

Семейство факторов некроза опухолей	433
Семейство Bcl-2	436
Семейство каспаз	437
Катепсины	439
Пути трансдукции сигнала	441

На сегодняшний день известны 3 вида гибели клеток: некроз, апоптоз и конечное дифференцирование. Апоптоз – запрограммированная асинхронная гибель клеток, обеспечивающая физиологическое равновесие и генетическую стабильность организма за счет самоуничтожения генетически измененных, дефектных клеток. В процессе апоптоза активированные эндогенные нуклеазы расщепляют ДНК на фрагменты, при этом сохраняется целостность клеточных мембран и внутриклеточного содержимого, отсутствуют повреждения тканей и лейкоцитарная инфильтрация. В отличие от апоптоза, некроз представляет собой патологическую форму гибели клеток в результате их острого повреждения, разрыва оболочки, высвобождения содержимого цитоплазмы и индукции воспалительного процесса. К стрессовым факторам, способным индуцировать апоптоз, относятся облучение, ишемия, гипоксия, вирусная инфекция, а также элиминация факторов роста.

Апоптоз является генетически регулируемым процессом, для которого требуется запас энергии и синтез определенных белков. Результатом апоптоза является постепенное и медленное избавление от «ненужных» в функциональном отношении на данный момент клеток. При этом не нарушается нормальное функционирование соседних клеток, что позволяет сохранить структуру органа. Особенно большую роль апоптоз играет в эмбриогенезе, когда важно постепенно избавляться от выполнивших свою функцию клеток, а активное фагоцитирование с развитием реакции воспаления может нарушить созревание плода.

Апоптоз играет важную роль в обеспечении гомеостаза тканей, осуществляет защитную функцию, элиминируя аутореактивные Т-лимфоциты-киллеры, ограничивая тем самым деструкцию собственных клеток и тканей организма. Апоптоз зрелых лимфоцитов, преимущественно Т-хелперов, является средством регуляции интенсивности и продолжительности иммунного ответа.

Экспериментальное обоснование получает и предположение о том, что в основе многих лимфопролиферативных и аутоиммунных заболеваний лежит процесс нарушения клеточного апоптоза по

типу блока процессов негативной активации, в результате чего возникает неудержимая клеточная пролиферация, в том числе и «запрещенных» клонов лимфоцитов.

Многие приобретенные иммунодефициты могут быть связаны с эффектом негативной активации. Повышенный апоптоз Т-лимфоцитов рассматривается как один из ключевых механизмов иммунодефицита при ВИЧ-инфекции. Апоптоз фагоцитов – один из патогенетических механизмов действия инфекционных микроорганизмов. Антигены апоптозных клеток подвергаются переработке в антигенпрезентирующих клетках (АПК) и после представления их Т-лимфоцитам происходит либо активация антигенспецифических Т-лимфоцитов, либо индукция толерантности. Список заболеваний, связанных с торможением или индукцией апоптоза приведен в таблице.

На сегодняшний день выявлен ряд веществ, способных активировать или замедлять развитие апоптоза. Индукция апоптоза может осуществляться при воздействии как внешних, так и внутренних факторов, приводящих к возрастанию входа кальция внутрь клетки, а также к повышению экспрессии или мутации генов-активаторов апоптоза.

• **Подробнее о регуляции апоптоза см. главу «Проточная цитометрия», стр. 484**

Заболевания, связанные с усилением или ингибированием апоптоза

Заболевания, связанные с ингибированием апоптоза	Заболевания, связанные с усилением апоптоза
Опухолевые заболевания: рак молочной и предстательной железы, яичников, фолликулярная лимфома, рак с мутацией p53 и др.	СПИД
Аутоиммунные заболевания: системная красная волчанка, гломерулонефрит	Нейродегенеративные заболевания: болезнь Альцгеймера и Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, дегенерация мозжечка и др.
Вирусные инфекции, вызванные: вирусом герпеса, аденовирусом, вирусом оспы	Апластическая анемия
	Миелодиспластические синдромы
	Ишемические поражения печени: алкогольный цирроз Ишемические синдромы: инфаркт миокарда, инсульт

Важная роль в регуляции апоптоза клеток иммунной системы принадлежит цитокинам. Было обнаружено, что они являются индукторами апоптоза как в здоровых, так и в опухолевых клетках и клеточных линиях. Например, IL-12 индуцирует апоптоз натуральных киллеров, IL-4 и IL-10 – периферических моноцитов человека, IL-10 – Т-лимфоцитов. Не менее выраженный эффект цитокинов наблюдается в предотвращении апоптоза. При этом один и тот же интерлейкин может быть как индуктором апоптоза, так и его ингибитором. Различия в ответе клеток наблюдаются для разных клеток-мишеней и, возможно, зависят от степени их дифференцировки и развития. Запрограммированная гибель клетки зависит от соотношения факторов, вызывающих и предотвращающих апоптоз, а также от регуляторных внутриклеточных механизмов. К физиологическим ингибиторам апоптоза относятся факторы роста, экстрацеллюлярный матрикс, CD40L, нейтральные аминокислоты, цинк, эстрогены, андрогены. Биохимические изменения при апоптозе включают специфическое расщепление ДНК, рибосомальной РНК и белков, повышение внутриклеточного уровня ионов кальция, потерю митохондриального трансмембранного потенциала и высвобождение из митохондрий цитохрома С, транслокация фосфатидилсерина с внутренней плазматической мембраны. Основываясь на этих и других изменениях, разработаны различные методы для определения и подсчета апоптотических клеток. Традиционными методами являются: определение связывания аннексина V, оценка активации каспаз, TUNEL метод и ДНК электрофорез.

Сравнительная характеристика этих методов приведена в таблице “Сравнение методов определения Аннексина-V, Каспазы-3 и TUNEL” на следующей странице.*

Семейство факторов некроза опухолей (TNF)

Семейство TNF кроме TNF α и β включает Fas (CD95), FasL, TRAIL, CD40L, CD27L, OX30L, DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2) и др. Гомология аминокислотной последовательности среди рецепторов семейства TNF высока.

Растворимый FAS (sFas)

FAS, также называемый CD95 или APO-1, относится к классу рецепторов TNF/NGF и является поверхностным белком с м.м 36 кДа, который содержит одиночную трансмембранную область и индуцирует гибель клеток путем связывания FAS с FAS-лигандом. sFAS образуется путем отщепления 21 аминокислотного остатка от трансмембранного домена. Предполагается, что sFAS выступает в качестве ингибитора связывания FAS с FAS-лигандом и блокирует FAS-опосредованный апоптоз. Повышенные уровни данного рецептора обнаружены у пациентов с системной красной волчанкой.

