

АПОПТОЗ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ: МЕХАНИЗМЫ И ЭВОЛЮЦИЯ

Обзор

© 2004 г. А.В. Гордеева*, Ю.А. Лабас, Р.А. Звягильская

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва,
Ленинский пр., 33; факс: (095) 954-2732,
электронная почта: anna_gord@mail.ru*

Поступила в редакцию 24.12.03

После доработки 06.02.04

Обобщены данные о запрограммированной смерти (апоптозе) одноклеточных организмов разных уровней филогенеза — от бактерий до инфузорий. Апоптоз появился уже у низших эукариот, но его пусковые механизмы отличались от классических. В ходе эволюции звенья апоптозной цепи возникали постепенно. У всех эукариот ведущую роль в запуске апоптоза играют активные формы кислорода и Ca^{2+} . У всех имеются ингибиторы апоптоза, по-видимому, занесенные вирусами. Первыми в ходе эволюции возникли каспазы и апоптоз-индуцирующий фактор; затем постепенно появились все остальные белки, среди которых в последнюю очередь — так называемые рецепторы смерти. В запрограммированной смерти прокариот участвуют функциональные аналоги эукариотических белков апоптоза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: апоптоз, активные формы кислорода, бактерии, Ca^{2+} , каспазы, рецепторы смерти, филогенез, эволюция, эукариоты.

Апоптоз, или запрограммированная смерть клеток, представляет собой регулируемый процесс самоубийства на клеточном уровне. Его роль незаменима в индивидуальном развитии и поддержании тканевого гомеостаза у многоклеточных организмов. Нарушение регуляции апоптоза приводит к развитию ряда заболеваний [1].

В многоклеточном организме каждая клетка в любой момент готова погибнуть, если это необходимо для блага организма в целом. Но, как показали недавние исследования, апоптоз имеет место также у одноклеточных организмов [2, 3]. Каково у них назначение этого процесса? Когда возникла запрограммированная смерть в филогенезе? Как клетки «научились» организованно погибать «по команде»? Эти вопросы мы пытаемся обсудить в нашем обзоре. Но вначале рассмотрим пусковые механизмы классического апоптоза на примере млекопитающих.

ЧТО ТАКОЕ АПОПТОЗ?

От другого вида запрограммированной смерти — некроза [4], апоптоз отличает ряд морфологических и биохимических особенностей. При

апоптозе происходит отделение клеток от внеклеточного матрикса [5], конденсация ядра, сморщивание цитоплазматической мембраны и, в итоге, образование так называемых апоптозных телец — мембранных пузырьков с клеточным содержимым, поглощаемых впоследствии макрофагами и соседними клетками. На молекулярном уровне наблюдаются, в частности, разрывы нитей ДНК между нуклеосомами и концентрирование фосфатидилсерина на внешней стороне плазматической мембраны. Макрофаги выделяют особый гликопротеин MFG-E8 (milk fat globule-EGF-factor 8), который специфически связывается с фосфатидилсерином на поверхности клеток, впадших в апоптоз [6]. Вероятно, он служит меткой, по которой макрофаги узнают погибшие клетки. Эти изменения наблюдаются во всех тканях у всех изученных видов [7]. При некрозе, напротив, происходит набухание клетки и органелл, нарушение целостности всех мембранных структур, в первую очередь лизосом, и, как следствие, автолиз. И некроз, и апоптоз сопровождаются резким снижением уровня АТФ и изменением ультраструктуры митохондрий [8, 9].

В биохимическом механизме апоптоза выделяют четыре основных компонента: 1) Cys-Asp-протеазы, или каспазы, 2) так называемые ре-

* Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

цепторы смерти на поверхности клетки, 3) митохондрии и выходящий из них цитохром *c* и 4) специальные про- и антиапоптозные белки [10]. Такие вторичные мессенджеры, как Ca^{2+} , активные формы кислорода (АФК) и окись азота (NO), также играют важную роль в апоптозе [11].

ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ПРОЦЕССА АПОПТОЗА

Каспазы (семейство Cys-Asp-протеаз) выполняют центральную роль в запуске апоптоза [12]. У млекопитающих семейство каспаз состоит из 14 белков, постоянно синтезируемых практически во всех клетках в виде проферментов, активирующихся при апоптозе. Прокаспазы (32–56 кДа) содержат 4 домена: N-концевой домен, большую (17–21 кДа) и малую (10–13 кДа) субъединицы и короткую связующую область между ними [12]. При активации N-концевой домен и связующий фрагмент между субъединицами отщепляются. В результате формируется гетеродимер [13]. Активная каспаза – это тетрамер, состоящий из двух таких гетеродимеров [14].

Последовательная активация каспаз позволила создать концепцию о так называемом каспазном каскаде [15]. Этот каскад начинается с автокаталитической активации инициаторной каспазы, которая в свою очередь активирует эффекторные каспазы [16]. Таким образом, существуют инициаторные (-2, -8, -9, -10, -12) и эффекторные (-3, -6, -7) каспазы. Эти последние расщепляют актиновые филаменты, ингибируют биосинтез белков и активируют ДНКазу [17]. Прочие представители семейства – (-1, -4, -5, -11, -13) каспазы – в апоптозе не участвуют [12]. Они принимают участие в развитии воспалительных процессов, а также, наряду с эффекторными каспазами, в пролиферации Т-лимфоцитов, терминальной дифференцировке эпителиальных клеток хрусталика и кератиноцитов [14, 18].

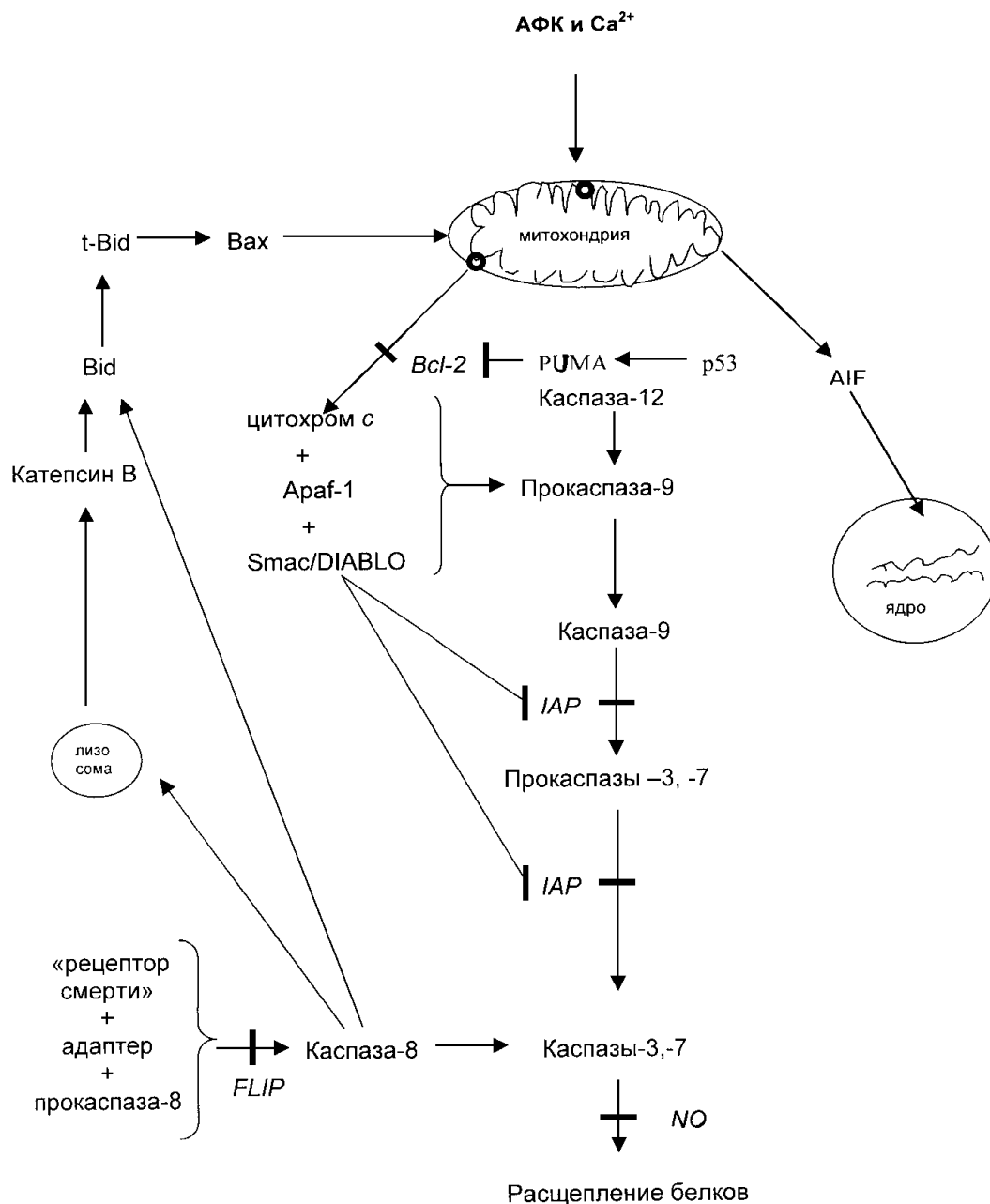
Так называемые «рецепторы смерти». У млекопитающих апоптоз часто начинается с активации так называемых «индуцирующих смерть сигнальных комплексов» на плазматической мембране. Эти комплексы образуются при взаимодействии определенных внеклеточных лигандов – например, Fas или TNF (tumor necrosis factor) с белками семейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFR) [10] на клеточной мембране, называемых «рецепторами смерти». При связывании лигандов они активируют каспазу-8, образуя «индуцирующий смерть сигнальный комплекс», содержащий «рецептор

смерти», адаптеры TRADD (TNFR1-associated protein with death domain) или FADD (Fas-associated protein with death domain) и профермент каспазы-8 [16]. Активированная каспаза-8 высвобождается в цитоплазму и там инициирует протеазный каскад, активирующий эффекторные каспазы – в частности каспазу-3 [19], которая служит точкой пересечения рецепторного и митохондриального путей активации каспаз [12] (рисунок).

