотипных белок-белковых взаимодействиях. При гомотипическом или однотипном взаимодействии домен смерти взаимодействует с другим доменом смерти (соответственно, CARD с CARD;

DD с DD) за счет шести антипараллельных  $\alpha$ -спиральных участков, которые входят в состав этих структурных мотивов.

Инициация апоптоза через рецептор CD95 происходит при связывании CD95 лиганда, CD95L (CD178) [4] или агонистических антител, таких как анти-APO-1 [5], с рецептором. При этом на клеточной мембране происходит формирование рецепторного комплекса, называемого сигнальным комплексом, индуцирующего клеточную смерть (death-inducing signaling complex, DISC) [6]. DISC состоит из рецепторов, которые, вероятно, образуют олигомерные структуры, белка-адаптера FADD/MORT1 (Fas-Associated Death Domain, Fas-ассоциированный домен смерти), прокаспазы-8 (FLICE, MACH, Mch5), прокаспазы-10 и белка с-FLIP (cellular FLICE inhibitory proteins, клеточные белки-ингибиторы FLICE) (рис. 1) [7-9]. Все белок-белковые взаимодействия в комплексе DISC основаны на гомотипических контактах. Белок-адаптер FADD связывается с рецептором CD95 за счет взаимодействий между доменами смер-



**Рис. 1.** Сигнальный комплекс, индуцирующий клеточную смерть (death-inducing signaling complex, DISC). DISC состоит из CD95 (изображено желтым), белка-адаптера FADD/MORT1 (Fas-Associated Death Domain, Fas-ассоциированный домен смерти) (изображено светло-голубым), про-каспазы-8/10 (изображено зеленым) и белка c-FLIP (cellular FLICE inhibitory proteins, клеточные белки-ингибиторы FLICE) (изображено фиолетовым). Домен смерти (DD) показан красным, эффекторный домен смерти (DED) показан светло-желтым

ти. Поскольку FADD также содержит эффекторный домен смерти, DED, именно за счет взаимодействий этого домена с DED доменами прокаспазы-8, прокаспазы-10 и c-FLIP происходит связывание в рецепторный комплекс DISC данных белков. После связывания в рецепторный комплекс прокаспазы-8 подвергается аутопротелитической активации с образованием активной формы каспазы-8. На следующих этапах апоптоза каспаза-8 расщепляет эффекторные каспазы-3, -6 и -7. При этом происходит активация каспаз-3, -6 и -7. За этим следует расщепление субстратов каспаз, которые представляют собой сотни клеточных белков, необходимых для нормального функционирования клетки. Их разрушение приводит к гибели клетки.

Белки комплекса DISC, содержащие эффекторный домен смерти, DED, играют центральную роль в регуляции апоптоза. Активация прокаспазы-8 в комплексе DISC завершается образованием активного гетеротетрамера каспазы-8, который инициирует апоптоз. Белок c-FLIP при связывании в комплекс DISC имеет противоположную функцию, а именно, он ингибирует активацию каспазы-8 в комплексе DISC, и, таким образом, ингибирует инициацию апоптоза. Таким образом, соотношение между двумя DED-белками, прокаспазой-8 и c-FLIP в комплексе DISC определяет решение «жизнь/смерть». Далее мы подробно остановимся на механизмах про- и антиапоптогического действия DED-белков прокаспазы-8 и c-FLIP.

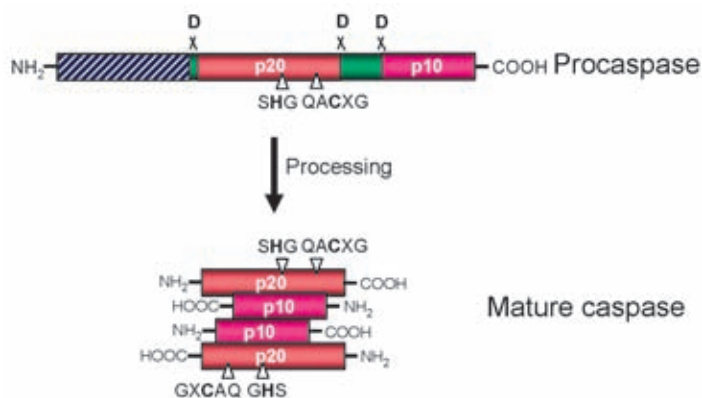
**ПРОКАСПАЗА-8-ПРО-АПОПТОТИЧЕСКИЙ БЕЛОК КОМПЛЕКСА DISC: ПРЕДСТАВИТЕЛЬ СЕМЕЙСТВА КАСПАЗ**