FAS-лиганд (sFASL)

FAS-лиганд, известный как «фактор смерти», связывается с FAS-рецептором и индуцирует гибель клеток. Система FAS-FASL инициирует уничтожение аутореактивных Т-клеток и развитие гепатита. FAS-лиганд, связанный с мембраной, под действием металлопротеиназы превращается в растворимую форму. Повышенные сывороточные уровни sFASL наблюдаются у пациентов с ревматизмом, гранулярным лимфоцитарным лейкозом и NK-лимфомой. При экспрессии FASL на опухолевых клетках его растворимая форма может попадать в циркуляцию, провоцируя клетки, имеющие на своей поверхности FAS-рецептор, к апоптозу и тем самым вызывая мультиорганные поражения, часто наблюдаемые у онкологических больных.

DR5 (Death Receptor)

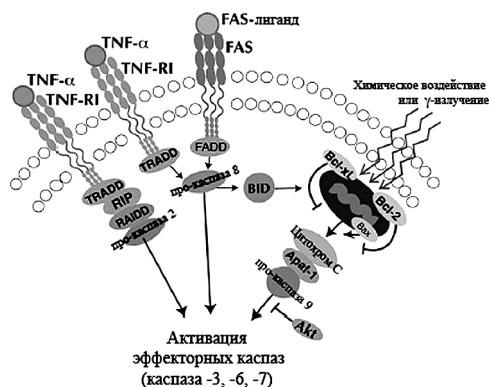
«Рецепторы смерти» (DR) содержат цитоплазматические домены смерти DD (death domain), которые, связываясь с лигандом смерти, привлекают адапторные белки, содержащие домены DD и домен исполнителя смерти – DED (death effector domain). Взаимодействие DED доменов адаптора и прокаспазы приводит к аутопротеолитической активации и включению каспазного каскада.

• **Более подробную информацию** о микроскопическом методе и использовании проточной цитометрии для определения маркеров апоптоза см. главу «Проточная цитометрия».

Сравнение методов определения Аннексина-V, Каспазы-3 и TUNEL

Методы	Аннексин-V	Каспаза-3	TUNEL
Механизмы	На поверхности апоптотических клеток экспонируется фосфатидилсерин (PS). Конъюгат Аннексина-V связывается с PS клеточной поверхности, выявляя апоптотические клетки	DEVD-AFC (флуориметрический метод) или DEVD-pNA (колориметрический метод) используются в качестве субстратов для определения каспазы-3 или подобной ферментативной активности	Экзогенная TdT встраивает в концы ДНК-фрагментов Br-dUTP, который может быть определен различными методами
Стадия апоптоза	Относительно ранняя, но после активации каспаз	Ранняя	Поздняя
Тип пробы – суспензия клеток или клетки <i>in situ</i>	Удобно использовать в суспензии клеток, но сложно – в клетках <i>in situ</i>	Удобно использовать как в суспензии клеток, так и на клетках <i>in situ</i>	Удобно использовать как в суспензии клеток, так и на клетках <i>in situ</i>
Ткани	Не рекомендуется	Не рекомендуется	Может быть использован на тканевых срезах
Хранение проб	Немедленно после индукции апоптоза	Клетки после воздействия могут храниться при температуре -20°C	Клетки после воздействия могут быть зафиксированы и храниться
Многоцветный анализ	В методе может быть использован многоцветный анализ, анализ апоптоза на уровне одной клетки	Не может быть использован одновременно с другими маркерами	Потенциально в методе может быть использован многоцветный анализ, анализ апоптоза на уровне одной клетки
Время исследования	Простая процедура, 15 мин. инкубации	Несколько процедур, общее время инкубаций – 1-2 ч	Несколько процедур, Несколько промывок
Инструмент	Проточный цитометр или флуоресцентный микроскоп	Спектрофлуориметр или спектрофотометр (например, микропланшетный ридер)	Проточный цитометр, флуоресцентный или световой микроскоп
Неспецифическое окрашивание	Потенциально возможно высокое, если условия культивирования клеток не оптимальны, из-за гибели клеток	Некоторое окрашивание неапоптотических клеток	Низкое окрашивание неапоптотических клеток

Основные пути апоптоза



FADD – связанный с FAS домен смерти

TRADD – связанный с TNF-R домен смерти

DR5 связывается с TRAIL, активирует NF-κB и индуцирует TRAIL-опосредованный апоптоз. К настоящему моменту известны 5 рецепторов семейства TNFR, связывающихся с TRAIL. Среди них DR4, DR5 и DcR2 – белки, заякоренные на мембране и имеющие трансмем-

бранный и цитоплазматический домены. DR4 и 5 имеют функциональные домены смерти, тогда как DcR2 содержит «неработающий» домен смерти. Четвертый рецептор, DcR1, связанный с гликозилфосфатидилинозитолом, уникален и не содержит ни трансмембранного, ни цитоплазматического доменов. Пятый рецептор, остеопротегерин (OPG) – обладает также высокой аффинностью к RANKL (рецептор активатора лиганда ядерного фактора В).

Экспрессия одного или обоих, содержащих домен смерти, рецепторов (DR4 или 5), необходима для TRAIL-индуцированного апоптоза. Экспрессия рецепторов TRAIL, DcR1 и 2, у которых отсутствует или функционально неактивны домены смерти, является защитой от TRAIL-индуцированной гибели клеток. OPG – растворимый рецептор, способный связывать TRAIL *in vitro* и предотвращать TRAIL-индуцированный апоптоз.

DR5 широко экспрессируется как в нормальных тканях, так и в линиях опухолевых клеток. Терапия с использованием ДНК-повреждающих противоопухолевых агентов может индуцировать p53 и/или ядер-

ный фактор κВ, которые, в свою очередь, могут регулировать экспрессию DR5 и/или DR4, таким образом, усиливая TRAIL-индуцированный апоптоз.

