

УДК 577.24

# Роль *p66shc* в окислительном стрессе и апоптозе

Е. Р. Галимов

Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ

E-mail: e.r.galimov@gmail.com

Поступила в редакцию 03.11.2010 г.

**РЕФЕРАТ** *p66shc* – ген-регулятор продолжительности жизни млекопитающих, который влияет на содержание активных форм кислорода (АФК) в клетке и развитие апоптоза. У мышей с нокаутом гена *p66shc* продолжительность жизни на 30% больше, чем у мышей дикого типа, они устойчивы к действию окислительного стресса и развитию патологических состояний, связанных со старением, – гиперхолестеринемии, ишемии и гипергликемии. В связи с этим, *p66shc* рассматривается в качестве перспективной мишени для лекарственной терапии многих возрастных заболеваний. В представленном обзоре обобщены, систематизированы и критически рассмотрены данные об участии *p66shc* в сигнальных путях, регулирующих окислительный стресс и апоптоз.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** апоптоз, активные формы кислорода, *p66shc*, митохондрии.

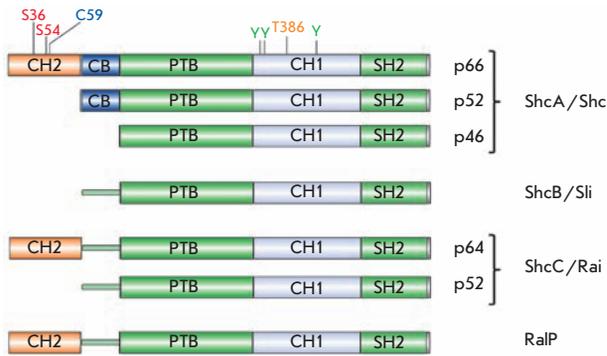
**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АФК – активные формы кислорода; ДМТМ – диметилтиомочевина; ММП – межмембранное пространство митохондрий; ТМФД – N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин; Akt – протеинкиназа В; Cdc42 (от англ. cell division control protein 42 homolog) – малая GTP-аза подсемейства Rho-GTP-аз; Cyt c – цитохром c; Grb2 – белок, связывающий рецепторы ростовых факторов; ERK – киназы, регулируемые внеклеточными сигналами; HIV-1 – вирус иммунодефицита человека 1; JNK – N-концевая протеинкиназа c-Jun; MAPK – протеинкиназы, активируемые митогенами; mHSP70 – митохондриальный белок теплового шока 70 кДа; MnSOD – митохондриальная супероксиддисмутаза; Rac-1 – Ras-подобный субстрат 1 ботулотоксина С3; RAS – онкоген вируса саркомы крыс; SOS1 (от англ. Son of Sevenless) – фактор обмена нуклеотидов; PKC $\beta$  – протеинкиназа С $\beta$ ; Pin-1 – пептидилпролил-*цис*/транс-изомераза; PP2A – протеинфосфатаза 2; Prx1 – пероксиредоксин 1; PTP-PEST – специфичная для фосфотирозин фосфатаза с C-концевой последовательностью PEST, REF-1 – редокс-фактор-1; TIM – транслоказа внутренней мембраны митохондрий; TOM – транслоказа белков-предшественников внешней мембраны митохондрий.

## ВВЕДЕНИЕ

Идентификация множества мутаций, продлевающих жизнь разных модельных организмов, свидетельствует о том, что старение можно рассматривать как генетическую программу [1]. Один из таких генов – *p66shc*, делеция которого увеличивает продолжительность жизни мышей на 30%. Важно отметить, что мыши с нокаутом гена *p66shc*, в отличие от других мышинных моделей с увеличенной продолжительностью жизни (например, мышей с делецией гена рецептора гормона роста), фертильны и имеют нормальный фенотип [2]. Эти мыши устойчивы к действию окислительного стресса и к развитию связанных с ним патологий, таких, как атеросклероз [3], нарушение функций эндотелия [4], AGE (от англ. advanced glycation end products)–зависимая гломерулопатия при сахарном диабете [5, 6] и индуцированное этанолом поражение печени [7].

Белок P66shc относится к семейству адапторных белков shc, кодируемых одним локусом у *Drosophila* (*dShc*) и четырьмя локусами у млекопитающих – *Shc* (*ShcA*), *Sli* (*ShcB*), *Rai* (*ShcC*) [8] и *RalP* [9]. Четыре локуса млекопитающих кодируют по крайней мере семь белков, которые образуются благодаря использованию альтернативных инициаторных кодонов и альтернативному сплайсингу. Три изоформы, кодируемые локусом *ShcA*, обозначают по их молекулярной массе – p46shc, p52shc и p66shc соответственно. Эти белки участвуют как в регуляции пролиферации (p46shc и p52shc), так и апоптоза (p66shc) [8].

P66shc является относительно «молодым» белком: он не обнаружен у дрожжей (*Saccharomyces*), нематод (*Caenorhabditis*) и насекомых (*Drosophila*), но появляется у земноводных (*Xenopus*), рыб (*Fugu rubripes*) и млекопитающих [8]. Как самая длинная изоформа, p66shc содержит все эволюционно более



**Рис. 1.** Схематическое представление доменной структуры SHC-подобных белков. На схеме обозначены модифицируемые аминокислотные остатки: серины 36 и 54 (S36 и S54), цистеин 59 (C59), треонин 386 (T386) и тирозины (Y), фосфорилируемые в процессе передачи сигнала от тирозинкиназных рецепторов.

древние домены, найденные в коротких изоформах p46shc и p52shc (см. рис. 1): N-концевой фосфотирозинсвязывающий домен (PTV), центральный участок, гомологичный коллагену (CH1), и C-концевой домен, гомологичный Src (SH2). Изоформы, более длинные, чем p46shc, содержат дополнительные N-концевые домены: цитохром-с-связывающий домен (CB), общий для p52shc и p66shc, но уникальный для p66 домен, гомологичный коллагену (CH2).