Прокаспазы-8 (FLICE, MACH, Mch5) принадлежит к семейству каспаз [7, 10]. Каспазы (caspases, от англ. *cysteiny* *aspartate specific proteases*) – семейство цистеиновых

аспартат-специфичных протеаз, экспрессируются в клетке как неактивные зимогены, содержащие три основных участка: N-концевой домен (продомен) варьирующей длины, большую субъединицу (p20) и малую субъединицу (p10). Каспазы активируются в результате протеолитического расщепления после остатков аспартата, которые находятся между продоменом и малой и большой субъединицей (рис. 2) [11]. Образующаяся активная каспаза представляет собой гетеротетрамер, состоящий из двух больших (~20 кДа) и двух малых субъединиц (~10 кДа), p10<sub>2</sub>-p20<sub>2</sub>. Субстратами каспаз являются многие белки, которые вовлечены в апоптоз и воспалительные процессы. По структурно-функциональным характеристикам выделяют три группы каспаз (рис. 3) [11]. Каспазы с большим продоменом называют инициаторными и делят на две группы: каспазы, инициирующие процессы воспаления (группа I), и каспазы, инициирующие апоптоз (группа II). К третьей группе (группа III) относят каспазы с коротким продоменом (20-30 аминокислотных остатков), которые получили название эффекторных каспаз.

Прокаспазы обычно присутствуют в клетке как неактивные зимогены, однако при запуске апоптоза они подвергаются протеолизу, за которым следует их активация [12]. Эффекторные каспазы активируются другими каспазами. Инициаторные прокаспазы активируются при взаимодействии нескольких инициаторных прокаспаз в т. н. инициаторных белковых комплексах. Все инициаторные каспазы содержат домен из суперсемейства домена смерти: DED или CARD. Благодаря наличию такого домена каспазы связываются в соответствующий инициаторный белковый комплекс. Прокаспазы-8 и -10 характеризуется наличием двух DED, следующих друг за другом, а про-каспазы-1, -2, -4, -5, -9, -11 и -12 содержат CARD домен (рис. 3). Именно за счет гомотипических взаимодействий между CARD или DED доменами прокаспазы связываются в инициаторные комплексы, в которых происходит их активация.

Прокаспазы-8 активируется в комплексе DISC [13]. Установлено, что в комплексе DISC присутствуют две изоформы прокаспазы-8 (прокаспазы-8а и прокаспазы-8б) [14]. Эти две



**Рис. 2.** Схема активации прокаспазы. Расщепление прокаспазы после остатков аспартата приводит к образованию активной каспазы, представляющей гетеротетрамер p10<sub>2</sub>-p20<sub>2</sub>. Показаны остатки, участвующие в формировании активного центра

изоформы очень близки по структуре: оба белка содержат два следующих друг за другом DED домена, а также каталитические субъединицы p18 и p10 (рис. 4). Прокаспазы-8а содержит дополнительный фрагмент (2 кДа (15 а.о.)), который образуется в результате трансляции экзона 9. Данный фрагмент располагается между вторым DED и большой субъединицей. Две изоформы отличаются на 2 кДа по молекулярному весу: прокаспазы-8а – это приблизительно 55 кДа (p55), а прокаспазы-8б – это 53 кДа (p53). Показано, что для активации прокаспазы-8 необходима пространственная сближенность и определенная взаимная ориентация между молекулами прокаспазы-8 в комплексе DISC, что способствует аутокаталитической активации прокаспазы-8 [15]. При этом комплекс DISC служит своеобразной платформой, которая позволяет создать условия для пространственной сближенности для молекул прокаспазы-8. Данная модель активации прокаспазы-8 получила название «индуцированной близости». Ряд экспериментальных данных показывает необходимость олигомеризации прокаспазы-8 для активации в рецепторном комплексе, что подтверждает модель «индуцированной близости». [16]. Более того, было показано, что активация прокаспазы-8 происходит при образовании димеров, состоящих из двух молекул прокаспазы-8 [17]. Расщепление прокаспазы-8 в комплексе DISC происходит в два этапа (рис. 4) [14, 18]. На первом этапе, расщепление после аспартата (положение 374) приводит к образованию двух продуктов расщепления: p43/p41 и p12. На втором этапе расщепление происходит по позициям 216 и 384, что приводит к появлению продомена p26/p24, большой p18 и малой субъединицы p10. В результате образуется активный гетеротетрамер каспазы-8, p10<sub>2</sub>-p18<sub>2</sub>, который и запускает апоптоз [19].