TRAIL (TNF-зависимый лиганд, индуцирующий апоптоз)

NEW

TRAIL опосредует апоптоз множества различных линий злокачественных клеток и клеток первичных опухолей. TRAIL индуцирует два различных сигнала: клеточной гибели, опосредованной каспазами, и генной индукции, опосредованной NF-κB. Цитотоксический лиганд TRAIL взаимодействует с 5 рецепторами, 2 из которых (TRAIL-R1 и R2) несут домен смерти. TRAIL экспрессируется повсеместно, но проявляет очень сложную избирательную проапоптотическую активность в отношении различных опухолевых клеток, селективно индуцируя в них апоптоз. TRAIL связан со злокачественными заболеваниями лимфатической системы и болезнями щитовидной железы. Предполагается, что его возможно использовать при лечении опухолевых заболеваний, таких, как меланома.

sCD30

CD30 (Ki-1) была идентифицирована с помощью моноклональных антител, которые исходно взаимодействовали с эпитопом, присутствующим на клетках Ходжкина и Ридштернберга при болезни Ходжкина. Позднее было обнаружено, что Ki-1 антиген устойчиво экспрессируется подгруппой крупноклеточных лимфом, которая называется Ki-1⁺ анапластическая крупноклеточная лимфома (ККАЛ, ALCL).

При определении антигена CD30 было показано, что его зрелая форма представляет собой трансмембранный белок с м.м. 120 кДа, образованный из цитоплазматического предшественника с м.м. 84 кДа в основном путем гликозилирования. Идентифицированный лиганд CD30 (CD30L) имеет значительную гомологию с TNFα и β, FasL, CD40L, CD27L. CD30L экспрессируется на активированных Т-клетках. Взаимодействие цитокинового рецептора CD30 со своим лигандом обладает плейотропными биологическими эффектами, такими как: дифференцировка, активация, пролиферация и клеточная гибель. В CD30⁺ ККАЛ клеточных линиях связывание CD30L индуцирует гибель клеток в процессе апоптоза. Более того, CD30 вполне может быть вовлечен в контроль CD40/CD40L сигнала, пролиферацию Т- и созреванию В-клеток, индуцированное Т-клеточными цитокинами. Таким образом, CD30 передает информацию, необходимую для иммунного ответа. Экспрессия CD30 строго зависит от активации и пролиферации Т- и В-клеток. Концентрация sCD30 в сыворотке может быть использована как маркер CD30⁺ клеток, присут-

ствующих в организме. Увеличенный уровень sCD30 наблюдается у пациентов при ККАЛ CD30⁺ и CD30⁺ эмбриональной карциноме яичек и коррелирует с клинической фазой заболевания. Повышенные значения sCD30 в сыворотке были показаны у большинства пациентов при болезни Ходжкина, где его уровень также коррелирует со стадией заболевания, тяжестью опухолевого процесса. Хотя повышенный уровень sCD30 в сыворотке пациентов с инфекционными заболеваниями обычно не определяется, в качестве исключения необходимо отметить инфекционный мононуклеоз. Уровень sCD30 в сыворотке также может быть повышен у большинства пациентов при HBsAg-позитивном хроническом гепатите, и говорит об активной репликации вируса. Очень высокий подъем sCD30, коррелирующий с активностью заболевания, обнаружен у пациентов с системной красной волчанкой, аутоиммунными заболеваниями печени, циррозом, ревматоидным артритом.

sCD40, sCD40L

CD40L так же как и другие лиганды, принадлежащие данному семейству, проявляет свойства ко-стимулятора пролиферации Т-клеток, и, как и все остальные, экспрессируется активированными Т-клетками.*

Было показано, что апоптоз вовлечен в элиминирование клонов аутореактивных лимфоцитов при нормальном функционировании иммунной системы. Опосредованный В-клеточный апоптоз блокируется при передаче сигнала через молекулу CD40 на поверхность В-клетки. Так как CD40L экспрессируется активированными Т-хелперами, В-клетки активируются при взаимодействии иммунной системы с внешним антигеном, который в норме может активировать Т-хелперы. Таким образом, взаимодействие CD40-CD40L играет центральную роль на различных фазах В-клеточного ответа на Т-зависимые антигены. CD40L экспрессируется также на поверхности базофилов и тучных клеток. Обсуждается потенциальная вспомогательная роль CD40L при В-клеточных опухолях, кроме того, было обнаружено, что молекулярный дефект при X-связанном гипер-IgM синдроме относится к гену CD40L. Уровень sCD40L повышен при хроническом лимфоцитарном лейкозе, а также при различных аутоиммунных заболеваниях, имеет протромботическое действие.

TWEAK (фактор некроза опухоли-подобный слабый индуктор апоптоза)

NEW

Цитокин TWEAK первоначально был описан как член семейства TNF. TWEAK является трансмембранным белком II типа,

* см. главу «Цитокины», стр. 401

ассоциированным с клеточной поверхностью, но его меньшая, биологически активная форма, присутствует во внеклеточном окружении. В настоящий момент известен только один рецептор, связывающий TWEAK, это трансмембранный белок I типа, который в литературе называют либо TWEAK рецептор (Tweak R), либо индуцибельный фактор роста фибробластов 14 (Fn14), который осуществляет передачу сигнала с использованием нескольких различных TNFR-ассоциированных факторов. TWEAK обладает множеством биологических активностей, включая стимуляцию роста клеток и ангиогенез, индукцию воспалительных цитокинов, а при некоторых экспериментальных условиях стимулирует апоптоз. Регуляция ангиогенеза под воздействием TWEAK проходит в комбинации с TGF-2 или VEGF-A.

LIGHT

NEW

LIGHT принадлежит семейству TNF. Идентифицированы его рецепторы – рецептор лимфотоксина-β (LTbetaR) и HVEM/ATAR/TR2, оба лишены последовательности, называемой «домен смерти». LIGHT присутствует на активированных Т-клетках и может взаимодействовать с CD40L. При совместном действии LIGHT и CD40L участвуют в обеспечении или реактивации вторичного TH1 ответа. Экспрессия мРНК LIGHT усилена в спленocyтaх, активированных PBL, CD8⁺ лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, гранулоцитах и моноцитах, но не в клетках тимуса или опухолевых клетках. Таким образом, LIGHT может играть роль иммуномодулятора и быть использован при противоопухолевой терапии.