Митохондриям принадлежит центральная роль в осуществлении апоптоза у млекопитающих. Сигналы от рецепторов смерти или от поврежденных участков клетки сходятся на них, вызывая повышение проницаемости обеих мембран, снижение мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) и высвобождение белков апоптоза – апоптоз-индуцирующего фактора (AIF) [20], SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases) и некоторых прокаспаз – из межмембранного пространства.

Высвобождение этих белков происходит вследствие открытия высокопроницаемого канала – так называемой митохондриальной поры, состоящей из 30 кДа-транслокатора адениновых нуклеотидов, 32 кДа-потенциал-зависимого анионного канала (порина) и 18 кДа-бензодиазепинового рецептора внешней мембраны митохондрий [21–23]. С нею ассоциированы также другие белки: члены семейства Bcl-2, речь о которых пойдет ниже, циклофилин D и ферменты энергетического метаболизма – гексокиназа и креатинкиназа. При связывании ионов Ca^{2+} этот комплекс образует мембранную пору диаметром 2,6–2,9 нм, способную пропускать низкомолекулярные вещества с $M_r \leq 1500$, что приводит к быстрому освобождению Ca^{2+} , снижению $\Delta\Psi_m$ и высокоамплитудному набуханию митохондрий [21–24]. Открытие поры стимулируется рядом факторов, в том числе неорганическим фосфатом, прооксидантами, SH-реагентами, истощением митохондриального пула АТФ. Напротив, Mg^{2+} [25], адениновые нуклеотиды [21, 24], антиоксиданты, спермин [26] и циклоспорин А [27] способствуют закрытию поры. Открытие неспецифической Ca^{2+} -зависимой поры рассматривается как один из путей эффективного вывода катиона из митохондрий млекопитающих в условиях, когда концентрация свободного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{in}$) достигает высоких величин и как ключевое событие в запуске реакций апоптоза [1, 21, 24, 28] и некроза [29, 30] животных клеток.

Наряду со специфически апоптозными белками, в цитоплазму выходит цитохром *c*. Там он связывается с Araf-1 (apoptotic protease activating factor-1) и формирует так называемый апопто-



Общая схема «классического» апоптоза млекопитающих (за основу взята схема из [11]). АФК и Ca^{2+} открывают митохондриальную пору, что вызывает набухание митохондрий, повреждение их наружной мембраны и выход в цитоплазму цитохрома *c* и AIF. Цитохром *c* формирует комплекс с цитозольными белками Араf-1, Smac/DIABLO и прокаспазой-9, приводя к образованию активной каспазы-9. Она в свою очередь активирует прокаспазы-3 и -7. Процессы активации каспаз блокируются ингибиторами белков апоптоза (IAP), а те в свою очередь ингибируются Smac/DIABLO. Каспаза-12 может активировать каспазу-9 без участия цитохрома *c* [39]. Прокаспазы-3 и -7 активируются также каспазой-8, в свою очередь активируемой «индуцирующими смерть сигнальными комплексами» в плазмалемме. Они состоят из рецептора смерти и специфичного для него адаптера, взаимодействующего с прокаспазой-8. Белок FLIP, блокирует активацию каспазы-8 [18]. Каспаза-8 вызывает выход из лизосом активного катепсина В, который затем частично расщепляет цитозольный белок Bid, или сама расщепляет его, после чего он, превращаясь в активный белок tBid активирует путем частичного расщепления другой проапоптозный белок – Вах. Тот, взаимодействуя с митохондриальным белком порином, образует во внешней мембране канал, по которому выходят цитохром *c* и AIF [41]. AIF направляется прямо в ядро и вызывает деградацию ДНК. Всl-2 препятствует выходу цитохрома *c* из митохондрий, а Вах способствует ему, образуя специальный канал путем взаимодействия с порином. p53 активирует PUMA, который затем связывает Всl-2 и тем стимулирует выход цитохрома *c* из митохондрий [44]. NO блокирует апоптоз посредством избирательного нитрозилирования эффекторных каспаз [11]

сомный комплекс, инициирующий активацию каспазного каскада. С помощью Smac и Omi/HtrA2 (Omi stress-regulated endopeptidase/high temperature requirement protein A2) цитохром *c* запускает Araf-1-зависимую активацию каспазы-9 [31]. Каспаза-9 активирует каспазы-3 и -7 (рисунок); те в свою очередь расщепляют различные белки, приводя к появлению биохимических и морфологических признаков апоптоза [32].

Цитохром *c* связан с внутренней мембраной митохондрий отрицательно заряженными фосфолипидами, преимущественно кардиолипином. Эта связь обусловлена, с одной стороны, электростатическим взаимодействием между положительно заряженными остатками лизина в цитохроме *c* и отрицательно заряженными фосфатными группами в кардиолипине [33], с другой — гидрофобным взаимодействием между углеродной цепью кардиолипина и гидрофобными участками молекулы цитохрома, обуславливающим ее частичное погружение в мембрану [34].

Следовательно, для выхода цитохрома *c* одного лишь нарушения целостности мембраны недостаточно. Электростатически связанный цитохром *c* мобилизуется при изменениях ионной силы, плотности поверхностного заряда или pH [35], а гидрофобно связанный — при окислительной модификации митохондриальных липидов [36].

Таким образом, митохондрии не только служат энергетическими станциями эукариотических клеток, но также исполняют главную роль в запуске апоптоза посредством выделения индуцирующих его факторов, таких как цитохром *c* и AIF. Гомологи этого последнего имеются у животных, растений, бактерий и археобактерий [37]. Современные прокариоты выделяют белки, которые индуцируют апоптоз в клетках млекопитающих посредством стабилизации супрессора опухолей p53. Это представляет интерес в контексте симбиотической гипотезы происхождения митохондрий [38].

Однако цитохром *c* не всегда является необходимым звеном апоптозной цепи [9]. Так, например, при апоптозе в сердечной ткани он вообще не выходит из межмембранного пространства [9]. Каспаза-12 может активировать каспазу-9 без его участия [39] (рисунок).

На изолированных митохондриях печени показано, что выход цитохрома *c* может быть Ca²⁺-зависимым или Ca²⁺-независимым [40]. В первом случае, повышение внутримитохондриальной концентрации Ca²⁺ вызывает открывание поры, приводящее к высвобождению цитохрома *c*. Ca²⁺-Независимый выход цитохрома контролируется белками семейства Bcl-2 (B-cell leukaemia-2).

Семейство Bcl-2. Белки Bcl-2 семейства регулируют апоптоз на уровне митохондрий. Предотвращающие апоптоз представители этого большого семейства включают собственно Bcl-2, а также Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Al и Bcl-2L1; проапоптозные белки — Bax, Bad, Bcl-2S, Bak, Bid, Bik, Bim, Crk и Mtd.

Цитозольный Bid (p22) расщепляется каспазой-8, активируемой через «рецепторы смерти», и лизосомными протеазами катепсинами. Образующийся активный белок, так называемый truncated Bid (t-Bid), изменяет конформацию другого проапоптозного белка — Bax, после чего тот встраивается во внешнюю мембрану митохондрий, где образует комплекс с порином. Вместе они образуют канал, по которому из межмембранного пространства выходят цитохром *c* и другие проапоптозные белки [41] (рисунок).

Проапоптозные белки этого семейства, в отличие от обычно связанных с цитоскелетом, при запуске апоптоза переносятся в митохондрии, где инактивируют встроенные в их мембраны антиапоптозные белки. Bcl-xL и вышеупомянутый Bax образуют ионные каналы в искусственных мембранах, что позволяет предполагать регуляцию апоптоза через образование пор. Bcl-2 действует как антиоксидант и блокирует выход цитохрома *c* (рисунок). Считается, что соотношение про- и антиапоптозных членов семейства определяет, жить клетке или умирать [9].