P46shc и p52shc функционируют в качестве адапторных белков, передавая сигнал от различных тирозинкиназных рецепторов, которые фосфорилируют остатки тирозина в CH1-домене этих белков. Фосфорилирование p46shc/p52shc стимулирует образование комплекса GRb2 (адапторный белок) и SOS (фактор обмена нуклеотидов), что ведет к активации белка RAS и к запуску каскада митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК). Хотя p66shc, как и p46shc/p52shc, фосфорилируется тирозинкиназными рецепторами и взаимодействует с комплексом GRb2/SOS, он, по-видимому, не активирует МАРК [10]. Конкуренция p66shc и p52shc за связывание с GRb2 [11] и индуцированное p66shc вытеснение SOS из комплекса с GRb2 [12, 13] могут участвовать в регуляции путей передачи сигнала от рецепторов. Однако эксперименты на модельных объектах с генетическим нокаутом *p66shc* показали, что роль этого белка в регуляции продолжительности жизни, окислительном стрессе и апоптозе связана с доменами CH2 и CB, ненужными для первоначальной адапторной функции белка.

### **Р66, ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И АПОПТОЗ**

Изучение мышей с нокаутом гена *p66shc* показало, что у них снижено содержание вну-

триклеточных АФК, определяемое с помощью АФК-чувствительных зондов, а также уровень окислительного повреждения ДНК и белков, оцениваемый по количеству 8-оксо-дезоксигуанозина и нитротирозин [3, 4, 14–16]. Мутантные мыши характеризовались повышенной устойчивостью к окислительному стрессу, вызванному паракватом [2]. Изучение различных культур клеток мыши, крысы и человека с инактивированным p66 (либо с помощью делеции, либо введением доминантно негативного мутанта с заменой серина 36 (S36) на аланин) показало, что p66shc необходим для развития апоптоза, вызванного различными индукторами (см. табл. 1). Предполагается, что для апоптоза в этих моделях критическим является окислительный стресс, опосредованный p66shc. В частности, опубликованы данные в пользу того, что окислительный стресс, вызванный p66shc, необходим для развития p53-зависимого апоптоза [14]. Подобные выводы можно сделать и исходя из данных, полученных в ходе физиологических экспериментов (см. табл. 2).

В активации проапоптотической функции p66shc важную роль играют посттрансляционные модификации. Так показано, что фосфорилирование S36, расположенного в CH2-домене, необходимо для развития апоптоза, вызванного перекисью водорода и ультрафиолетовым излучением [2]. Сама реакция фосфорилирования может осуществляться различными киназами, такими, как JNK в ответ на ультрафиолетовое излучение или амилоидный β-пептид [23, 33], ERK [34], и PKCβ в ответ на обработку перекисью [35]. Фосфорилирование S36 ведет к взаимодействию с белками 14-3-3 [36], тирозиновой фосфатазой PTP-PEST [37] и пролизомеразой Pin-1 [35]. Если роль первых двух взаимодействий в апоптозе пока неясна, то Pin-1-зависимая изомеризация p66shc играет важную роль в регуляции его транспорта в митохондрию и в активации апоптоза, зависящего от митохондрий (см. ниже).

Однако, помимо большого количества работ, свидетельствующих о проапоптотической функции p66shc, имеются данные о том, что p66shc может защищать от апоптоза. На модели рака молочной железы, а также на стволовых клетках человека показано, что подавление экспрессии *p66shc* защищает от цитотоксического действия гипоксии. Выяснилось также, что низкое содержание кислорода приводит к активации p66shc, что, в свою очередь, способствует экспрессии гена *Notch-3*, ответственного за самообновление стволовых клеток и их выживание в условиях гипоксии. *Notch-3* способствует экспрессии гена карбоангидразы IX, также связанного с фенотипом, устойчивым к гипоксии [38]. Таким образом, открыта регуляторная связь между p66shc и путем, защи-

**Таблица 1.** Клеточные модели, инактивация *p66shc* (с помощью делеции гена *p66shc* или введения доминантно негативного мутанта по S36) в которых вызывает устойчивость к апоптозу

Клетки	Клеточная линия	Организм	Индуктор апоптоза	Ссылка
Эмбриональные фибробласты	MEF	Мышь	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ультрафиолетовое излучение, стауропорин, изотиоцианат, хлороформ	[2, 15, 17, 18]
Первичные кардиомиоциты		»	Ангиотензин II	[19]
Трансформированный почечный эпителий	TKPTS	»	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , цисплатин	[13]
Клетки печени, трансгенные по TGF $\alpha$ человека	AML12	»	Гипоксия-реоксигенация	[20]
Предшественники эндотелиальных клеток	BM c-kit+	»	Высокое содержание глюкозы в среде	[21]
Остеобластные клетки	OB-6, UAMS-32	»	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[22]
Феохромоцитома крысы	PC12	Крыса	Амилоидный $\beta$ -пептид, конститутивно активная форма Rac-1	[23]
Зрелые кардиомиоциты из желудочка сердца	ARVM	»	Высокое содержание глюкозы в среде	[24]
Трансформированные фибробластоподобные клетки	COS7	Зеленая мартышка	Конститутивно активная форма Rac-1	[25]
Нейробластома человека	SH-SY5Y	Человек	Амилоидный $\beta$ -пептид	[23]
Иммортализованные Т-антигеном подоциты человека	CIDHPs	»	Трансфекция HIV-1	[26]
Рак предстательной железы	PC3, LNCaP	»	Изотиоцианат	[18]
Рак шейки матки	HeLa	»	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[27]
Остеосаркома	SaOs-2	»	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[27]
Пигментный эпителий сетчатки человека	RPE	»	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[28]
Лимфома	Jurcat	»	Гипоксия, ионофоры кальция	[29]
Трансформированный почечный эпителий	фNx-293	»	Открепление от подложки	[30]
Эндотелиальные клетки	HuVec	»	Открепление от подложки	[30]