LIGHT является трансмембранным белком II типа, с м.м. 29 кДа. Описана растворимая активная форма LIGHT, которая осуществляет передачу сигналов в Т-клетках человека. Показано, что LIGHT стимулирует активацию молекулы межклеточной адгезии-1 (ICAM-1) на опухолевых клетках, опосредованную IFN-γ. Он требуется для первичного Т-клеточного ответа на аллоантигены с участием дендритных клеток. Существует обратная зависимость экспрессии LIGHT и его рецептора HVEM/TR2. Показано, что экспрессия LIGHT подавляется его собственным рецептором и оказывает обратное влияние на хемотаксис. Рецептор-ловушка 3 (DcR3, TR6) является дополнительным рецептором для LIGHT. Связывание с TR6 подавляет LIGHT-опосредованный апоптоз. Блокада LIGHT растворимым рецептором приводит к снижению клеточного иммунитета и, таким образом, способствует реакции «трансплантат против хозяина». Предполагается, что блокада оси LT/LIGHT может являться новым подходом к лечению аутоиммунных заболеваний.

sDcR3

NEW

sDcR3 представляет собой растворимый рецептор-ловушку, принадлежащий к семейству TNFR. Этот рецептор связывает три TNF лиганда, а именно FasL, LIGHT и TL1A. sDcR3 также известен под названием TR6/M68. DcR3 секретируется прямо в экстрацеллюлярное пространство.

Повышенные уровни экспрессии sDcR3 обнаружены во многих опухолях. В присутствии sDcR3 взаимодействие с TRAIL приводит к усилению активности каспазы-8, усиленному расщеплению Bid и высвобождению Smac и цитохрома С из митохондрий. Это, в свою очередь, ведет к росту активации каспаз-9 и -3. Таким образом, sDcR3 активизирует смерть, приводимую в действие TRAIL. Показано, что sDcR3 способен индуцировать ангиогенез. Он усиливает дифференцировку EC также, как и неоваскуляризацию. Следовательно, sDcR3 помогает опухолевым клеткам избежать контроля со стороны иммунной системы и активизирует прогрессирующие раковые опухоли. Экспрессия DcR3 выявлена в человеческих карциномах легких, опухолях желудочно-кишечного тракта, вирус-ассоциированных лимфомах (вирус Эпштейна-Барр или HTLV-1), злокачественных глиомах, меланомах и системной красной волчанке. Возможно, DcR3 способен нейтрализовать цитотоксические эффекты взаимодействия Fas и FasL и вследствие этого экспрессия DcR3 может привести к способности некоторых опухолей избегать иммуноцитотоксической атаки.

Семейство Bcl-2

Семейство клеточных белков Bcl-2 насчитывает 17 членов. Белки семейства Bcl-2 проявляют широкий спектр активности от ингибирования апоптоза до его индукции. Семейство включает в себя субсемейства, различающиеся функционально и структурно:

1. субсемейство наиболее близких гомологов Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w и др.) – ингибиторов апоптоза;
2. белки субсемейств Bax и BH3, промотирующие апоптоз.

Апоптоз ассоциируется с различными изменениями в митохондриях, включая высвобождение цитохрома С в цитоплазму. Bcl-2-родственные белки включены в регуляцию этих изменений путем формирования каналов в мембране, через которые цитохром С поступает в цитоплазму. При этом Bcl-2 и Bcl-XL ингибируют выброс цитохрома С, а Bax – стимулирует. Однако Bcl-2 может ингибировать способность Bax формировать каналы. Кроме того, Bcl-2 и Bcl-XL могут связывать цитохром С непосредственно и вытеснять его из апоптосомы, предотвращая этим активацию каспаз.

Bcl-2

Bcl-2 кодируется протоонкогеном и является внутриклеточным мембраносвязанным белком, блокирующим апоптоз. Этот белок экспрессируется на ряде гемопоэтических клеток, на малигнизированном и несвязанном с опухолью эпителии. Ген Bcl-2 выполняет уникальную среди онкогенов млекопитающих функцию в качестве негативного регулятора апоптоза. Впервые это было обнаружено при изучении хромосомных транслокаций, типичных для лимфом. Кроме того, Bcl-2 связан со стволовыми клетками, коммитирующими дифференцировку и морфогенез. Уменьшение концентрации Bcl-2 приводит клетки к апоптозу. С другой стороны, сверхэкспрессия Bcl-2 защищает клетки от смерти, но это не приводит к бессмертию нормальные клетки и не является причиной опухолевой трансформации таких клеток. Гетерогенность экспрессии Bcl-2 в опухолях предполагает разные пути регуляции гена. К тому же, экспрессия белка, ассоциированная с предраковыми поражениями, возможно, связана с ранней стадией образования опухоли.

Белок Bcl-2 также связан с наличием резистентности опухоли к терапии. Кроме того, прогностическое значение экспрессии Bcl-2 показано для нескольких видов опухолей, таких как неходжкинские лимфомы, сквамозная клеточная карцинома, карцинома молочной железы и желчного пузыря, тимомы. Нарушение регуляции экспрессии Bcl-2 наблюдается у пациентов с множественной миеломой и острым миелолейкозом. Bcl-2 был предложен в качестве полезного маркера для оценки адекватности терапии IL-2, например, у пациентов со СПИД.

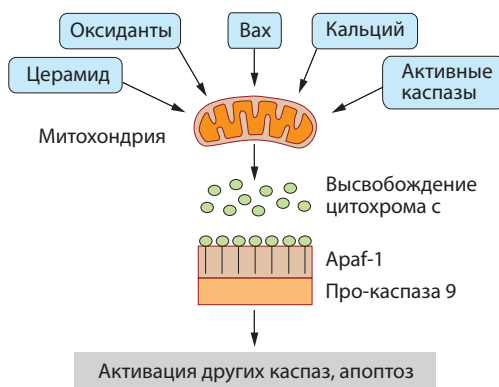
Цитохром С

Цитохром С – белок с м.м. 15 кДа, синтезируется как апо-цитохром С и поступает в митохондрию, где связывается с внутренней поверхностью мембраны. Затем он выходит в цитоплазму через каналы, которые для него открывают белки семейства Bcl-2 (Bax, Bad, Bak и др.). Цитохром С необходим для образования апоптосомы, где и происходит активация каспазы-9, которая затем активирует каспазу-3. Так завершается сигнальный путь апоптоза, вызванный повреждением ДНК.