Катепсин В, лизосомная цистеиновая протеаза, также принимает участие в апоптозе. Каспаза-8 вызывает выход активного катепсина из лизосом, а тот усиливает выход цитохрома *c* из митохондрий [42] (рисунок).

p53 принимает участие в запуске апоптоза, вызванного повреждениями ДНК, активацией онкогенов и гипоксией [43], взаимодействуя с Bax, стимулируя «рецепторы смерти» и активируя гены апоптоза. p53 активирует т.н. PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis), который затем связывает Bcl-2 и тем самым стимулирует выход цитохрома *c* из митохондрий [44] (рисунок).

Некоторые Ca²⁺-связывающие белки, например ALG-2 (apoptosis-linked gene-2), тоже принимают участие в апоптозе. Взаимодействующий с ним белок Alix (ALG-interacting protein X, известный также как AIP1), регулирует апоптоз, связывая ALG-2 [45]. Молекула ALG-2 включает сорцин, пеплин, гранкальцин и кальпоин [46].

Кальпоины, в отличие от каспаз, специфически расщепляют белки, содержащие области, богатые Pro-, Asp-, Ser- и Thr-остатками и называемые PAST-мотивами [47]. К ним относится ДНК-лигаза III [48], содержащая такой мотив в N-концевой области. Кроме того, кальпоины

освобождают каспазы от связанных с ними ингибиторов белков апоптоза [49].

Ингибиторы белков апоптоза. Поскольку активация каспаз приводит к необратимым последствиям, их активность тщательно регулируется. В этом принимают участие ингибиторы белков апоптоза (inhibitors of apoptosis proteins, IAPs). Впервые обнаруженные у бакуловирусов [50] гомологи IAP найдены у всех эукариот, от дрожжей до млекопитающих [51]. У млекопитающих обнаружено восемь представителей этого семейства, каждый из которых содержит от одного до трех 70-аминокислотных участков, называемых BIR-доменами (baculoviruses inhibitor of apoptosis repeat domains) [52]. Кодированный X-хромосомой XIAP [53] и клеточные ингибиторы апоптозных белков (cellular inhibitors of apoptosis protein; cIAP1,2) содержат каждый три N-концевых BIR-домена и C-концевой RING (really interesting new gene)-домен [54]. Эти белки ингибируют каспазы -3, -7, -9 [55]. BIR-домены целенаправленно связываются с каспазами, блокируя их активные сайты [56]. C-Концевой RING-домен обеспечивает деградацию каспаз [57] благодаря своей убиквитин-лигазной активности [54]; 76-аминокислотный белок убиквитин служит «черной меткой»: присоединившие его белки подвергаются протеолизу [58].

Как все ингибиторы протеаз, XIAP, cIAP1 и cIAP 2 сами подвержены отрицательной регуляции. В частности, 25 кДа-митохондриальный полипептид Smac/DIABLO (direct IAP-binding protein with low pI), выходя из митохондрий в цитозоль, связывается с ними и нарушает их связывание с каспазами [59], ускоряя, таким образом, их активацию [60]. Также ведет себя Omi/HtrA2 [61]. При сверхэкспрессии каспазы -3 и -7 могут сами расщеплять XIAP [62].

По последним данным, XIAP, cIAP1 и 2 способны противостоять ингибирующему действию Smac/DIABLO, присоединяя к нему убиквитин [63, 64]. Одна из изоформ Smac/DIABLO, Smac3, в свою очередь стимулирует присоединение убиквитина к XIAP [65]. Другой эндогенный ингибитор каспаз, белок FLIP (FLICE-inhibitory protein), связывается с «индуцирующими смерть сигнальными комплексами», блокируя активацию каспазы-8 и передачу проапоптотического сигнала от «рецепторов смерти» семейства TNFR [18].

АФК, Ca^{2+} и окись азота в запуске апоптоза. Апоптоз часто сопровождается продукцией АФК [66]. У многоклеточных организмов АФК могут стоять как в начале, так и в конце регуляторной цепи процесса запрограммированной смерти. При апоптозе, вызванном ишемией, АФК действуют прежде Вах и каспаз [67]. В этих слу-

чаях гашение АФК предотвращает активацию каспаз, показывая, что АФК не просто вызывают смертельные повреждения, а действуют как сигнальные молекулы [68]. АФК могут вступать в процесс апоптоза и на поздних его стадиях. Отсутствие в среде K^+ , приводящее к гиперполяризации плазмалеммы, повышению $[Ca^{2+}]_{in}$ и набуханию клетки, индуцировало апоптоз в нейронах мозжечка, вызывая генерацию АФК. Актиномицин Д, циклогексимид и ингибиторы каспаз предотвращали продукцию АФК, позволяя предположить, что она происходит в результате транскрипции, трансляции и посттрансляционной модификации прокаспаз [69, 70].

Поглощение Ca^{2+} митохондриями – важное и необходимое событие как для апоптоза, так и для некроза [8]. Многими авторами показано, что $[Ca^{2+}]_{in}$ и АФК в различных типах клеток (по крайней мере, у многоклеточных) тесно взаимосвязаны. Повышение $[Ca^{2+}]_{in}$ приводит к активации ряда АФК-образующих ферментов, включая стимуляцию образования АФК в дыхательной цепи митохондрий [71]. Обработка нервных клеток 3-нитропропионовой кислотой (3-НП, необратимым ингибитором сукцинатдегидрогеназы, который повышает продукцию O_2^- и, как следствие, H_2O_2 и $ONOO^-$ митохондриями) приводила к быстрому увеличению $[Ca^{2+}]_{in}$. Хелатор внутриклеточного Ca^{2+} ВАРТА АМ предотвращал апоптоз, вызванный 3-НП. Сходным образом, нифедипин (блокатор L-типа Ca^{2+} -каналов цитоплазматической мембраны) и дантролен (блокатор высвобождения Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума) значительно снижали индуцированный 3-НП апоптоз [72].

В изолированных митохондриях АФК и внутримитохондриальный Ca^{2+} могут действовать совместно, индуцируя проницаемость внутренней митохондриальной мембраны (поры) [73]. За высокую проницаемость внутренней митохондриальной мембраны, индуцируемую неорганическим фосфатом, разобщителями или прооксидантами (*mpet*-бутил гидропероксидом и диамидом), ответственно Ca^{2+} -зависимое образование АФК в дыхательной цепи [74]. Связывание Ca^{2+} с субмитохондриальными частицами вызывало такую перестройку липидного матрикса, которая приводила к дезорганизации компонентов дыхательной цепи, благоприятствуя продукции АФК и последующему окислению белков и липидов. АФК, атакующие тиоловые группы мембранных белков, вызывали образование дисульфидных мостиков, что в свою очередь вызывало открывание мембранной поры при связывании Ca^{2+} [74].

Таким образом, АФК и Ca^{2+} открывают митохондриальную пору, что вызывает набухание

митохондрий, повреждение их наружной мембраны и выход из межмембранного пространства в цитоплазму цитохрома *c* и AIF. Цитохром *c* формирует комплекс с цитозольными белками Araf-1, Smac/DIABLO и прокаспазой-9, приводя к образованию активной каспазы-9. Она в свою очередь активирует прокаспазы-3 и -7. Процессы активации каспаз блокируются ингибиторами белков апоптоза (IAP), а те в свою очередь ингибируются Smac/DIABLO. Каспаза-12 может активировать каспазу-9 без участия цитохрома *c* [39]. Прокаспазы-3 и -7 активируются также каспазой-8, в свою очередь активируемой так называемыми «индуцирующими смерть сигнальными комплексами» в плазмалемме. Они состоят из рецептора смерти и специфического для него адаптера, взаимодействующего с прокаспазой-8. Белок FLIP блокирует активацию каспазы-8 [18].

Каспаза-8 вызывает выход из лизосом активного катепсина В, который затем частично расщепляет цитозольный белок Bid, или сама расщепляет его, после чего он, превращаясь в активный белок tBid, активирует другой проапоптотический белок — Вах. Тот, взаимодействуя с митохондриальным белком порином, образует во внешней мембране канал, по которому выходят цитохром *c* и AIF [41].

AIF направляется прямо в ядро и вызывает деградацию ДНК. Bcl-2 препятствует выходу цитохрома *c* из митохондрий. NO блокирует апоптоз посредством избирательного нитрозилирования эффекторных каспаз [11]. В процессе высвобождения апоптотических белков митохондрии разрушаются. Общая схема классического апоптоза представлена на рисунке (за основу взята схема из [11]).

КОНСЕРВАТИВЕН ЛИ АПОПТОЗ?