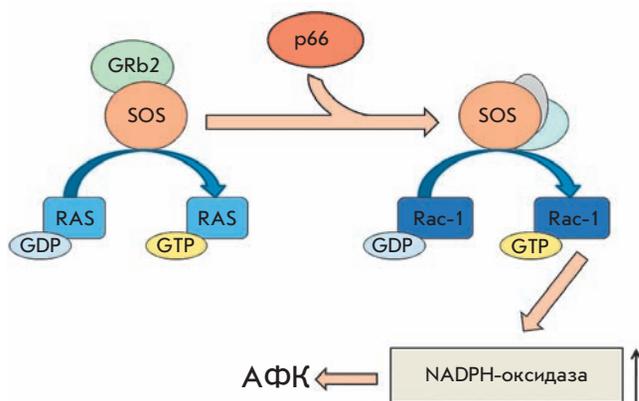
щающим стволовые клетки от гипоксии. Эти данные проясняют роль *p66* в гомеостазе и самообновлении стволовых клеток, которые поддерживаются в специальных тканевых участках, или «нишах», содержащих мало сосудов, а потому имеющих низкое содержание кислорода. Интересно, что малая GTP-аза Rac-1, известный активатор *p66*-зависимого окислительного стресса [25], также играет важную роль в поддержании и самообновлении эпидермальных стволовых клеток. Вместе эти данные свидетельствуют о более сложной роли белка *p66shc*, действующего как «обоюдоострый меч» в регуляции апоптоза в зависимости от внешних условий и генетического контекста.

**МЕХАНИЗМЫ P66-ЗАВИСИМОГО ПОВЫШЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА**

На данный момент описаны три механизма, с помощью которых *p66shc* может повышать уровень внутриклеточных АФК: активация мембранных

**Таблица 2.** Участие *p66shc* в развитии патологий, связанных с окислительным стрессом, показанное на физиологических моделях (эксперименты на животных с делецией гена *p66shc* или сравнение молодых и старых особей)

Патология, связанная с апоптозом	Организм и генетическая линия	Ссылка
Экспериментальная диабетическая гломерулопатия	Мышь, линия SV/129	[5]
Апоптоз сосудистого эндотелия и атерогенез при окислительном стрессе, вызванном высокожировой диетой	Мышь, линия SV/129	[3]
Апоптоз кардиомиоцитов в экспериментальной модели стрептозотоцинового диабета	Мышь, линия SV/129	[31]
Гипоксия коры головного мозга	Крыса, линия Sprague-Dawley	[32]



**Рис. 2.** *r66*-Зависимая активация мембранных NADPH-оксидаз. *r66shc* вытесняет фактор обмена нуклеотидов SOS из комплекса с GRb2 и способствует SOS-зависимой активации малой GTP-азы Rac-1. Активированный Rac-1 стимулирует сборку мембранных NADPH-оксидаз и генерацию АФК.

NADPH-оксидаз, негативная регуляция синтеза антиоксидантных ферментов и генерация АФК в митохондриях.

***r66*-Зависимая активация мембранных NADPH-оксидаз**

В первую очередь отметим, что *r66shc* может вызывать окислительный стресс, действуя согласно своей канонической функции как адапторный белок. Как сказано выше, этот белок может негативно влиять на активацию RAS, вытесняя фактор обмена нуклеотидов SOS из комплекса с GRb2. Оказалось, что при этом *r66* способствует SOS-зависимой активации малой GTP-азы Rac-1, что стимулирует сборку мембранных NADPH-оксидаз и образование АФК [12] (см. рис. 2). Показано, что *r66shc* необходим для апоптоза, индуцированного конститутивно активным мутантом Rac-1. Однако для этого вида апоптоза ключевой посттрансляционной модификацией оказалось фосфорилирование не S36, а S54 и T386, которое ведет к Rac-1-зависимой стабилизации *r66shc* и защите его от убиквитинзависимой деградации [25]. В макрофагах, где NADPH-оксидаза служит основным источником АФК, нокаут гена *r66shc* нарушает образование активного комплекса NADPH-оксидазы, что снижает продукцию АФК на 40% [39].

***r66shc* и регуляция экспрессии антиоксидантных ферментов**

В ряде работ показано, что *r66shc* снижает уровень экспрессии антиоксидантных ферментов и регуляторных факторов: глутатионпероксидазы-1 [28], MnSOD [7, 20, 28], REF-1 [20], в частности за счет не-

гативной регуляции факторов транскрипции типа Forkhead (например, Фохоза) [23, 40, 41]. Во время окислительного стресса серин/треониновая протеинкиназа Akt фосфорилируется и, в свою очередь, фосфорилирует и инактивирует Фохоза. Для этой реакции необходимо присутствие в клетке *r66shc* [40], а также его фосфорилирование по S36 [42]. Кроме того, есть данные, что *r66shc* в комплексе с белком βPix (фактор обмена нуклеотидов для Rac-1 и Cdc42) может приводить к Akt-независимому фосфорилированию и инактивации Фохоза [43] (см. рис. 3).

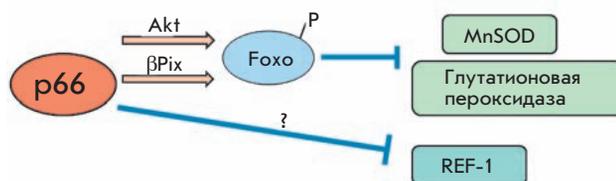
Этим данным противоречат результаты нескольких работ, согласно которым *r66shc* не влияет на уровень антиоксидантных ферментов [4, 15–17].