Семейство каспаз

Эффекторное плечо апоптозного пути представлено семейством внутриклеточных протеаз, называемых каспазами. Они присутствуют во всех клетках, где расщепляют белки в местах расположения аспарагиновых оснований. К настоящему времени у человека идентифицировано 14 каспаз, которые по своим функциональным особенностям делятся на активаторы

цитокинов (1, 4, 5, 13), инициаторные (8 и 10) и эффекторные (в основном, 3, 6 и 7). Каспаза-9 служит медиатором митохондриального пути апоптозного сигналинга. Каспазы находятся в клетках в неактивном состоянии (прокаспазы). Активация каспаз происходит путем их протеолитического расщепления в местах расположения аспарагиновых оснований. После выхода в цитозоль цитохром С связывается с адапторной молекулой Araf-1, активирующей прокаспазу-9. Данный комплекс называется апоптосомой. Каспаза-9, в свою очередь активирует каспазы-3 и -7, что приводит к фрагментации ДНК и апоптозу (см. рис.).



Активация каспаз митохондриями

К ингибиторам эффекторных каспаз относятся белки семейства IAP, подавляющие активность каспаз-3 и -9. Было показано, что каспазы ответственны за многие события как в механизме осуществления апоптоза, так и при воспалении.

Каспаза-1 (ICE)

NEW

ICE (IL-1 β превращающий фермент, каспаза-1) стала первым членом нового семейства каспаз или цистеиновых протеаз, и ответственна за превращение в моноцитах предшественника IL-1 β в нативную форму. Обсуждается роль IL-1 и, соответственно, ICE в гемопоэзе, при лейкемии, атеросклерозе, росте солидных опухолей и т.д. Была показана ключевая роль ICE при остром миелолейкозе (AML). Более того, большой интерес вызывают исследования роли ICE в механизме нейродегенерации. Возможно, будет показано введение препаратов ингибиторов ICE при хронических и нейродегенеративных заболеваниях.

Каспаза-3

NEW

Каспаза-3 расщепляет субстрат на карбоксильном конце по остаткам аспартата. Активная каспаза-3 имеет два активных сай-

та и состоит из двух одинаковых больших (~20 кДа) и двух одинаковых малых (~10 кДа) субъединиц, происходящих из двух полипептидов-предшественников. Каспаза-3 протеолитически активируется другими каспазами. Она, совместно с каспазами-8 и -9, принадлежит центральному комплексу путей апоптоза.

Каспаза-8

NEW

Апоптоз, индуцируемый CD95 (Fas/APO-1) и TNF активирует каспазу-8 (MACH/FLICE/Mch5), которая обеспечивает прямую связь между рецепторами клеточной гибели и каспазами. Каспаза-8 – это белок с м.м. 55 кДа, она связывается с эффекторным доменом смерти FADD. Описано восемь изоформ этого белка, но экспрессируются преимущественно только два из них. Помимо активации CD95, показано расщепление каспазы-8 гранзимом В в процессе апоптоза, индуцированного Т-лимфоцитами. Кроме того, показано, что для аутоактивации каспазы-8 достаточно ее димеризации на мембране. Индукция апоптоза каспазой-8 усиливается затем при выходе цитохрома С из митохондрий. Каспаза-8 играет важную роль при всех заболеваниях, связанных с апоптозом, в первую очередь, в развитии (и лечении) злокачественных опухолей и сердечно-сосудистых заболеваний.

Каспаза-9

NEW

Активация каспазы-9, ранее известной как Аraf-3, происходит при ее связывании с Аraf-1 в присутствии цитохрома С и dATP. Активированная каспаза-9, в свою очередь, расщепляет и активирует каспазу-3; таким образом, каспаза-9 является одной из наиболее ранних протеаз апоптотического каскада, запускаемого цитохромом С и dATP.

Каспаза-9 преимущественно находится в митохондриях, и для ее внутриклеточного перераспределения и активации очень важно разрушение внешней митохондриальной мембраны, происходящее на ранних этапах апоптоза. Кроме каспазы-3, более поздние ферменты, каспазы-6 и -7 тоже являются мишенями для каспазы-9.

В процессе активации каспаза-9 образует димеры. Цитохром С/Аraf-1/каспаза-9 образуют так называемую апоптосому, усиливая каспазный каскад. В свою очередь, активация каспазы-9 каспазой-3 значительно повышает активность апоптосомы. Каспаза-9 играет важную роль при всех заболеваниях, в патогенез которых вовлечен апоптоз. Описано участие каспазы-9 при раке желудка, яичника, нейробластоме, глиомах,

а также при таких заболеваниях, как болезни Альцгеймера и Гентингтона или остеоартрит.

ЗАО «БиоХимМак» предлагает широкий спектр тест-систем компаний «Biosource» (Бельгия) и «R&D» (Англия) для определения каспаз в экстракте клеток различными методами: ИФА, колориметрическим и флуориметрическим.

Аннексин V

Аннексин V, также известный как плацентарный антикоагулянтный протеин (PAP I), не только принадлежит семейству кальций-зависимых белков, связывающих фосфолипиды, но также является возможным сосудистым антикоагулянтным протеином. Биохимические изменения при апоптозе включают транслокацию фосфатидилсерина (PS) с внутренней стороны плазматической мембраны. Локализация PS на поверхности мембраны наблюдается, начиная с ранней стадии апоптоза до полной деградации клетки. Аннексин V с высокой аффинностью связывается с экспонированным на поверхности апоптотических клеток PS и ингибирует прокоагулянтную и провоспалительную активность гибнущих клеток.

p53

p53 – наиболее часто мутирующий ген, связанный с опухолевым ростом у человека. Мутации и потери аллелей в гене p53, расположенном на хромосоме 17p, – наиболее распространенные повреждения, идентифицируемые в опухолевых клетках человека. p53 является стресс-зависимым белком: в ответ на повреждение ДНК он тормозит смену фаз клеточного цикла или индуцирует апоптоз. Оказалось, что p53, первоначально описанный как онкоген, способен супрессировать пролиферацию генетически дефектных клеток. В дальнейшем было установлено, что таким образом интактный p53 поддерживает нормальный фенотип клеток организма. p53 супрессировывает развитие опухоли, стимулируя апоптоз. Гомологичный Bcl-2 BAX также регулируется белком p53; известно, что BAX ускоряет апоптоз. Показано, что действие p53 на апоптоз связано с APO-1/FAS клеточной поверхности. Активность p53 регулируется фосфорилированием специфических протеинкиназ. В результате всех этих процессов активируется аутопротеолиз. Кроме контроля пролиферации, p53 участвует в процессах старения клетки. На сегодняшний день известно более чем 500 мутаций гена p53. Эти мутации были найдены в различных типах трансформированных клеток системы крови и в

солидных опухолях. Спектр мутаций различен для раковых образований толстого кишечника, легкого, пищевода, молочной железы, мозга, печени, кожи и гемопоэтической ткани.