У нематоды *Caenorhabditis elegans* идентифицировано 13 ответственных за апоптоз генов. Два из трех ключевых генов этого пути — *ced-9*, супрессор клеточной гибели, и *ced-3*, ее индуктор — кодируют белки, гомологичные Bcl-2 и каспазе-1 соответственно. Эти данные позволяют предполагать эволюционную консервативность генетического механизма запрограммированной смерти клеток, по крайней мере, от червей до млекопитающих [75]. У относительно примитивных кишечнополостных и губок апоптоз уже играет важную роль в морфогенезе и репродукции. Фермент, подобный каспазе-3, найден у гидры *Hydra vulgaris* [76]. У еще более примитивных губок уже имеются белки семейства Bcl-2 и «рецепторы смерти» [76]. Недавние исследования

показали, что запрограммированная смерть также имеет место у одноклеточных эукариот [2] и у прокариот [3]. Рассмотрим же процесс апоптоза у одноклеточных организмов разных уровней филогенеза — от бактерий до инфузорий.

СПЕЦИФИКА ПРОТЕКАНИЯ АПОПТОЗА У ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ РАЗНЫХ УРОВНЕЙ ФИЛОГЕНЕЗА

Прокариоты. У бактерий, как и у многоклеточных, запрограммированная смерть играет важную роль в ряде жизненных процессов, таких как лизис материнской клетки при споруляции и вегетативных клеток при образовании плодового тела у миксобактерий, а также при спонтанном автолизе [2]. У бактерии *Bacillus subtilis* материнская клетка активно лизируется при высвобождении споры. Найдены гены белков — автолизинов, ответственных за этот процесс [2]. Образование плодового тела и споруляция у *Mycobacterium xanthus* — пример участия запрограммированной смерти в развитии. «Аутоциды» — жирные кислоты и глюкозамины, вызывающие автолиз в плотных культурах *M. xanthus*, необходимы для развития плодового тела и споруляции. Вероятно, лизис вегетативных клеток — альтруистический суицид, позволяющий сохранить питательные вещества для плодового тела и формирующихся спор [2]. У ряда видов автолиз служит для естественной трансформации, когда бактерии поглощают ДНК других бактерий той же популяции, подвергшихся автолизу. Ген основного автолизина *Streptococcus pneumoniae* (*lytA*) расположен в том же опероне, что и *recA*, ответственный за гомологичную рекомбинацию с новоприобретенной ДНК. Оба эти гена индуцируются так называемым quorum-sensing factor — пептидным феромоном, который накапливается при высокой плотности культуры [2]. Программируемой смерти подвергаются также инфицированные клетки. Некоторые штаммы *Escherichia coli* вырабатывают протеазу, активируемую фаговыми белками. Она в свою очередь расщепляет и инактивирует бактериальный фактор трансляции (EF-Tu), убивая инфицированную бактерию. Это очень напоминает индуцируемый каспазами апоптоз животных, но гомологии между бактериальными протеазами и каспазами не прослеживаются [77]. *E. coli* имеет еще по меньшей мере два пути уничтожения дефектных клеток. Один из них включает такой же суицидальный каскад, но его мишень — специфичная рибонуклеаза лизиновой тРНК. Другой вызывает синтез белков RexA и RexB, где первый — рецептор фаговой ДНК, а второй —

ионный канал, активируемый комплексом фазовой ДНК с RexA. Этот канал нарушает ионные градиенты бактериальной мембраны, тем самым убивая клетку. Любопытно, что все эти системы кодируются профагами и плазмидами [77] и поддерживаются естественным отбором. Некоторые белки апоптоза эукариот имеют бактериальные гомологи. Домен, ответственный за взаимодействие с некоторыми белками апоптоза, найден у *Streptomyces*, *B.subtilis*, *Synechocystis* sp. и *Rhizobium* spp., а у *Streptomyces* spp. обнаружены гомологи каспаз. Правда, неизвестно, участвуют ли все эти белки в запрограммированной смерти бактерий или выполняют другие функции [2].

Автотрофные жгутиконосцы. Недавние исследования показали существование запрограммированной смерти у динофлагелляты *Peridinium gatunense*. Она индуцировалась окислительным стрессом и подавлялась каталазой, подтверждая древнюю эволюционную связь между АФК и клеточным суицидом. У *P. gatunense* выявлены типичные признаки апоптоза — фрагментация ДНК и образование цитоплазматических пузырьков. Ингибитор цистеиновых протеаз E-64 предотвращал смерть клеток, что может свидетельствовать о наличии каспаз у этих организмов [78]. Зеленая водоросль *Dunaliella tertiolecta* подвергалась апоптозу в отсутствие света; при этом наблюдались конденсация хроматина вдоль ядерной мембраны, деградация ядра и фрагментация ДНК. Параллельно с этим возрастала протеазная активность, подавляемая ингибиторами каспаз. Антитела против каспаз млекопитающих реагировали с белками водоросли. Экспрессия этих белков коррелировала с началом гибели клеток [79].

Гетеротрофные жгутиконосцы. Паразитическое простейшее *Leishmania major*, представитель одного из самых древних родов одноклеточных эукариот, содержит только одну гигантскую митохондрию, что делает его очень удобным объектом исследований. Ингибитор протеинкиназы С ставроспорин [80], вызывающий апоптоз в клетках млекопитающих, также действовал и на *L. major*, вызывая, при сохранении целостности мембраны, образование везикул, перераспределение фосфатидилсерина, снижение величины $\Delta\Psi_m$ митохондрий, выход цитохрома *c*, а на уровне ядра — конденсацию и фрагментацию хроматина и деградацию ДНК, предотвращаемые ингибиторами цистеиновых протеаз. Экстракт цитоплазмы *L. major* вызывал характерные для апоптоза изменения в изолированных ядрах млекопитающих, что может свидетельствовать о присутствии в нем AIF-подобных белков. Изолированные митохондрии *L. major*

теряли цитохром *c* при инкубации с рекомбинантным Вах человека даже тогда, когда Вах был лишен трансмембранного домена, необходимого для встраивания в наружные мембраны митохондрий. Следовательно, *L. major* экспрессирует белки, способные взаимодействовать с Вах. Таким образом, участие цистеиновых протеаз и митохондрий в гибели клеток может иметь очень древнее происхождение [81]. Инкубация с 4 мМ H_2O_2 вызывала похожую на апоптоз гибель промастигот *Leishmania donovani*; при этом наблюдались конденсация ядер, фрагментация ДНК и уменьшение объема клеток. Подвижность и выживаемость паразитов снижались по мере возрастания концентрации H_2O_2 . После 30 мин экспозиции заметно повышалась способность клеточных лизатов к расщеплению субстратов каспаз. Специфический ингибитор каспаз уменьшал число клеток с характерными проявлениями апоптоза. Следовательно, и у этих простейших имеются подобные каспазам белки, активируемые окислительным стрессом [82]. При индукции апоптоза H_2O_2 имела место зависящая от дозы и от времени потеря $\Delta\Psi$ митохондрий, сопровождаемая снижением уровня восстановленного глутатиона и АТР, но не открытием митохондриальной поры. Блокатор митохондриальной поры циклоспорин А не предотвращал снижение величины $\Delta\Psi$, но антиоксидант N-ацетилцистеин, предшественник глутатиона [83], способствовал восстановлению нормального уровня $\Delta\Psi$ и предотвращал гибель клеток [84]. У возбудителя малярии *Plasmodium berghei* также наблюдалась гибель оокинета, сопровождающаяся типичными морфологическими и биохимическими признаками апоптоза, в том числе появлением каспазной активности в цитоплазме [85]. Эта гибель не была вызвана внешними факторами и происходила спонтанно еще до внедрения в стенку кишечника первичного хозяина — москита, а также *in vitro*. Не исключено, что таким способом паразит сам контролирует плотность своей популяции [85]. Несмотря на видимое сходство апоптоза у многоклеточных животных и паразитических кинетопластид, лизосомальных катепсинов у этих последних не найдено [86].