***r66shc* и митохондриальный путь развития апоптоза**

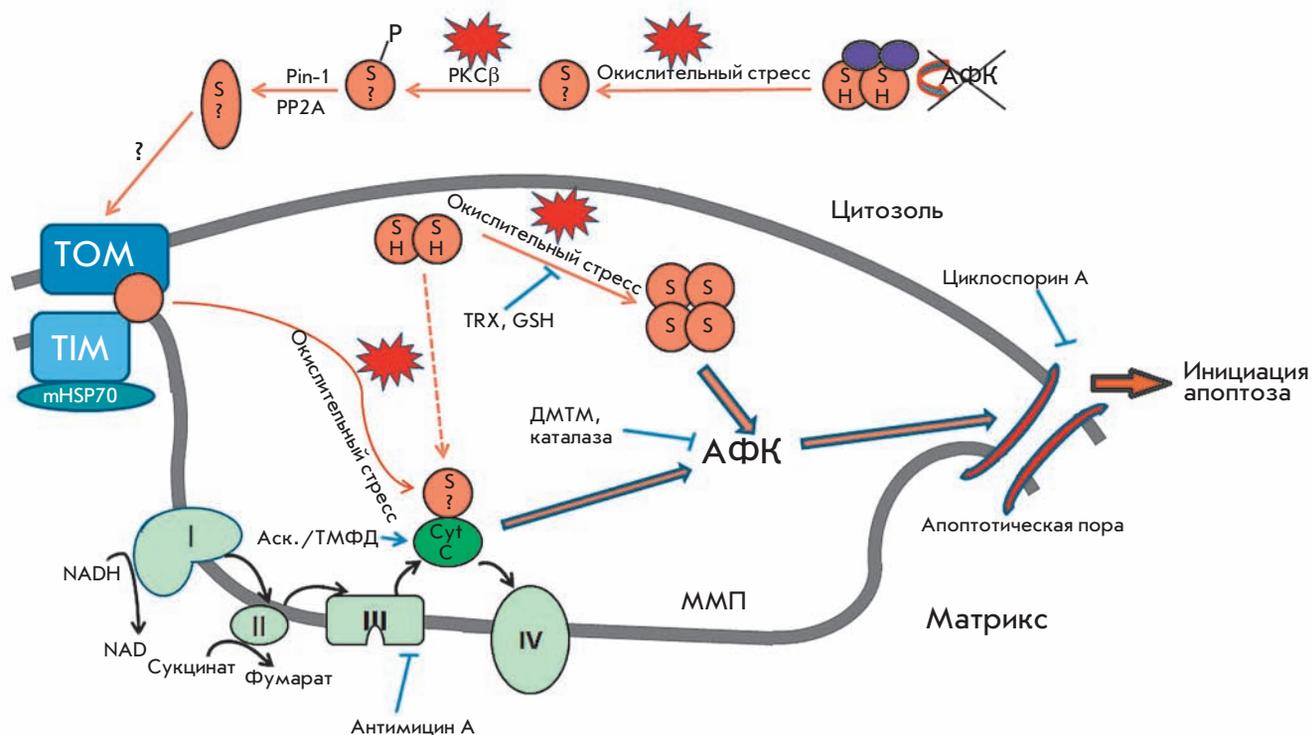
Устойчивость клеток с делецией гена *r66shc* к самым различным индукторам апоптоза, в котором участвуют митохондрии, наводит на мысль о том, что *r66* непосредственно взаимодействует с митохондриями.

**Митохондриальная локализация *r66shc* и его транспорт в митохондрии.** Изучение локализации *r66shc* в клетке показало, что 32% белка находится в цитоплазме, 24% – в эндоплазматическом ретикулуме, а 44% клеточного пула – в митохондриях [17]. Внутри митохондрий *r66* распределен следующим образом: 35% в межмембранном пространстве, 56% ассоциировано с внутренней мембраной и 9% находится в матриксе митохондрий [15]. Согласно другим данным митохондрии содержат лишь 10% *r66shc* [44]. Возможно, эти различия связаны с тем, что локализация *r66shc* меняется при внешних воздействиях на клетку.

К стимулам, приводящим к транслокации *r66shc* в митохондрию, относятся проапоптотические воздействия, такие, как ультрафиолетовое излучение и обработка перекисью водорода [17, 35]. Однако механизм транспорта *r66shc* в митохондрию пока



**Рис. 3.** *r66shc* и регуляция антиоксидантной системы защиты клетки. *r66shc* снижает уровень антиоксидантных ферментов и регуляторных факторов. В этих процессах играет важную роль Akt-зависимая и Akt-независимая инактивация транскрипционных факторов Forkhead.



**Рис. 4.** Модель запуска апоптотического сигнала в митохондриях. *p66shc* (обозначен оранжевым кружком) может находиться в димерном состоянии (кружки, где SH обозначает восстановленный остаток цистеина 59) и тетрамерном (кружки, где S обозначает окисленный остаток цистеина 59). Если степень окисления цистеина 59, ответственного за тетрамеризацию *p66*, не известна, то белок обозначен кружком с «S?». В цитозоле при взаимодействии *p66shc* с пероксиредоксином 1 (Prx1, обозначен фиолетовым овалом) образуется комплекс димерного *p66* и димерного Prx1, в котором пероксидазная активность Prx1 инактивирует производимые *p66* АФК. При наступлении окислительного стресса комплекс распадается, РКСβ фосфорилирует *p66* по серину 36. Фосфорилированный *p66shc* становится мишенью пролилизомеразы Pin-1, которая узнает пролин, следующий за фосфорилированным остатком серина. После изомеризации *p66shc* дефосфорилируется фосфатазой PP2A и транспортируется в митохондрии. Во время окислительного стресса *p66shc* высвобождается из высокомолекулярного комплекса, содержащего субъединицы TOM, TIM и mHSP70, и, действуя, как оксидоредуктаза, переносит электроны с восстановленного Cyto c на кислород. В результате образовавшиеся АФК приводят к формированию апоптотической поры и инициации апоптоза. К этим же последствиям при стрессе и вызванном им недостатке восстановленных тиоредоксина и глутатиона может приводить образование тетрамера *p66shc* (пояснения в тексте). Аск. – аскорбат, ДМТМ – диметилтиомочевина, ММП – межмембранное пространство митохондрий, TRX – тиоредоксин, GSH – глутатион.