**C-FLIP-АНТИ-АПОПТОТИЧЕСКИЙ БЕЛОК КОМПЛЕКСА DISC: ИНГИБИТОР ПРОКАСПАЗЫ-8**

Белок c-FLIP (cellular FLIP inhibitory proteins, клеточные белки-ингибиторы FLICE), известный также как FLAME-1/I-FLICE/CASPER/CASH/MRIT/CLARP/Usurpin,

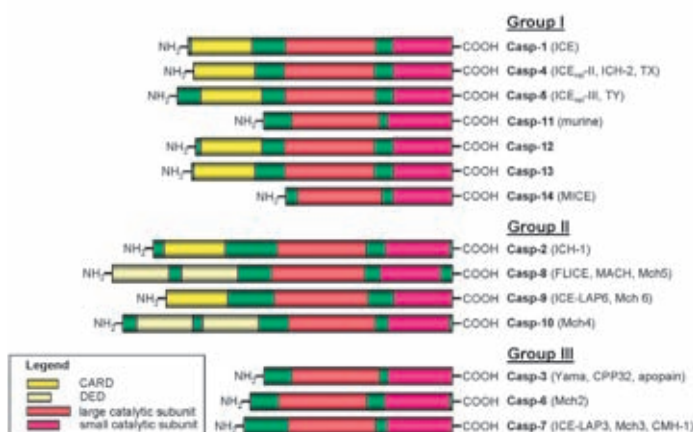


Рис. 3. Три группы каспаз. Группа I: каспазы, инициирующие процессы воспаления. Группа II: каспазы, инициирующие апоптоз. Группа III: эффекторные каспазы. Показаны: эффекторный домен смерти (DED), домен активации и рекрутирования каспазы (CARD), а также большая субъединица (p20) и малая субъединица (p10)

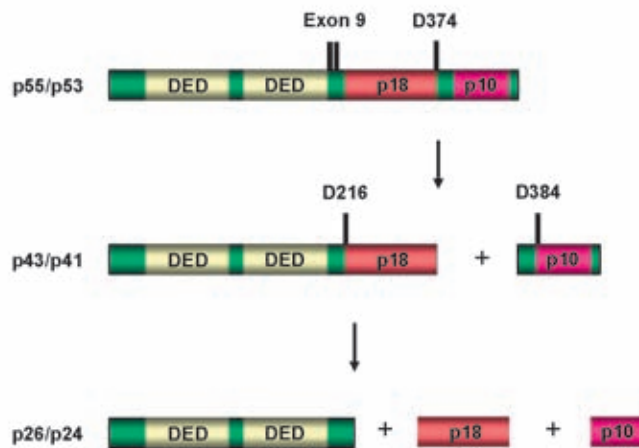


Рис. 4. Схема двух этапов протеолиза прокаспазы-8. Прокаспазы-8а/б показана зеленым, эффекторный домен смерти (DED) показан светло-желтым

является ингибитором апоптоза, запускаемого через рецепторы смерти [9, 20–24]. К настоящему моменту известно пять белков c-FLIP (рис. 5): три изоформы и два продукта расщепления. Три изоформы c-FLIP включают: c-FLIP<sub>Long</sub> (L, long, длинная), c-FLIP<sub>Short</sub> (S, short, короткая) и c-FLIP<sub>Raji</sub> (Raji, раджи) (рис. 5). Все три изоформы содержат эффекторный домен смерти, DED, за счет которого они связываются в комплексе DISC. При этом короткие изоформы c-FLIP<sub>S</sub> и c-FLIP<sub>R</sub> ингибируют активацию прокаспазы-8 в комплексе DISC, что приводит к ингибированию апоптоза. Длинная изоформа c-FLIP<sub>L</sub> способна играть как про-, так и антиапоптотическую функцию в комплексе DISC. При низких концентрациях c-FLIP<sub>L</sub> катализирует активацию прокаспазы-8, исполняя, таким образом, проапоптотическую роль, а при высоких концентрациях блокирует апоптоз, как и антиапоптотические белки c-FLIP<sub>S</sub> и c-FLIP<sub>R</sub> [25, 26]. Проапоптотическая роль c-FLIP<sub>L</sub> согласуется с данными, полученными при исследовании мышей с применением технологии генетического нокаута, которые показали, что мыши в отсутствие гена c-FLIP погибают через 11 дней эмбрионального развития [27].