Дрожжи. Когда была получена полная структура генома дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [87], в нем первоначально не было найдено гомологов ни каспаз, ни других белков, характерных для апоптоза у млекопитающих. Однако в том же году был найден мутант с явными признаками апоптоза: перераспределением фосфатидилсерина, конденсацией хроматина вдоль ядерной оболочки и фрагментацией клеток. Этот фенотип вызывала точковая мутация гена

cdc48S565G, кодирующего белок, ответственный за образование везикул [88]. Делеция гена *ASF1/CIA1*, кодирующего гистоновый шаперон, также приводила к апоптозу, следующему за остановкой клеточного цикла в фазе G_2/M . Более того, наблюдалось снижение величины $\Delta\Psi$ и выход цитохрома *c* из митохондрий [89]. У дрожжей *S. cerevisiae* апоптоз вызывали низкие дозы H_2O_2 . Ингибитор цитоплазматической трансляции циклогексимид, антиоксиданты и гипоксия предотвращали его. Эти данные позволяют думать, что генерация АФК исходно является ключевым событием апоптоза [90]. Стареющие материнские клетки *S. cerevisiae*, прошедшие более 20 почкований, сами продуцировали АФК [91]. От своих молодых потомков эти клетки отличались более крупными размерами (10–15 вместо 5–7 мкм), замедленным биосинтезом белков и неровной поверхностью. Кроме того, они демонстрировали типичные признаки апоптоза – фрагментацию хроматина и перераспределение фосфатидилсерина [91]. Вызывающая апоптоз обработка H_2O_2 индуцировала у дрожжей каспазную активность, полностью исчезающую после нокаута гена *yor197w* и заметно стимулируемую при сверхэкспрессии этого гена. Продукт гена *yor197w*, названный Yeast Caspase-1 (YCA1) [92], отвечает также за старение культур, тем самым подчеркивая биологический смысл уничтожения старых клеток. Отсутствие белка, кодируемого геном *ugl129c*, предотвращало апоптоз, вызванный YCA1. Этот белок является аналогом митохондриального белка животных, DAP-3, участвующего в цитокинзависимом апоптозе [93]. Для осуществления апоптоза у дрожжей необходимо наличие функциональных митохондрий [94, 95]. Инактивация теломер-связывающего белка *Cdc 13* митохондриальным белком *MTCO3* вызывала у *S. cerevisiae* зависимый от каспаз апоптоз, что позволяет предполагать активное участие митохондрий дрожжей в апоптотических процессах [96]. Представители Bcl-2 семейства у дрожжей не найдены; тем не менее гены проапоптотических белков млекопитающих при экспрессии в дрожжах вызывают их запрограммированную гибель. Так, например, экспрессия проапоптотического белка Вах под контролем промотора *GAL10* приводила к индуцируемой галактозой гибели клеток *S. cerevisiae* [97]. Таким образом, дрожжи представляют собой уникальную модель, позволяющую изучать на молекулярном уровне роль митохондрий в апоптозе [98]. Именно с помощью дрожжевых моделей была показана необходимость С-концевого трансмембранного домена Вах для его цитотоксического действия [97]. Они же позволили обнаружить в библиотеке

ДНК млекопитающих новый супрессор Вах, блокирующий его встраивание в мембрану митохондрий – Ku70 [99].

Экспрессия Вах и Вак животных в клетках *S. cerevisiae* и *Shizosacharomyces pombe* приводила к гибели клеток с характерными для каждого случая внешними признаками [100]. У экспрессирующих Вах *S. cerevisiae* наблюдались конденсация хроматина вдоль ядерной оболочки, расщепление ДНК, образование мембранных везикул и перераспределение фосфатидилсерина. Одновременная экспрессия Bcl-2 или Bcl-x_L, подавляющих апоптоз у животных, предотвращала вызванный Вах апоптоз у дрожжей [101]. Кроме того, экспрессия Bcl-2 защищала *S. cerevisiae* от гибели, вызванной окислительным стрессом [102]. Получен устойчивый к Вах мутант, у которого снижено количество белка Uth1p. Отсутствие этого белка не влияло на встраивание Вах во внешнюю мембрану митохондрий и высвобождение цитохрома *c*, но предотвращало окисление липидов митохондриальной мембраны и продукцию АФК. Отсутствие Uth1p вызывало также устойчивость к рапамицину – специфическому индуктору аутолиза [103]. У *S. pombe* найден Rad9-белок (Sp Rad9), содержащий последовательность аминокислот, необходимую для взаимодействия Sp Rad9 с Bcl-2. Сверхэкспрессия Bcl-2 в клетках *S. pombe* повышала устойчивость лишенных Rad9 мутантов к УФ-излучению и ионизирующей радиации [104]. Недавно найден еще один гомолог Rad9, специфичный для почкующихся дрожжей [105]. В геномах *S. pombe* и *S. cerevisiae* найдены гены белков-ингибиторов апоптоза (IAP) [106]. Лишенный их мутант *S. cerevisiae* нормально рос и делился в полной среде. Однако при голодании его диплоидные клетки плохо формировали споры, образуя вместо этого псевдогифы. Большинство формирующихся спор не выдерживали более двух делений после прорастания. Споры такого же мутанта *S. pombe* погибали на ранних стадиях дробления после прорастания спор, поскольку останавливались на переходе между метафазой и анафазой из-за неспособности образовать нормальное митотическое веретено [106]. Совсем недавно у *S. cerevisiae* найден белок, подобный NtrA-белку млекопитающих (у этих последних он является антагонистом XIAP [61]). Этот белок назвали Nma111p (nuclear mediator of apoptosis). Клетки, лишенные этого белка, лучше выживают при 50° и не обнаруживают признаков апоптоза при действии H_2O_2 . Сверхэкспрессия Nma111p, напротив, вызывала апоптоз [107]. У дрожжей запрограммированная смерть может быть вызвана веществами, которые они сами же и продуцируют,

например, уксусной кислотой, продуктом брожения. 20–80 мМ – уксусная кислота вызывала у *S. cerevisiae* подавляемую циклогексимидом конденсацию хроматина вдоль ядерной оболочки, перераспределение фосфатидилсерина и обрыв нитей ДНК [108]. Имели место также генерация АФК, выход цитохрома *c* в цитоплазму, снижение потребления кислорода и снижение величины $\Delta\Psi_m$ [109]. Гибель клеток, вызванная 120–200 мМ – кислотой, не подавлялась циклогексимидом и сопровождалась ультраструктурными изменениями, типичными для некроза [108]. Аналогичным образом действовала уксусная кислота на клетки *Candida albicans* [110] и *Zygosaccharomyces bailii* [111]. Причем у *C. albicans* апоптоз вызывала 40–60 мМ – кислота, а у *Z. bailii* – 320–800 мМ; более высокие концентрации в каждом случае вызывали некроз. α -Фактор, пептидный феромон, вырабатываемый α -типом гаплоидных клеток *S. cerevisiae*, при концентрации < 1 мкМ стимулировал конъюгацию клеток противоположного типа спаривания (а) с дрожжами α -типа, а при более высокой – вызывал блокаду клеточного цикла и апоптоз [112]. Индуцированная феромоном смерть клеток сопровождалась типичными признаками апоптоза. Мутация активируемой им протеинкиназы предотвращала и смерть, и появление маркеров апоптоза [93].

Цитохром *c* дрожжей, однако, не активировал каспазы в цитозольных экстрактах амфибий и млекопитающих. Это могло быть вызвано тем, что аминокислотные последовательности цитохромов *c* млекопитающих и дрожжей различаются почти на 45%; сродство цитохрома *c* млекопитающих к Araf-1 очень велико ($K = 10^{11} \text{ M}^{-1}$), что обусловлено, по-видимому, строгой специфичностью их взаимодействия. Вероятно, отсутствие апоптогенной активности дрожжевого цитохрома *c* обусловлено его структурными особенностями, препятствующими взаимодействию с Araf-1 [113]. У *S. cerevisiae* химерный белок, состоящий из цитохрома *c* и GFP (green fluorescent protein), нормально функционировал в цепи переноса электронов, но, в отличие от своего натурального аналога, не высвобождался в цитоплазму при экспрессии Вах. Тем не менее, клетки, экспрессирующие Вах, подвергались апоптозу, показывая тем самым, что выход цитохрома *c* не необходим для его запуска [114].

От всех рассмотренных выше одноклеточных организмов дрожжи отличаются наличием так называемого RIP (receptor interacting protein)-белка, взаимодействующего с Fas и с внутриклеточным доменом TNFR1 млекопитающих. С-Концевая область RIP содержит так называемый death domain, присутствующий во

внутриклеточных доменах Fas и TNFR1. Сверхэкспрессия RIP вызывала появление морфологических признаков апоптоза [115].

Слизистые грибы (миксомицеты). У слизистого гриба *Dictyostelium discoideum* переход к многоклеточному образу жизни индуцируется голоданием и начинается с агрегации отдельных амёб, сопровождающейся их дифференцировкой на живые споры и мертвые стебельковые клетки в составе плодового тела. Эти последние подвергаются запрограммированной гибели, в целом похожей на классический апоптоз, но сопровождающейся интенсивной вакуолизацией. Интересно, что фрагментации ДНК при этом не происходит [116]. Ингибиторы каспаз не препятствовали гибели клеток, но нарушали нормальное развитие плодовых тел [117]. Исследование генома амёб *Dictyostelium* показало, что гомологов белков классического апоптоза у них очень немного. Найден гомолог AIF, выполняющий те же функции [118], а также два гомолога ALG-2 (Dd-ALG-2a и -2b) и гомолог Alix. В присутствии Ca^{2+} Alix млекопитающих способен формировать гетеродимер с Dd-ALG-2a, но не с -2b. Гены обоих белков, Dd-ALG-2a и -2b, экспрессировались в растущих миксамебах. Уровень их мРНК достигал максимума в ходе агрегации миксамеб и после нее быстро снижался. Уровень самих белков при этом оставался стабильным. Мутанты, лишенные одного или обоих из этих генов, формировали нормальные плодовые тела, однако мутанты по *alix* имели ярко выраженные дефекты развития плодовых тел [46]. В отсутствие агрегации и дифференцировки *D. discoideum* также подвергается запрограммированной смерти, сопровождающейся снижением величины $\Delta\Psi$ митохондрий, перераспределением фосфатидилсерина в плазмалемме и поглощением погивших клеток соседними [119].