остаётся невыясненным. Известно, что короткая изоформа Shc – *p46shc* – также локализуется в митохондриях и содержит сигнал импорта в митохондрию [45]. Тем не менее мутации аналогичного сигнала импорта у *p66* не нарушали его локализацию в митохондриях, что может говорить о маскировании данного сигнала N-концевым SH2-доменом [44]. Показано, что *p66shc* ассоциируется с белковыми комплексами, содержащими субъединицы TIM и TOM, а также mHSP70 и определяющими транспорт белков в митохондрии. Предполагается, что в этом комплексе *p66* не активен, но при окислительном стрессе диссоциирует из него, переходя в активную форму [46].

Согласно данным [35], сигнальный путь, запускающий транслокацию *p66shc* в митохондрию, при обработке перекисью водорода включает активацию РКСβ, которая фосфорилирует *p66* по S36. Фосфорилированный *p66shc* становится мишенью пролилизомеразы Pin-1, которая узнает пролин, следующий за фосфорилированным остатком серина. После изомеризации *p66shc* дефосфорилируется фосфатазой PP2A и транспортируется в митохондрии. Последнее согласуется с тем фактом, что пул *p66shc* в митохондриях не фосфорилирован [15] (см. рис. 4). Также показано [35], что отсутствие *p66* приводит к изменению кальциевой сигнализации и предотвращает

дробление митохондрий, что, в свою очередь, связывают с устойчивостью к апоптозу.

**Оксидоредуктазная проапоптотическая активность р66shc и образование АФК.** По современным представлениям при развитии митохондриально-зависимого апоптоза различные сигналы (АФК, повышенная концентрация кальция в цитоплазме, разобщение окислительного фосфорилирования) вызывают образование динамичного мультисубъединичного белкового комплекса, образующего пору во внутренней мембране митохондрий. Пермеаблизация внутренней и внешней мембран приводит к выходу Cyt C и других белков в цитоплазму, образованию апоптосомы и активации каспаз [47].

Механизм, объясняющий роль р66shc в митохондриально-зависимом апоптозе, предложили Pelicci и соавт. [15]. Оказалось, что р66shc необходим для снижения мембранного потенциала и выхода Cyt C в цитозоль. Более того, добавление циклоспорина А, ингибитора образования митохондриальной поры, блокировало проапоптотическую функцию р66 [17]. В *in vitro*-экспериментах добавление рекомбинантного р66shc к изолированным митохондриям с проницаемой внешней мембраной приводило к набуханию митохондрий в результате образования апоптотических пор. Этот эффект также блокировался циклоспорином А, снимался добавлением каталазы, антиоксиданта диметилтиомочевина (ДМТМ), ингибитора III-го комплекса дыхательной цепи антимицина А, а также требовал субстратов дыхания. Таким образом, полученные данные свидетельствовали, что образование митохондриальной апоптотической поры является ключевым шагом в развитии р66-зависимого апоптоза, и для данного эффекта необходимы АФК и дыхание.

Дальнейшие эксперименты с использованием электрохимического анализа и флуоресцентных редокс-чувствительных проб показали, что р66 действует как оксидоредуктаза, взаимодействующая с восстановленным Cyt C и переносящая от него электроны на кислород. За взаимодействие с Cyt C отвечает СВ-домен, что доказано с помощью ELISA и точечного мутагенеза [17]. В результате неполного восстановления кислорода образуются АФК, вызывающие формирование апоптотических митохондриальных пор. В подтверждение этой гипотезы АФК образуются при смешивании митохондрий и р66 даже в отсутствие субстратов дыхания при наличии пары аскорбат/ТМФД, специфично восстанавливающей Cyt C. Образование АФК наблюдалось и в отсутствие митохондрий при смешивании белков Cyt C и р66shc, однако в этом случае требовалось присутствие ионов меди.

Таким образом, группой Pelicci предложен следующий механизм проапоптотического действия р66shc (см. рис. 4): в нормальных условиях р66shc инактивирован и находится в составе высокомолекулярного комплекса, содержащего субъединицы ТОМ, ТИМ и mHSP70. В результате окислительного стресса р66shc высвобождается из комплекса и, действуя, как оксидоредуктаза, переносит электроны с восстановленного Cyt C на кислород. В результате неполного восстановления кислорода образуются АФК, приводящие к формированию апоптотической поры, набуханию митохондрий, выходу Cyt C в цитозоль, сборке апоптосомного комплекса и активации каспаз.

Важно учесть, что предложенный механизм оксидоредуктазной активности р66shc, где Cyt C выступает в качестве донора электронов, показан только *in vitro*. Для подтверждения данной гипотезы необходимы дополнительные опыты, включающие использование флуоресцентных зондов для измерения уровня АФК специфично в митохондриях клеток с неактивной дыхательной цепью (Rho-0 клеток), а также клеток с генетическим нокаутом гена *Cyt C*.

Необходимо отметить, что описанная схема имеет довольно много слабых мест. Так, например, у р66shc не обнаружено каких-либо известных редокс-доменов или доменов, способных связывать ионы металлов. Его способность генерировать АФК только в присутствии ионов меди может быть артефактом, поскольку ионы меди, как известно, могут генерировать АФК в реакции Фентона, что может значительно повлиять на сигнал при использовании редокс-чувствительных флуоресцентных зондов. Известно также, что Cyt C при переходе в олигомерное состояние способен генерировать АФК в результате автоокисления [48–52]. Учитывая эти обстоятельства, можно предположить, что при взаимодействии с Cyt C р66shc ведет себя не как оксидоредуктаза, а как фактор, способствующий олигомеризации и автоокислению цитохрома, подобно протимозину  $\alpha$  [53].