Также было охарактеризовано два продукта расщепления белков c-FLIP: p43-FLIP и p22-FLIP [9, 24]. Показано, что p43-FLIP является продуктом протеолитического расщепления изоформы c-FLIP<sub>L</sub>. Образование p43-FLIP происходит в комплексе DISC в результате каталитического расщепления прокаспазы-8 по остатку аспартата 376 белка c-FLIP<sub>L</sub>. Показано, что p22-FLIP является продуктом протеолитического расщепления всех трех изоформ: c-FLIP<sub>L</sub>, c-FLIP<sub>S</sub> и c-FLIP<sub>R</sub> по остатку аспартата 196. p22-FLIP образуется в цитозоле при действии прокаспазы-8, независимо от индукции рецепторов смерти и образования комплекса DISC. Кроме того, было установлено, что p22-FLIP способен активировать фактор транскрипции NF-κB, который, в свою очередь, регулирует транскрипцию ряда анти-апоптотических генов, ингибирующих апоптоз. Активация происходит на уровне ИКК комплекса при связывании p22-FLIP с комплексом ИКК, при этом детальный механизм действия белка p22-FLIP в комплексе ИКК пока является объектом исследований.

**DED-СОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ КАК РЕГУЛЯТОРЫ ЖИЗНИ И СМЕРТИ**

DED-содержащие белки прокаспазы-8 и с-FLIP регулируют инициацию апоптоза, а также NF-κB [6]. В комплексе DISC, образованном на клеточной мембране, взаимодействия между DED-содержащими белками регулируют инициацию апоптоза: прокаспазы-8 активируется и запускает апоптоз. Белки с-FLIP блокируют активацию прокаспазы-8 и тем самым ингибируют апоптоз (рис. 6, левая часть). Единственное исключение составляет длинная изоформа с-FLIP<sub>L</sub>, которая, как уже упоминалось, может инициировать апоптоз в малых концентрациях. Таким образом, в комплексе DISC белок прокаспазы-8 имеет проапоптотическую функцию, а белок с-FLIP – антиапоптотическую.

В цитозоле, интересным образом, взаимодействия между DED-содержащими белками регулируют инициацию другого сигнального пути, а именно, NF-κB. При этом, в отличие от комплекса DISC, в цитозоле прокаспазы-8 обладает антиапоптотической функцией. Как же это происходит? Недавно было установлено, что прокаспазы-8 в цитозоле даже в отсутствие сигнала апоптоза расщепляет с-FLIP до фрагмента p22-FLIP, который, как было упомянуто выше, способен индуцировать NF-κB (рис. 6, правая часть). Прокаспазы-8 при этом не подвергается процессингу, который происходит в комплексе DISC, а использует свою т. н. прокаспазную, или проэнзиматическую, активность, которая отличается от каталитической активности активного гетеротетрамера каспазы. Вероятно, что расщепление с-FLIP до фрагмента p22-FLIP происходит при образовании гетеродимерного комплекса

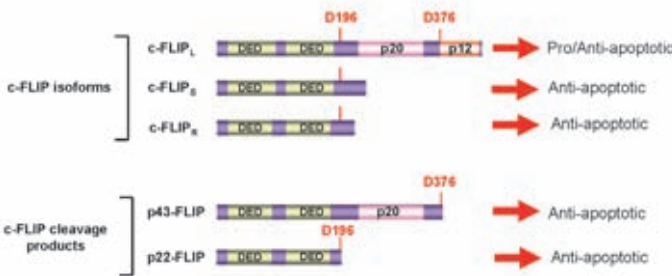


Рис. 5. Схема белков с-FLIP. Показаны три изоформы белка с-FLIP и два продукта расщепления. Эффекторный домен смерти (DED) показан светло-желтым. Остатки аспартата, расщепление по которым приводит к образованию p43-FLIP и p22-FLIP, выделены красным цветом

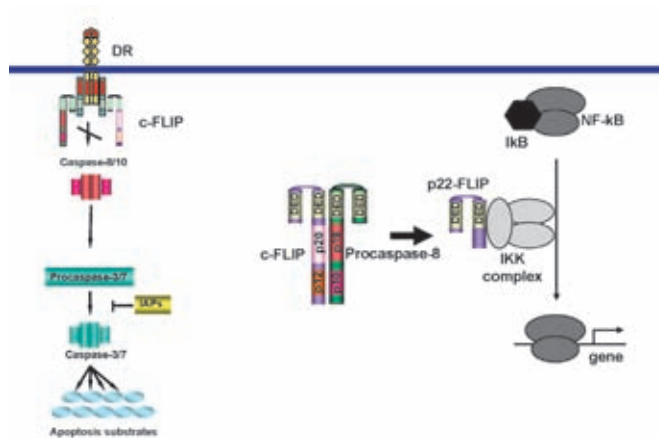


Рис. 6. DED-содержащие белки прокаспазы-8 и с-FLIP в цитозоле и в комплексе DISC. с-FLIP блокирует активацию прокаспазы в комплексе DISC (правая сторона). В цитозоле происходит образование гетеродимерного комплекса между белками: прокаспазы-8 и с-FLIP (левая сторона) приводящее к образованию p22-FLIP, который, в свою очередь, активирует фактор транскрипции NF-κB, который активирует транскрипцию ряда антиапоптотических генов, ингибирующих апоптоз

между белками: прокаспазы-8 и с-FLIP. При этом уровни экспрессии в клетке белков прокаспазы-8 и с-FLIP определяет количество фрагмента p22-FLIP и, соответственно, уровень индукции NF-κB, который, в свою очередь, регулирует транскрипцию ряда антиапоптотических генов, ингибирующих апоптоз.