Инфузории – эукариотические организмы с двумя типами ядер: макронуклеусом и микронуклеусом. После полового процесса старый макронуклеус погибает, а новый образуется из зиготы. Элиминация макронуклеуса регулируется генетически и может быть предотвращена ингибиторами экспрессии генов или мутацией. Образовавшиеся в ходе дифференцировки макронуклеуса политенные хромосомы снова распадаются через несколько часов. Большая часть ДНК элиминируется и оставшаяся ДНК фрагментируется на мелкие молекулы, которые амплифицируются в новом макронуклеусе. Таким образом, конъюгирующие инфузории – пример избирательной гибели ядра (нуклеоптоза) в живой клетке [120]. Запрограммированная смерть ядра включает его конденсацию (пикноз) и олигонуклеосомную фрагментацию ДНК в роди-

тельском макронуклеусе. У паразитической инфузории *Tetrahymena* в ней, по-видимому, принимают участие каспазы-8 и -9, но не -3 [121]. Три вида *Tetrahymena* экспрессируют мембранные Fas-рецепторы. Все эти виды – паразиты рыб, неспецифические цитотоксические клетки которых вырабатывают лиганд Fas, благодаря которому и происходит апоптоз у паразитов [122]. Инфузория *Paramecium tetraurelia* синтезирует катепсины L [123] и S [124]. У *Tetrahymena pyriformis*, штамма W, найден катепсин B [125]. Ингибитор протеинкиназы C ставропорин [80] убивал клетки *T. thermophila*, блокируя передачу сигналов на выживание, пролиферацию и хеморецепцию. Вызванная им гибель имела характерные для апоптоза особенности и могла быть остановлена или предотвращена актиномицином D. Следовательно, это активный процесс, связанный с и/или требующий синтеза РНК *de novo* [126].

Итак, мы рассмотрели пусковые механизмы классического апоптоза и сопоставили их с данными о запрограммированной смерти одноклеточных организмов. Как видим, у самых примитивных организмов главную роль в запуске апоптоза выполняют АФК и Ca^{2+} . Однако и у них часто уже имеются гомологи белков апоптоза млекопитающих. В филогенезе роль этих последних неуклонно возрастает, но и у высших организмов АФК и Ca^{2+} , взаимосвязанные вторичные мессенджеры [71], продолжают играть важную роль в регуляции процесса запрограммированной смерти.

В целом апоптоз одноклеточных организмов имеет довольно много общего с таковым у млекопитающих, но в ходе эволюции его компоненты возникали постепенно. Практически у всех эукариот имеются ингибиторы апоптоза, занесенные, по-видимому, на заре жизни вирусами. Вероятно, им было «выгодно», чтобы инфицированный ими хозяин не погибал, давая вирусам возможность размножаться и заселять другие организмы. Эту «вирусную» стратегию использует и паразитическое простейшее *Theileria parva*, предотвращающее апоптоз инфицированных им Т-клеток хозяина посредством активации транскрипционного фактора NF-κB [127], и уже упоминавшийся гетеротрофный жгутиконосец *L. major*, усиливающий выработку подавляющего апоптоз интерлейкина-8 в нейтрофилах человека [128]. Практически у всех, кроме лишённого митохондрий простейшего *Trichomonas vaginalis* [129], важная роль в запуске апоптоза принадлежит митохондриям и высвобождаемым ими белкам – цитохрому *c* и AIF. Обращают на себя внимание принципиальные отличия запрограммированной смерти эукариот

и прокариот: если у первых вирусное происхождение имеют ингибиторы белков апоптоза, то у вторых (по крайней мере, у *E. coli*) белки, запускающие апоптоз, кодируются плазмидами и профагами [77]. Возможно, бактерии когда-то были инфицированы генами этих белков, и такое «приобретение» оказалось для них выгодным, так как позволяло избежать массовой гибели бактерий при заражении фагами отдельных особей. Белки, подобные каспазам, впервые появились у мезокариотических водорослей – динофлагеллят [78]. У слизистых грибов впервые появились ALG-2 и Alix [46]. Цистеиновые протеазы у них также имеются, но их роль непосредственно в апоптозе до конца не выяснена. Рецепторы смерти, по-видимому, впервые возникли лишь у относительно высокоорганизованных простейших – дрожжей [115] и инфузорий [122]. Белки, способные взаимодействовать с белками Bcl-2 семейства, в филогенезе впервые появляются, по-видимому, уже у гетеротрофных жгутиконосцев [81], хотя идентифицированы они только у дрожжей (Rad9; [104]). У инфузорий впервые появляются катепсины, но их роль в запрограммированной смерти этих организмов неясна [123–125].

Таким образом, для запуска апоптоза необходимо и достаточно трех компонентов: Ca^{2+} , АФК и хотя бы одной цистеиновой протеазы. В этой связи отметим, что инициаторные каспазы (-8, -9) в филогенезе возникают, по-видимому, раньше, чем эффекторные (-3). Последние появляются только у примитивных многоклеточных – кишечнополостных [76]. У большинства низших эукариот ведущая роль в запуске апоптоза принадлежит митохондриальным факторам – цитохрому *c* и AIF; но *T. vaginalis*, не имеющая митохондрий [129], каким-то образом обходится без этих факторов. Делеция гомологов ALG-2 у слизистых грибов не нарушала образование плодовых тел [46], из чего следует, что эти белки не являются необходимыми участниками апоптозного процесса. Следовательно, большинство белков, принимающих участие в запрограммированной смерти, предназначено для более тщательной ее регуляции, которая вряд ли была бы возможна при малом количестве звеньев.

Функции апоптоза у организмов разных уровней филогенеза, по-видимому, общие. У одноклеточных организмов апоптоз служит не только эффективным средством очистки сообщества от мутантных (дефектных) особей, но и обеспечивает процессы морфогенеза при образовании плодовых тел у миксобактерий [2] и слизистых грибов [116]. При недостаточном питании стареющие и поврежденные дрожжевые клетки погибают, чтобы их молодые и здоровые

потомки могли жить безбедно. Однако при полном отсутствии питательных субстратов (например, в дождевой воде), альтруизм теряет смысл и апоптоза не происходит [88]. У бактерий и дрожжей апоптоз запускается факторами, накапливающимися по мере повышения плотности культуры. У бактерии *M. xanthus* это жирные кислоты и глюкозамины [2], у дрожжей — уксусная кислота [108–111], H₂O₂ [90] и α-фактор [93, 112]. Вероятно, это предназначено для поддержания оптимальной плотности популяции одноклеточных организмов. Однако у инфузорий *T. thermophila* апоптоз, наоборот, наступает при низкой плотности культуры [130] потому, вероятно, что этим простейшим для нормального су-

ществования необходима высокая плотность культуры, облегчающая конъюгацию. У дрожжей апоптоз запускается феромоном, т.е. тем же веществом, что и спаривание, видимо, для того, чтобы виргинные (т.е. с большой вероятностью ущербные) клетки не отнимали питание у тех, кто здоров и может спариваться [93].