**Исследование изолированного СН2-СВ-домена.** Механизм действия р66shc изучали также на его изолированном СН2-СВ-доме *in vitro* [54]. Оказалось, что рекомбинантный СН2-СВ-домен существует в двух формах: восстановленной – в виде димера, и окисленной – в виде тетрамера (или димера димеров), который содержит дисульфидные мостики между остатками С59. Добавление СН2-СВ-домена, как и полноразмерного белка, к митохондриям приводило к образованию апоптотических пор и набуханию органелл, однако подобной проапоптотической активностью обладала только тетрамерная форма.

Тем не менее в противоположность данным работы [15], в которой генерацию АФК напрямую связывали с образованием апоптотических пор, тетрамерная форма генерировала значительно меньше АФК, чем димер при смешивании с изолированными митохондриями.

Кроме того, показано, что домен СН2-СВ способен вызывать образование АФК в присутствии донора электронов дитионита и ионов меди. Однако этот эффект не воспроизводился при замене дитионита на Cyt C в качестве донора электронов. Вероятно, для взаимодействия р66shc с Cyt C необходимы другие домены р66, либо они нужны для правильной конформации СН2-СВ-домена при связывании Cyt C.

В результате была предложена модель р66-зависимого апоптоза, согласно которой в нормальных условиях тетрамерная форма р66 восстанавливается антиоксидантными системами митохондрий. В условиях стресса, напротив, антиоксидантные защитные системы не способны поддерживать р66 в восстановленной димерной форме, и образовавшийся тетрамер локально генерирует АФК, приводя к появлению апоптотической поры и запуску апоптоза.

Важно отметить, что АФК-образующая и индуцирующая апоптоз функции р66shc могут не быть прямо связаны. В пользу данного утверждения свидетельствует более низкий уровень генерации АФК апоптоз-индуцирующим тетрамерным р66shc по сравнению с димером, не приводящим к образованию апоптотических пор.

**р66shc как редокс-сенсор.** Дальнейшие эксперименты с изолированным СН2-СВ-доменом выявили новый партнер р66shc – пероксиредоксин 1 (Prx1) [55]. Prx1 относится к пероксидазам, которые регулируют редокс-баланс в клетке. Он может существовать в виде димера, декамера (состоит из пяти димеров) и мультимера. Prx1 локализован преимущественно в цитозоле, хотя недавние протеомные исследования показали его наличие в межмембранном пространстве митохондрий. В нормальных условиях в клетке преобладает димер, который работает как пероксидаза, в условиях же стресса Prx1 окисляется и переходит в декамерную форму, у которой значительно снижена пероксидазная активность. При этом у Prx1 появляется способность работать как шаперон. Сильный окислительный стресс или тепловой шок приводят к образованию мультимера, не обладающего пероксидазной активностью и также действующего как шаперон [56–58].

При взаимодействии с Prx1 СН2-СВ-доменом р66shc способствует дестабилизации декамерного Prx1 и переходу Prx1 в димерную форму. В свою

очередь, Prx1 в комплексе с р66shc поддерживает р66shc в димерной форме за счет дисульфидного обмена между двумя белками. Образовавшийся комплекс состоит из димерного р66shc, который способен генерировать АФК, но обладает низкой проапоптотической активностью, и димерного Prx1, функционирующего как пероксидаза. Таким образом, в нормальных условиях димерный Prx1 поддерживает р66shc в неактивном состоянии, деградируя производимые им АФК за счет своей пероксидазной активности. При наступлении окислительного стресса остатки цистеина, входящие в этот комплекс, окисляются, комплекс распадается, в результате чего освободившийся р66shc может участвовать в индукции апоптоза [55]. Таким образом, комплекс димерного р66shc и димерного Prx1 можно рассматривать как редокс-сенсор, реагирующий на уровень АФК в клетке и способный запустить апоптоз при их избыточном накоплении (см. рис. 4).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, согласно современным данным, р66shc – это проапоптотический белок, регулирующий окислительный стресс и запускающий митохондриальный путь апоптоза за счет оксидоредуктазной активности. Несмотря на активное изучение физиологической роли р66shc, довольно мало известно о точном механизме действия этого белка, определяющим его редокс-активность, а также участие в индукции апоптоза. Предметом дальнейших исследований станет уточнение механизма транслокации р66shc в митохондрии, а также локализации р66shc-зависимой продукции АФК в клетке. Хотя фосфорилирование р66shc по S36 относится к одному из необходимых шагов в развитии апоптоза, показано, что митохондриальный пул р66 не фосфорилирован. Это указывает на то, что фосфорилирование р66 по S36 участвует, возможно, в немитохондриальной активности, связанной с его проапоптотической функцией.