Катепсины

Катепсины – группа протеаз, в организме человека представленная как минимум 15 белками. Большинство этих протеаз обнаружено в лизосомах различных типов клеток, они активируются при низких значениях pH и отвечают за деградацию белковых молекул. Катепсины (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W и X) классифицируются как цистеиновые протеазы семейства папаинов, характеризующиеся схожей аминокислотной последовательностью и фолдингом. Однако в группе катепсинов есть и другие типы протеаз, например, катепсины A и B – сериновые протеазы, а катепсины D и E – аспарагиновые. Большинство катепсинов способно инициировать и усиливать апоптоз.

Прокатепсин В

NEW

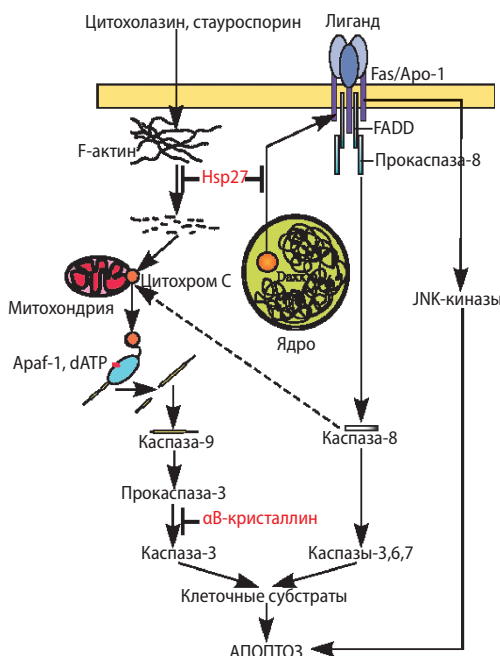
Прокатепсин В состоит из 339 АК остатков: сигнального пептида (1-17), участка цепи предшественника (18-79) и основной цепи (80-333). Активная форма катепсина В активирует каспазы, проренин, инактивирует секреторный ингибитор лейкоцитарных протеаз (SLPI). К важнейшим биологическим функциям катепсина В относят активацию апоптоза, регуляцию ангиотензин-рениновой системы. Также катепсин В играет ключевую роль в развитии эмфиземы легких. Поскольку различные типы раковых клеток характеризуются повышенной экспрессией катепсина В, то активный катепсин В наряду с прокатепсином В считаются маркерами инвазии и метастазирования таких злокачественных опухолей, как меланома, рак груди, рак ободочной и прямой кишки. Кроме того катепсинам В и L отводится ключевая роль в формировании ЦНС; так, мыши с комбинированным дефицитом этих протеаз характеризуются нейрональной недостаточностью, атрофией головного мозга и погибают в 2-4 недельном возрасте.

Белки теплового шока (HSP)

HSP оказывают антиапоптотическое действие, подобно белку bcl-2. В настоящее время в литературе постулируется три основных пути влияния малых HSP на процессы апоптоза. Во-первых, sHsp могут влиять на функционирование и передачу сигнала от рецептора Fas/Apo-1 внутрь клетки, во-вторых, они

могут тем или иным способом влиять на выход цитохрома С из митохондрий и, наконец, в-третьих, эти белки могут влиять на формирование апоптосом и активацию каскада каспаз.*

Схема возможного участия малых белков теплового шока в процессах апоптоза



(О.О. Панасенко, и др., 2003)

Hsp27

NEW

В литературе накоплено много фактов, свидетельствующих о том, что повышенная экспрессия Hsp27 сопровождается увеличением резистентности к препаратам, обладающим проапоптотным действием. Кроме этого, Hsp27 защищает нейрональные клетки от апоптоза, индуцируемого удалением из среды NGF. Молекулярные механизмы антиапоптотной активности Hsp27 еще недостаточно изучены и, вероятно, могут различаться в зависимости от типа клеток. Hsp27 блокирует апоптоз, вызываемый активацией рецептора Fas/Apo-1. После связывания с лигандом рецептор взаимодействует с адаптерными белками, одним из которых может быть белок FADD. Этот адаптерный белок связывает неактивную прокаспазу-8 и способствует ее активации при связывании рецептора с лигандом. Каспаза-8 активирует каспазы-3, -6 и -7 и тем самым инициирует протеолиз белков-мишеней, что, в конечном итоге, приводит к апоптозу. Кроме того, каспаза-8 может активировать белок Bid, вызывающий высвобождение цитохрома С из митохондрий. Место действия Hsp27 в этой сложной цепочке реакций пока точно не установлено.

* Объяснения к рисунку см. ниже в разделе Hsp27

Альтернативный путь запуска апоптоза через Fas/Apo-1 включает белок Daхх. Механизм действия этого белка недостаточно изучен. В норме Daхх локализован в ядре, где он связан с определенными белками, но способен перемещаться в цитоплазму и играть роль адаптерного белка, ответственного за запуск каскада JNK-киназ путем активации Fas/Apo-1. Предполагают, что Hsp27 способен перемещаться в ядро, где он взаимодействует с Daхх, препятствуя его выходу в цитоплазму и активации рецептора. В отличие от рецептора TNF α , участвующего в запуске некроза опухолевых клеток, Fas/Apo-1 играет ключевую роль в процессе селекции лимфоцитов. Интересно отметить, что специфическое накопление Hsp27 происходит при созревании В- и Т-лимфоцитов. Кроме этого, Fas/Apo-1 активно экспрессируется при созревании тканей репродуктивных органов, а также в гладкой и скелетной мускулатуре.

Перечисленные данные свидетельствуют о несомненной важности sHsp в регуляции нормальной жизнедеятельности клеток, а также в процессах апоптоза и злокачественного перерождения. В некоторых злокачественных опухолях заметно повышен уровень экспрессии Hsp27, коррелирующий с ускоренным метастазированием и неблагоприятным исходом болезни. Напротив, при обнаружении в крови онкологических больных антител к Hsp27, выживаемость была выше. В этой связи изучение структуры и механизма действия этих белков представляет несомненный интерес для практической медицины.