Авторы благодарны проф. А.П. Савицкому и М.А. Ханину за неоценимую помощь в подборе литературы, а также М. Ковиной за ценные замечания к рукописи. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты 02-04-49717а и 03-04-06653мас).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Самуилов В.Д., Олескин А.В., Лагунова Е.М. (2000) *Биохимия*, **65**, 1029–1046.
2. Ameisen, J.C. (1996) *Science*, **272**, 1278–1279.
3. Lewis, K. (2000) *Microbiol. Mol. Rev.*, **64**, 503–514.
4. Проскуряков С.Я., Табай В.Л., Коноплянников А.Г. (2002) *Биохимия*, **67**, 467–491.
5. Mills, J.C., Stone, N.L., and Pittman, R.N. (1999) *J. Cell. Biol.*, **146**, 703–708.
6. Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (2002) *Nature*, **417**, 182–187.
7. Strasser, A., O'Connor, L., and Vishva, M.D. (2002) *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 217–245.
8. Kruman, I.I., and Mattson, M.P. (1999) *J. Neurochem.*, **72**, 529–540.
9. Тоньшин А.А., Сапрунова В.Б., Солодовникова И.М., Бакеева Л.Е., Ягужинский Л.С. (2003) *Биохимия*, **68**, 875–881.
10. Oleinick, N.L., Morris, R.L., and Belichenko, I. (2002) *Photochem. Photobiol. Sci.*, **1**, 1–21.
11. Kamata, H., and Hirata, H. (1999) *Cell. Signal.*, **11**, 1–14.
12. Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann, S.H. (1999) *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 383–424.
13. Liang, H., and Fesik, S.W. (1997) *J. Mol. Biol.*, **274**, 291–302.
14. Kohler, C., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2002) *J. Immunol. Methods*, **265**, 97–110.
15. Grossmann, J., Mohr, S., Lapentina, E.G., Fiocchi, C., and Levine, A.D. (1998) *Am. J. Physiol.*, **274**, G1117–G1124.
16. Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10964–10967.
17. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998) *Nature*, **391**, 43–50.
18. Фильченков А.А. (2003) *Биохимия*, **68**, 453–466.
19. Hirata, H., Takahashi, A., Kobayashi, S., Yonehara, S., Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, K., and Sasada, M. (1998) *J. Exp. Med.*, **187**, 587–600.
20. Susin, S.A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Prevost, M.C., Brothers, G., Mak, T.W., Penninger, J., Earnshaw, W.C., and Kroemer, G. (2000) *J. Exp. Med.*, **192**, 571–580.
21. Crompton, M. (1999) *Biochem. J.*, **341**, 233–249.
22. Pozzan, T., and Rizzuto, R. (2000) *Eur. J. Biochem.*, **267**, 5269–5273.
23. Bernardi, P. (1999) *Phys. Rev.*, **79**, 1127–1155.
24. Ichas, F., and Mazat, J.-P. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1366**, 33–50.
25. Novgorodov, S.A., Gudzh, T.I., Brierley, G.P., and Pfeiffer, D.R. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.*, **311**, 219–228.
26. Lapidus, R.G., and Sokolove, P.M. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 18931–18936.
27. Broekemeier, K.M., Dempsey, M.E., and Pfeiffer, D.R. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 7826–7830.
28. Halestrap, A.P., McStay, G.P., and Clarke, S.J. (2002) *Biochimie*, **84**, 153–166.
29. Kim, J.S., He, L., Qian, T., and Lemaster, J.J. (2003) *Curr. Mol. Med.*, **3**, 527–535.
30. Kim, J.S., He, L., and Lemaster, J.J. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **304**, 463–470.
31. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., and Wang, X. (1999) *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **15**, 269–290.
32. Robertson, J.D., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2000) *J. Struct. Biol.*, **129**, 346–358.
33. Nichols, P. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, **346**, 261–310.
34. Gorbenko, G.P. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1420**, 1–13.
35. Rytomaa, M., and Kinnunen, P.K.J. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 3197–3202.
36. Ott, M., Robertson, J.D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 1259–1263.
37. Lorenzo, H.K., Susin, S.A., Penninger, J., and Kroemer, G. (1999) *Cell Death Differ.*, **6**, 516–524.
38. Punj, V., and Chakrabarty, A.M. (2003) *Cell. Microbiol.*, **5**, 225–231.
39. Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., and Yasuhiko, Y. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 34287–34294.
40. Gogvadze, V., Robertson, J.D., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 19066–19701.
41. Skulachev, V.P. (2000) *IUBMB Life*, **49**, 365–373.
42. Guicciardi, M.E., Deussing, J., Miyoshi, H., Bronk, S.F., Svingen, P.A., Peters, C., Kaufmann, S.H., and Gores, G.J. (2000) *J. Clin. Inv.*, **106**, 1127–1136.
43. Vousden, K.H., and Vande Woude, G.F. (2000) *Nature Cell. Biol.*, **2**, E178–E180.
44. Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001) *Mol. Cell*, **7**, 683–694.
45. Chatellard-Causse, C., Blot, B., Cristina, N., Torch, S., Missotten, M., and Sadoul, R. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 29108–29115.

46. Aubry, L., Mattei, S., Blot, B., Sadoul, R., Satre, M., and Klein, G. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 21947–21954.
47. Carafoli, E., and Molinari, M. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247**, 193–203.
48. Bordone, L., and Campbell, C. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 26673–26680.
49. Kobayashi, S., Yamashita, K., Takeoka, T., Ohtsuki, T., Suzuki, Y., Takahashi, R., Yamamoto, K., Kaufmann, S.H., Uchiyama, T., Sasada, M., and Takahashi, A. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 33968–33977.
50. Groom, N.E., Clem, R.J., and Miller, L.K. (1994) *J. Virol.*, **67**, 2168–2174.
51. Hay, B.A., Wassarman, D.A., and Rubin, G.M. (1995) *Cell*, **83**, 1253–1262.
52. Uren, A.G., Pakusch, M., Hawkins, C.J., Puls, K.L., and Vaux, D.L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 4974–4978.
53. Miller, L.K. (1999) *Trends Cell. Biol.*, **9**, 323–328.
54. Joazeiro, C.A., and Weissman, A.M. (2000) *Cell*, **102**, 549–552.
55. Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., and Reed, J.S. (1997) *Nature*, **388**, 300–304.
56. Huang, Y., Park, Y.C., Rich, R.L., Segal, D., Myszk, D.G., and Wu, H. (2001) *Cell*, **104**, 781–790.
57. Yang, Y., and Yu, X. (2003) *FASEB J.*, **17**, 790–799.
58. Suzuki, Y., Kakabayashi, Y., and Takahashi, R. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8662–8667.
59. Srinivasula, S.M., Hedge, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chal, J., Lee, R.-A., Robbins, P.D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., and Alnemri, E.S. (2001) *Nature*, **410**, 112–116.
60. Nicholson, D.W. (2001) *Nature*, **410**, 33–34.
61. Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. (2001) *Mol. Cell*, **8**, 613–621.
62. MacFarlane, M., Morrison, W., Bratton, S.B., and Cohen, G.M. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 36611–36616.
63. Hu, S., and Yang, X. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 10055–10060.
64. Fu, J., Jin, Y., and Arend, L.J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 52660–52672.
65. Deveraux, Q.L., Leo, E., Stennicke, H.R., Welsh, K., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1999) *EMBO J.*, **18**, 5242–5251.
66. Fleury, C., Mignotte, B., and Vayssiere, J.L. (2002) *Biochimie*, **84**, 131–141.
67. Maulik, N., Yoshida, T., and Das, D.K. (1998) *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 869–875.
68. Tan, S., Sagara, Y., Liu, Y., Maher, P., and Schubert, D. (1998) *J. Cell Biol.*, **141**, 1423–1432.
69. Schulz, J.B., Weller, M., and Klockgether, T. (1996) *J. Neurosci.*, **16**, 4696–4706.
70. Schulz, J.B., Bremen, D., Reed, J.C., Lommatzsch, J., Takayama, S., Wullner, U., Loschmann, P.-A., Klockgether, T., and Weller, M. (1997) *J. Neurochem.*, **69**, 2075–2086.
71. Гордеева А.В., Звягильская Р.А., Лабас Ю.А. (2003) *Биохимия*, **68**, 1318–1322.
72. Keller, J.N., Guo, Q., Holsberg, F.W., Bruce-Keller, A.J., and Mattson, M.P. (1998) *J. Neurosci.*, **18**, 4439–4450.
73. Zoratti, M., and Szabo, I. (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, **1241**, 139–176.
74. Vercesi, A.E., Kowaltowski, A.J., Grijalba, M.T., Meinicke, A.R., and Castilho, R.F. (1997) *Biosci. Rep.*, **17**, 43–52.
75. Yuan, J. (1996) *J. Cell. Biochem.*, **60**, 4–11.
76. Seipp, S., Schmich, J., and Leitz, T. (2001) *Development*, **128**, 4891–4898.
77. Скулачев В.П. (1999) *Биохимия*, **64**, 1418–1426.
78. Vardi, A., Berman-Frank, I., Rozenberg, T., Hadas, O., Kaplan, A., and Levine, A. (1999) *Curr. Biol.*, **19**, 1061–1064.
79. Segovia, M., Haramaty, L., Berges, J.A., and Falkowski, P.G. (2003) *Plant Physiol.*, **132**, 99–105.
80. Ha, M.W., Hou, K.Z., Liu, Y.P., and Yuan, Y. (2003) *Ai Zheng*, **22**, 691–694.
81. Arnoult, D., Akarid, K., Grodet, A., Petit, P.X., Estaquier, J., and Ameisen, J.C. (2002) *Cell Death Differ.*, **9**, 65–81.
82. Das, M., Mukherjee, S.B., and Shaha, C. (2001) *J. Cell. Sci.*, **114**, 2461–2469.
83. Liu, J., Shen, H.M., and Ong, C.N. (2001) *Life Sci.*, **69**, 1833–1850.
84. Mukherjee, S.B., Das, M., Sudhandiran, G., and Shaha, C. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 24717–24727.
85. Al-Olayan, E.M., Williams, G.T., and Hurd, H. (2002) *Int. J. Parasitol.*, **32**, 1133–1143.
86. Ouassii, A. (2003) *Kinetoplastid. Biol. Dis.*, **2**, 5.
87. Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S.G. (1996) *Science*, **274** (5287), 563–567.
88. Madeo, F., Engelhardt, S., Herker, E., Lehmann, N., Maldener, C., Proksch, A., Wissing, S., and Frohlich, K.-U. (2002) *Curr. Genet.*, **41**, 208–216.
89. Yamaki, M., Umehara, T., Chimura, T., and Horikoshi, M. (2001) *Genes Cells*, **6**, 1043–1054.
90. Madeo, F., Frohlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S.J., Wolf, D.H., and Frohlich, K.-U. (1999) *J. Cell. Biol.*, **145**, 757–767.
91. Laun, P., Pichova, A., Madeo, F., Fuchs, J., Ellinger, A., Kohlwein, S., Dawes, I., Frohlich, K.-U., and Breitenbach, M. (2001) *Mol. Microbiol.*, **39**, 1166–1173.
92. Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S., and Frohlich, K.-U. (2002) *Mol. Cell*, **9**, 911–917.
93. Skulachev, V.P. (2002) *FEBS Lett.*, **528**, 23–26.
94. Manon, S., Chaudhuri, B., and Guerin, M. (1997) *FEBS Lett.*, **415**, 29–32.
95. Xu, Q., and Reed, J.C. (1998) *Mol. Cell*, **1**, 337–346.
96. Qi, H., Li, T.K., Kuo, D., Nur-E-Kamal, A., and Liu, L.F. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 15136–15141.
97. Zha, H., Fisk, H.A., Yaffe, M.P., Mahajan, N., Herman, B., and Reed, J.C. (1996) *Mol. Cell Biol.*, **16**, 6494–6508.
98. Priault, M., Camougrand, N., Kinnally, K.W., Vallette, F.M., and Manon, S. (2003) *FEMS Yeast Res.*, **4**, 15–27.
99. Sawada, M., Sun, W., Hayes, P., Leskov, K., Bootman, D.A., and Matsuyama, S. (2003) *Nat. Cell Biol.*, **5**, 320–329.
100. Fraser, A., and James, C. (1998) *Trends Cell. Biol.*, **8**, 219–221.
101. Frohlich, K.-U., and Madeo, F. (2000) *FEBS Lett.*, **473**, 6–9.
102. Chen, S.R., Dunigan, D.D., and Dickman, M.B. (2003) *Free Rad. Biol. Med.*, **34**, 1315–1325.
103. Camougrand, N., Grelaud-Coq, A., Marza, E., Priault, M., Bessoule, J.J., and Manon, S. (2003) *Mol. Microbiol.*, **47**, 495–506.
104. Komatsu, K., Hopkins, K.M., Lieberman, H. B., and Wang, H.-G. (2000) *FEBS Lett.*, **481**, 122–126.
105. Weinberger, M., Ramachandran, L., and Burchans, W. (2003) *IUBMB Life*, **55**, 467–472.
106. Uren, A.G., Beilharz, T., O'Connell, M.J., Bugg, S.J., van Driel, R., Vaux, D.L., and Lithgow, T. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10170–10175.
107. Fahrenkrog, B., Sauder, U., and Aebi, U. (2004) *J. Cell. Sci.*, **117**, 15–26.
108. Ludovico, P., Sousa, M.J., Silva, M.T., Leao, C., and Corte-Real, M. (2001) *Microbiology*, **147**, 2409–24015.
109. Ludovico, P., Rodrigues, F., Almeida, A., Silva, M.T., Barrientos, A., and Corte-Real, M. (2002) *Mol. Biol. Cell*, **13**, 2598–2606.