Р66shc представляет интерес для изучения регуляции окислительного стресса, апоптоза и связанного с ними старения. Важно отметить, что для определения перспектив применения р66 при связанных с возрастом заболеваниях необходимо выяснить его роль в развитии рака. Более глубокое понимание регуляторных путей, а также структурных и механистических основ редокс-активности р66shc может быть использовано в фармакотерапии заболеваний, ассоциированных со старением. ●

*Автор выражает признательность Б.В. Черняку и В.П. Скулачеву за ряд ценных замечаний и помощь в подготовке рукописи.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Longo V.D., Mitteldorf J., Skulachev V.P. // *Nat. Rev. Genet.* 2005. V. 6. № 11. P. 866–872.
2. Migliaccio E., Giorgio M., Mele S., Pelicci G., Reboldi P., Pandolfi P.P., Lanfrancione L., Pelicci P.G. // *Nature.* 1999. V. 402. № 6759. P. 309–313.
3. Napoli C., Martin-Padura I., de Nigris F., Giorgio M., Mansueto G., Somma P., Condorelli M., Sica G., De Rosa G., Pelicci P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 4. P. 2112–2116.
4. Camici G.G., Schiavoni M., Francia P., Bachschmid M., Martin-Padura I., Hersberger M., Tanner F.C., Pelicci P., Volpe M., Anversa P., Luscher T.F., Cosentino F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 12. P. 5217–5222.
5. Menini S., Amadio L., Oddi G., Ricci C., Pesce C., Pugliese F., Giorgio M., Migliaccio E., Pelicci P., Iacobini C., Pugliese G. // *Diabetes.* 2006. V. 55. № 6. P. 1642–1650.
6. Menini S., Iacobini C., Ricci C., Oddi G., Pesce C., Pugliese F., Block K., Abboud H.E., Giorgio M., Migliaccio E., Pelicci P.G., Pugliese G. // *Diabetologia.* 2007. V. 50. № 9. P. 1997–2007.
7. Koch O.R., Fusco S., Ranieri S.C., Maulucci G., Palozza P., Larocca L.M., Cravero A.A., Farre S.M., De Spirito M., Galeotti T., Pani G. // *Lab. Invest.* 2008. V. 88. № 7. P. 750–760.
8. Luzi L., Confalonieri S., Di Fiore P.P., Pelicci P.G. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2000. V. 10. № 6. P. 668–674.
9. Fagiani E., Giardina G., Luzi L., Cesaroni M., Quarto M., Capra M., Germano G., Bono M., Capillo M., Pelicci P., Lanfrancione L. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. № 7. P. 3064–3073.
10. Migliaccio E., Mele S., Salcini A.E., Pelicci G., Lai K.M., Superti-Furga G., Pawson T., Di Fiore P.P., Lanfrancione L., Pelicci P.G. // *EMBO J.* 1997. V. 16. № 4. P. 706–716.
11. Okada S., Kao A.W., Ceresa B.P., Blaikie P., Margolis B., Pessin J.E. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 44. P. 28042–28049.
12. Khanday F.A., Santhanam L., Kasuno K., Yamamori T., Naqvi A., Dericco J., Bugayenko A., Mattagajasingh I., Disanza A., Scita G., Irani K. // *J. Cell Biol.* 2006. V. 172. № 6. P. 817–822.
13. Arany I., Faisal A., Nagamine Y., Safirstein R.L. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 10. P. 6110–6117.
14. Trinei M., Giorgio M., Cicalese A., Barozzi S., Ventura A., Migliaccio E., Milia E., Padura I.M., Raker V.A., Maccarana M., Petronilli V., Minucci S., Bernardi P., Lanfrancione L., Pelicci P.G. // *Oncogene.* 2002. V. 21. № 24. P. 3872–3878.
15. Giorgio M., Migliaccio E., Orsini F., Paolucci D., Moroni M., Contursi C., Pelliccia G., Luzi L., Minucci S., Marcaccio M., Pinton P., Rizzuto R., Bernardi P., Paolucci F., Pelicci P.G. // *Cell.* 2005. V. 122. № 2. P. 221–233.
16. Francia P., delli Gatti C., Bachschmid M., Martin-Padura I., Savoia C., Migliaccio E., Pelicci P.G., Schiavoni M., Luscher T.F., Volpe M., Cosentino F. // *Circulation.* 2004. V. 110. № 18. P. 2889–2895.
17. Orsini F., Migliaccio E., Moroni M., Contursi C., Raker V.A., Piccini D., Martin-Padura I., Pelliccia G., Trinei M., Bono M., Puri C., Tacchetti C., Ferrini M., Mannucci R., Nicoletti I., Lanfrancione L., Giorgio M., Pelicci P.G. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 24. P. 25689–25695.
18. Xiao D., Singh S.V. // *Cancer Res.* 2010. V. 70. № 8. P. 3150–3158.
19. Graiani G., Lagrasta C., Migliaccio E., Spillmann F., Meloni M., Madeddu P., Quaini F., Padura I.M., Lanfrancione L., Pelicci P., Emanuelli C. // *Hypertension.* 2005. V. 46. № 2. P. 433–440.
20. Haga S., Terui K., Fukai M., Oikawa Y., Irani K., Furukawa H., Todo S., Ozaki M. // *J. Hepatol.* 2008. V. 48. № 3. P. 422–432.
21. Di Stefano V., Cencioni C., Zaccagnini G., Magenta A., Capogrossi M.C., Martelli F. // *Cardiovasc. Res.* 2009. V. 82. № 3. P. 421–429.
22. Almeida M., Han L., Ambrogini E., Bartell S.M., Manolagas S.C. // *Mol. Endocrinol.* 2010. V. 24. № 10. P. 2030–2037.
23. Smith W.W., Norton D.D., Gorospe M., Jiang H., Nemoto S., Holbrook N.J., Finkel T., Kusiak J.W. // *J. Cell Biol.* 2005. V. 169. № 2. P. 331–339.
24. Malhotra A., Vashistha H., Yadav V.S., Dube M.G., Kalra S.P., Abdellatif M., Meggs L.G. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009. V. 296. № 2. P. H380–388.
25. Khanday F.A., Yamamori T., Mattagajasingh I., Zhang Z., Bugayenko A., Naqvi A., Santhanam L., Nabi N., Kasuno K., Day B.W., Irani K. // *Mol. Biol. Cell.* 2006. V. 17. № 1. P. 122–129.
26. Husain M., Meggs L.G., Vashistha H., Simoes S., Griffiths K.O., Kumar D., Mikulak J., Mathieson P.W., Saleem M.A., Del Valle L., Pina-Oviedo S., Wang J.Y., Seshan S.V., Malhotra A., Reiss K., Singhal P.C. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 24. P. 16648–16658.
27. Tiberi L., Faisal A., Rossi M., Di Tella L., Franceschi C., Salvioli S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 342. № 2. P. 503–508.
28. Wu Z., Rogers B., Kachi S., Hackett S.F., Sick A., Campochiaro P.A. // *J. Cell. Physiol.* 2006. V. 209. № 3. P. 996–1005.
29. Carraro F., Pucci A., Pellegrini M., Pelicci P.G., Baldari C.T., Naldini A. // *J. Cell Physiol.* 2007. V. 211. № 2. P. 439–447.
30. Ma Z., Myers D.P., Wu R.F., Nwariaku F.E., Terada L.S. // *J. Cell Biol.* 2007. V. 179. № 1. P. 23–31.
31. Rota M., LeCapitaine N., Hosoda T., Boni A., De Angelis A., Padin-Iruegas M.E., Esposito G., Vitale S., Urbanek K., Casarsa C., Giorgio M., Luscher T.F., Pelicci P.G., Anversa P., Leri A., Kajstura J. // *Circ. Res.* 2006. V. 99. № 1. P. 42–52.
32. Rapino C., Bianchi G., Di Giulio C., Centurione L., Cacchio M., Antonucci A., Cataldi A. // *Aging Cell.* 2005. V. 4. № 4. P. 177–185.
33. Le S., Connors T.J., Maroney A.C. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 51. P. 48332–48336.
34. Hu Y., Wang X., Zeng L., Cai D.Y., Sabapathy K., Goff S.P., Firpo E.J., Li B. // *Mol. Biol. Cell.* 2005. V. 16. № 8. P. 3705–3718.
35. Pinton P., Rimessi A., Marchi S., Orsini F., Migliaccio E., Giorgio M., Contursi C., Minucci S., Mantovani F., Wieckowski M.R., Del Sal G., Pelicci P.G., Rizzuto R. // *Science.* 2007. V. 315. № 5812. P. 659–663.
36. Foschi M., Franchi F., Han J., La Villa G., Sorokin A. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 28. P. 26640–26647.
37. Faisal A., el-Shemerly M., Hess D., Nagamine Y. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 33. P. 30144–30152.
38. Sansone P., Storci G., Giovannini C., Pandolfi S., Pianetti S., Taffurelli M., Santini D., Ceccarelli C., Chieco P., Bonafe M. // *Stem Cells.* 2007. V. 25. № 3. P. 807–815.
39. Tomilov A.A., Bicocca V., Schoenfeld R.A., Giorgio M., Migliaccio E., Ramsey J.J., Hagopian K., Pelicci P.G., Cortopassi G.A. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 2. P. 1153–1165.
40. Nemoto S., Finkel T. // *Science.* 2002. V. 295. № 5564. P. 2450–2452.
41. Berniakovich I., Trinei M., Stendardo M., Migliaccio E., Minucci S., Bernardi P., Pelicci P.G., Giorgio M. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 49. P. 34283–34293.
42. Lebieczinska M., Karkucinska-Wieckowska A., Giorgi C., Karczmarewicz E., Pronicka E., Pinton P., Duszynski J., Pronicki M., Wieckowski M.R. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. V. 1797. № 6–7. P. 952–960.