Оксид азота (NO)

NEW Вызванный NO апоптоз был впервые продемонстрирован в экспериментах на перитонеальных макрофагах. Затем исследования NO-зависимых механизмов апоптоза проводились на клетках инсулиномы, тимоцитах, хондроцитах, мезангиальных клетках. Эти исследования выявили следующие признаки воздействия NO. Индукция iNOS в макрофагах действием липополисахаридов или интерферона вызывает типичные морфологические и биохимические признаки апоптоза, развитие которых можно было блокировать введением ингибитора NOS-NMMA. Далее было показано, что активация протеинкиназы подавляет развитие признаков апоптоза, вызванных NO. В клетках инсулиномы было выявлено накопление p53 при гибели клеток, вызванной NO. NMMA подавляет накопление p53, обусловленное действием цитокинов или липополисахаридов, что указывает на активную роль NO. И, наконец, было доказано стимулирующее действие NO на активацию каспаз. Суперэкспрессия антиапоптотического белка bcl-2 защищала клетки от цитотоксического действия NO. Интересные данные были получены при изучении взаимодействия радикалов супероксид-ани-

она (O₂⁻) и NO. Оба радикала вызывали зависимые от концентрации процессы апоптоза. Примечательно, что совместная инкубация NO и O₂⁻ вызывала перекрестный защитный эффект. Можно предположить, что сбалансированное отношение активных форм кислорода и азота имеет большое значение в регуляции апоптоза.

Таким образом, активация сигнальных путей апоптоза NO делает его способным убивать клетки. Однако не все клетки после активации NOS вступают на путь апоптоза. Гибель клетки предотвращается суперэкспрессией bcl-2, индукцией гемоксигеназы, O₂⁻ и HSP. Понимание взаимодействия этих сигнальных механизмов поможет выяснить, как NO влияет на жизнь и смерть клеточных систем.

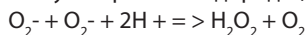
Гранзим В

NEW Гранзимы – это экзогенные сериновые протеиназы, высвобождение которых происходит из цитоплазматических гранул цитотоксических лимфоцитов (CTLs) и NK-клеток. После связывания CTL с клеткой-мишенью содержащее гранул высвобождается в межклеточное пространство, откуда, после воздействия перфорина, который «пробивает» мембрану, попадает в цитозоль клетки-мишени. Гранзим В активирует внутриклеточный каскад активации каспаз, приводя в итоге к гибели клетки-мишени. Гранзим А тоже способен индуцировать апоптоз в клетках-мишенях, но вовлекаемые при этом молекулярные механизмы пока не ясны. Повышение уровня растворимых гранзимов было показано у пациентов, у которых ожидается повышенное содержание NK клеток и CTL ответ, вызванный системными вирусными инфекциями, такими как EBV, HIV, CMV, гепатит А и лихорадка Денге. Показано, что присутствие большого процента гранзим В положительных CTL в лимфоузлах пациентов с болезнью Ходжкина коррелирует с плохим прогнозом. Концентрация растворимых гранзимов А и В повышена в синовиальной жидкости при ревматоидном артрите и достоверно выше, чем у пациентов при остеоартрозе. Предполагается, что гранзимы участвуют в остром отторжении при трансплантации почки, т.к. в инфильтрирующих лимфоцитах отторгаемой почки их экспрессия повышена. Повышенный уровень растворимых гранзимов в плазме у пациентов с пересадкой почки свидетельствует о системной вирусной инфекции, в частности, об инфицировании CMV.

Супероксиддисмутаза (Cu/ZnSOD)

SOD являются уникальным семейством металлопротеинов, катализирующих реакцию дисмутации – взаимодействия двух супероксидных радикалов

(O₂⁻) друг с другом, превращая токсичный O₂⁻ в менее токсичную перекись водорода (H₂O₂) и кислород (O₂):

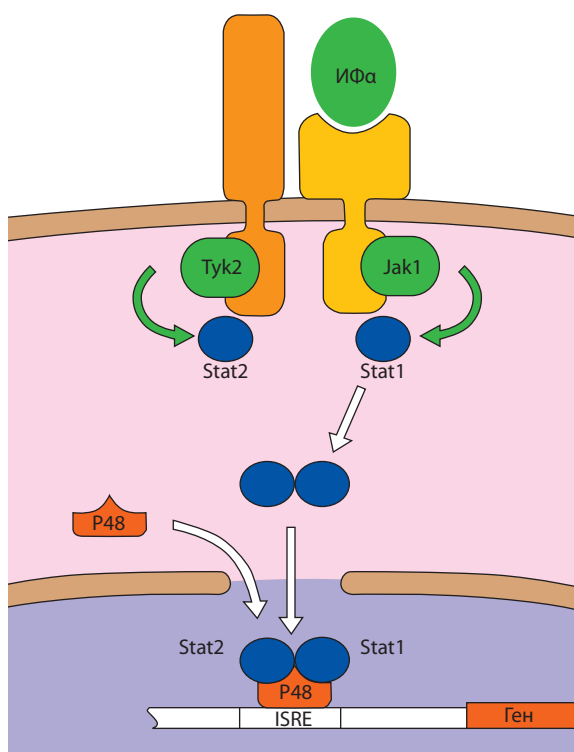


SOD – фермент, вовлеченный в метаболизм кислорода в клетках и защищающий эти клетки от прямого и непрямого повреждения свободными радикалами, опосредованного реакциями превращения кислорода.*

Пути трансдукции сигнала

Изучение процесса сигнальной трансдукции – это быстрорастущая область науки. Сигнальная трансдукция – это процесс, посредством которого клетка генерирует химические изменения, которые, прямо или опосредованно, приводят к изменению свойств, активности и локализации одного или нескольких белков внутри клетки. Сумма этих изменений определяет физиологический ответ на ряд стимуляторов. Понимание динамики событий сигнальной трансдукции в норме и при патологии считается важнейшим фактором снижения заболеваемости в будущем. Большое количество различных белков активируются как часть пути клеточной сигнальной трансдукции. Во многих случаях, активация клеточного ответа происходит при взаимодействии стимулирующих факторов и специфических рецепторов клеточной поверхности, которые передают затем сигнал внутрь клетки.

Пути внутриклеточной передачи сигнала.