110. Phillips, A.J., Sudbery, I., and Ramsdale, M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 14327–14332.
111. Ludovico, P., Sansonetti, F., Silva, M.T., and Corte-Real, M. (2003) *FEMS Yeast Res.*, **3**, 91–96.
112. Severin, F.F., Hyman, A.A. (2002) *Curr. Biol.*, **12**, R233–235.
113. Abdullaev, Z.Kh., Bodrova, M.E., Chernyak, B.V., Dolgikh, D.A., Kluck, R.M., Pereverzev, M.O., Arseniev, A.S., Efremov, R.G., Kirpichnikov, M.P., Mokhova, E.N., Newmeyer, D.D., Roder, H., and Skulachev, V.P. (2002) *Biochem. J.*, **362**, 749–754.
114. Roucou, X., Prescott, M., Devenish, R.J., and Nagley, P. (2000) *FEBS Lett.*, **471**, 235–239.
115. Stanger, B.Z., Leder, P., Lee, T.H., Kim, E., and Seed, B. (1995) *Cell*, **81**, 513–523.
116. Cornillon, S., Foa, C., Davoust, J., Buonavista, N., Gross, J.D., and Golstein, P. (1994) *J. Cell Sci.*, **107**, 2691–2704.
117. Olie, R.A., Durrieu, F., Cornillon, S., Loughran, G., Gross, J., Earnshaw, W.C., and Golstein, P. (1998) *Curr. Biol.*, **8**, 955–958.
118. Arnoult, D., Tatischeff, I., Estaquier, J., Girard, M., Sureau, F., Tissier, J.P., Grodet, A., Dellinger, M., Traincard, F., Kahn, A., Ameisen, J.-C., and Petit, P.X. (2001) *Mol. Biol. Cell*, **12**, 3016–3030.
119. Tatischeff, I., Petit, P.X., Grodet, A., Tissier, J.P., Duband-Goulet, I., and Ameisen, J.C. (2001) *Eur. J. Cell Biol.*, **80**, 428–441.
120. Maercker, C., Kortwig, H., Nikiforov, M.A., Allis, C.D., and Lipps, H.J. (1999) *Mol. Biol. Cell*, **10**, 3003–3014.
121. Kobayashi, T., and Endoh, H. (2003) *Cell Death Differ.*, **10**, 634–640.
122. Jaso-Friedmann, L., Leary, J.H. 3rd, and Evans, D.L. (2000) *Exp. Parasitol.*, **96**, 75–88.
123. Volkel, H., Kurz, U., Linder, J., Klumpp, S., Gnau, V., Jung, G., Schultz, J.E. (1996) *Eur. J. Biochem.*, **238**, 198–206.
124. Maubach, G., Schilling, K., Rommerskirch, W., Wenz, I., Schultz, J.E., Weber, E., and Wiederanders, B. (1997) *Eur. J. Biochem.*, **250**, 745–750.
125. Banno, Y., Yano, K., and Nozawa, Y. (1983) *Eur. J. Biochem.*, **132**, 563–568.
126. Christensen, S.T., Chemnitz, J., Straarup, E.M., Kristiansen, K., Wheatley, D.N., and Rasmussen, L. (1998) *Cell. Biol. Int.*, **22**, 591–598.
127. Heussler, V.T., Machado, J.Jr, Fernandez, P.C., Botteron, C., Chen, C.G., Pearse, M.J., and Dobbelaere, D.A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7312–7317.
128. Aga, E., Katschinski, D.M., van Zandbergen, G., Laufs, H., Hansen, B., Muller, K., Solbach, W., and Laskay, T. (2002) *J. Immunol.*, **169**, 898–905.
129. Chose, O., Noel, C., Gerbod, D., Brenner, C., Viscogliosi, E., and Roseto, A. (2002) *Exp. Cell. Res.*, **276**, 32–39.
130. Christensen, S.T., Sorensen, H., Beyer, N.H., Kristiansen, K., Rasmussen, L., and Rasmussen, M.I. (2001) *Cell. Biol. Int.*, **25**, 509–519.

APOPTOSIS IN UNICELLULAR ORGANISMS: MECHANISMS AND EVOLUTION

A. V. Gordeeva, Yu. A. Labas, R. A. Zvyagilskaya

*A. N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
119071, Leninsky pr. 33, Moscow, Russia; fax: (095)954-2732,
E-mail: anna_gord@mail.ru*

Received December 24, 2003

Revision received February 06, 2004

Data about programmed death (apoptosis) in unicellular organisms from bacteria to ciliates are discussed. Apoptosis appeared as early as in lower eukaryotes, but its triggering mechanisms are distinguished from the classical ones. During evolution, the apoptotic process has been improving gradually, with reactive oxygen species and Ca^{2+} playing an essential role in the apoptosis triggering. All eukaryotic organisms harbor apoptosis inhibitors, which might be introduced by viruses. In the course of evolution, caspases and apoptosis-inducing factor appeared before other apoptotic proteins, with so-called death receptors being the last among them. The functional analogs of eukaryotic apoptotic proteins take parts in programmed death of bacteria.

Key words: apoptosis, bacteria, Ca^{2+} , caspases, death receptors, evolution, eukaryotes, and reactive oxygen species