Таким образом, соотношения между DED-содержащими белками в клетке являются ключевым фактором определяющим уровень устойчивости к апоптозу, и, таким образом, баланс между «жизнью» и «смертью». При этом важное значение для принятия этого решения между «жизнью» и «смертью» имеет внутриклеточная локализация DED-содержащих белков. В комплексе DISC прокаспазы-8 имеет только проапоптотическую функцию, а белок с-FLIP ингибирует ее активацию, в то время как в цитозоле белок с-FLIP, используя каталитическую активность прокаспазы-8, расщепляется до фрагмента p22-FLIP и активирует NF-κB (рис. 6). Таким образом, в цитозоле оба белка прокаспазы-8 и с-FLIP имеют антиапоптотическую активность. Дальнейшее изучение различных взаимодействий между DED-содержащими белками в цитозоле и в комплексе DISC, приводящих к индукции различных сигнальных путей, является задачей будущих исследований. ●

**Список литературы**

- Krammer, P. H. (2000) *Nature* **407**, 789-95
- Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H., and Goeddel, D. V. (1993) *Cell* **74**, 845-853
- Weber, C. H. and Vincenz, C. (2001) *Trends Biochem Sci* **26**, 475-81
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., and Nagata, S. (1993) *Cell* **75**, 1169-78
- Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M., and Krammer, P. H. (1989) *Science* **245**, 301-5
- Krammer, P. H., Arnold, R., and Lavrik, I. N. (2007) *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 532-542
- Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Dixit, V. M. (1996) *Cell* **85**, 817-27
- Sprick, M., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M., and Walczak, H. (2002) *Embo J* **21**, 4520-4530
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1999) *J Biol Chem* **274**, 1541-8
- Salvesen, G. S. (2002) *Cell Death Differ* **9**, 3-5
- Fuentes-Prior, P. and Salvesen, G. S. (2004) *Biochem. J.* **384**, 201-232
- Nicholson, D. W. (1999) *Cell Death and Differentiation* **6**, 1028-1042
- Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1997) *Embo J* **16**, 2794-804
- Scaffidi, C., Medema, J. P., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1997) *J Biol Chem* **272**, 26953-8
- Salvesen, G. S. and Dixit, V. M. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10964-7
- Boatright, K. M., Renatus, M., Scott, F. L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I. M., Ricci, J.

- Edris, W. A., Sutherlin, D. P., Green, D. R., and Salvesen, G. S. (2003) *Mol Cell* **11**, 529-41
- Chang, D. W., Xing, Z., Capacio, V. L., Peter, M. E., and Yang, X. (2003) *Embo J* **22**, 4132-42
- Golks, A., Brenner, D., Schmitz, I., Watzl, C., Krueger, A., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. (2006) *Cell Death Differ.* **13**, 489-498
- Lavrik, I., Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Weyd, H., Krammer, P. H., and Kirchhoff, S. (2003) *Cell Death Differ* **10**, 144-5
- Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meil, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J. L., Schroter, M., Scaffidi, C., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Tschopp, J. (1997) *Nature* **386**, 517-21
- Budd, R. C., Yeh, W. C., and Tschopp, J. (2006) *Nature Reviews Immunology* **6**, 196-204
- Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P. H., and Kirchhoff, S. (2001) *Mol Cell Biol* **21**, 8247-54
- Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 14507-14513
- Golks, A., Brenner, D., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. (2006) *Journal of Experimental Medicine* **203**, 1295-1305
- Chang, D. W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimnich, A., Barnhart, B. C., Yaish-Ohad, S., Peter, M. E., and Yang, X. (2002) *Embo J* **21**, 3704-3714
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D. W., Briand, C., and Grutter, M. G. (2002) *J Biol Chem* **277**, 45162-71
- Yeh, W. C., Itie, A., Elia, A. J., Ng, M., Shu, H. B., Wakeham, A., Mirtsos, C., Suzuki, N., Bonnard, M., Goeddel, D. V., and Mak, T. W. (2000) *Immunity* **12**, 633-42