43. Chahdi A., Sorokin A. // *Mol. Biol. Cell.* 2008. V. 19. № 6. P. 2609–2619.
44. Nemoto S., Combs C.A., French S., Ahn B.H., Fergusson M.M., Balaban R.S., Finkel T. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 15. P. 10555–10560.
45. Ventura A., Maccarana M., Raker V.A., Pelicci P.G. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 3. P. 2299–2306.
46. Orsini F., Moroni M., Contursi C., Yano M., Pelicci P., Giorgio M., Migliaccio E. // *Biol. Chem.* 2006. V. 387. № 10–11. P. 1405–1410.
47. Green D.R., Kroemer G. // *Science.* 2004. V. 305. № 5684. P. 626–629.
48. Margoliash E., Lustgarten J. // *J. Biol. Chem.* 1962. V. 237. P. 3397–3405.
49. Schejter A., Glauser S.C., George P., Margoliash E. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1963. V. 73. P. 641–643.
50. Person P., Fine A.S., Mora P.T., Zipper H. // *J. Biol. Chem.* 1965. V. 240. P. 3159–3164.
51. Margoliash E., Schejter A. // *Adv. Protein Chem.* 1966. V. 21. P. 113–286.
52. Petersen L.C., Cox R.P. // *Biochem. J.* 1980. V. 192. № 2. P. 687–693.
53. Markova O.V., Evstafieva A.G., Mansurova S.E., Moussine S.S., Palamarchuk L.A., Pereverzev M.O., Vartapetian A.B., Skulachev V.P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. V. 1557. № 1–3. P. 109–117.
54. Gertz M., Fischer F., Wolters D., Steegborn C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 15. P. 5705–5709.
55. Gertz M., Fischer F., Leipelt M., Wolters D., Steegborn C. // *Ageing (Albany NY).* 2009. V. 1. № 2. P. 254–265.
56. Jang H.H., Lee K.O., Chi Y.H., Jung B.G., Park S.K., Park J.H., Lee J.R., Lee S.S., Moon J.C., Yun J.W., Choi Y.O., Kim W.Y., Kang J.S., Cheong G.W., Yun D.J., Rhee S.G., Cho M.J., Lee S.Y. // *Cell.* 2004. V. 117. № 5. P. 625–635.
57. Fourquet S., Huang M.E., D'Autreaux B., Toledano M.B. // *Antioxid. Redox Signal.* 2008. V. 10. № 9. P. 1565–1576.
58. Matsumura T., Okamoto K., Iwahara S., Hori H., Takahashi Y., Nishino T., Abe Y. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 1. P. 284–293.