Механизм передачи активационного сигнала внутрь клетки для большинства рецепторов цитокинов (за исключением рецепторов хемокинов) одинаков. Связывание цитокина с рецептором приводит к гомо- или гетероолигомеризации его субъединиц и пространственному сближению цитоплазматических участков, что вызывает ассоциацию с ними одной или более изоформ тирозинкиназ семейства JAK (Янус-киназы). Сигнальными последовательностями для JAK киназ являются два сайта в Ser-богатом участке субъединиц рецептора. Образование комплекса субъединиц рецептора с JAK киназами вызывает их фосфорилирование и ассоциацию с ними цитоплазматических транскрипционных факторов (STAT). Фосфорилирование одного или нескольких STAT-факторов приводит к их димеризации и транслокации в ядро, где они выступают как сайт-специфические инициаторы транскрипции генов. Этот вид сигнализации изображен на рисунке на примере связывания IFNα с его клеточным рецептором. Набор различных STAT-факторов в клетках-мишенях цитокинов и аффинность этих факторов к комплексу рецептор-JAK позволяют цитокину активировать уникальный набор генов.

Другие пути сигнализации, в первую очередь, с активацией RAS/MAP-киназы, ведут к пролиферации клеток под действием соответствующих цитокинов, однако некоторые цитокины могут активировать механизм сигнализации, ведущий к апоптотической гибели клетки. Функциональная гибкость сигнальных систем возрастает еще больше благодаря тому, что активировать Stats могут не только Jaks, но и киназы иного происхождения. Например, в случае TNFα и IL-1β действует механизм внутриклеточной сигнализации с участием не Jaks и Stats, а MAP-киназ; в результате с ДНК связываются такие активаторы транскрипции, как AP-1, NFκB и NFIL-6.

Нуклеарный фактор-κB (NF-κB)

NEW

NF-κB является одним из главных транскрипционных факторов, отвечающих за адаптивные реакции клеток. NF-κB представляет семейство цитоплазматических белков, которые при стимуляции переходят в свободное состояние, перемещаясь в ядро, где проявляют активность, связываясь с промоторными участками более 100 генов (по другим данным, более 300), ответственных за индуктивный гомеостаз. NF-κB представлен пятью белками – p50/105, p52/100, p65, c-Rel и RelB. Несмотря на множество форм, классическим типом NF-κB является гетеродимер p50-p65. Он содержится в большинстве клеток и имеет практически все участки, необходимые для связывания с индуцибельными генами. Гомодимеры p50 неактивны, так

* Подробнее см. главу «Маркеры воспаления и оксидативный стресс», стр. 355

как не содержат трансактивационных доменов. Они выступают в роли репрессоров. NF-κB присутствует в цитоплазме в неактивной форме, находясь в комплексе с ингибиторными IκB-белками. Все они имеют несколько так называемых анкириновых повторов (состоят из 30-33 аминокислот), связывающихся с Rel-доменом NF-κB. При стимуляции NF-κB подвергаются фосфорилированию и убиквитинизации. Это меняет конформационную структуру молекул, определяя их распознавание и разрушение внутри протеосом, что, в свою очередь, приводит к высвобождению NF-κB, который после дополнительного фосфорилирования получает возможность мигрировать в ядро клетки, к месту своего действия. Транскрипционная активность NF-κB проявляется через считанные минуты после стимуляции.

Обычно протеолиз IκB происходит в цитоплазме, но возможна и его ядерная деградация. Это показано для нейтрофилов. После фосфорилирования и убиквитинизации IκBα подвергается инактивации не только в цитоплазме, но и в ядре, что, по-видимому, способствует более оперативным событиям при остром воспалении. NF-κB принадлежит одна из центральных позиций в регуляции воспалительного процесса. Активация NF-κB повышает экспрессию адгезивных молекул (E-селектин, VCAM-1, ICAM-1), стимулируя трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов. Активированный NF-κB служит одним из важных регуляторов воспалительных генов, повышая синтез цитокинов (TNFα, IL-1β, -6, -8 и др.) и индуцибельных ферментов (циклооксигеназа-2, коллагеназа, NO-синтаза и др.). В клетках, полученных из очагов воспаления, наблюдается усиление продукции ИКК (прежде всего ИККβ) и ядерной локализации NF-κB. Экспрессия воспалительных генов зависит (правда, в меньшей степени) и от участия других транскрипционных факторов, например членов семейства MAPK JNK и p38 MAPK.

NF-κB опосредует воспалительный и иммунный ответ, реакцию на вирусные инфекции, деление клеток и регуляцию апоптоза. Он может служить как анти-, так и как проапоптотический сигнал. Активация NF-κB обычно задерживает апоптоз, продлевая жизнь клеток-эффекторов в очаге воспаления. Примером являются ревматоидный артрит, бронхиальная астма, хронические заболевания нервной системы, кишечника, атеросклероз, септический шок и др. Особенно подчеркивает важность регуляции NF-κB посредством IκB то, что многие множественные миеломы обладают полиморфизмом в регуляторных сайтах IκB. Это приводит к неправильной регуляции сигналинга NF-κB. В таких миеломах протеосомный ингибитор PS-341, который поддерживает секвестрацию NF-κB в цитоплазме, как оказалось, эффективен для подавления NF-κB-зависимой транскрипции генов и сенсibilизации хеморезистентных клеток.

ЖАК

В составе этого семейства известно несколько членов – JAK1, 2 и 3, TYK1 и 2; все они в разных сочетаниях участвуют в передаче цитокиновых сигналов. Каждый цитокин индуцирует различные механизмы внутриклеточной передачи сигнала в зависимости от того, какую из активностей он проявляет – общую с другими цитокинами или специфическую, индивидуальную. Например, в Т-клетках каждый из трех интерлейкинов – IL-2, -4 и -9, взаимодействуя с субъединицей IL-2Рγ, активирует JAK1 и 3; в то же время IL-10 вызывает активацию JAK1 и Tyk2, а IL-12 таким же образом действует на JAK2 и Tyk2.

Семейство STAT

STAT – факторы, передающие сигнал в ядро клеток и активирующие транскрипцию генов. Существует 7 различных форм STAT, избирательно связывающихся с тирозиновыми основаниями цитокиновых рецепторов. Каждая из них имеет и свои преимущественные пути тирозин-киназной активации. От того, какая форма STAT подвергается активации, в значительной мере зависит и различная реализация цитокинового сигнала (пролиферация, дифференцировка, апоптоз, выживание и др.). Избирательная генерация цитокинового сигнала связана с функцией активированных тирозиновых оснований. При действии IL-2 фосфорилирование факторов STAT обусловлено преимущественно JAK3, которая активирует транскрипционные факторы STAT3 и 5. Представители этого семейства столь же важны для реализации эффекта цитокинов, как JAK. Факторы STAT активируются при передаче сигнала через рецепторную цепь gp130, общую для нескольких цитокинов (включая IL-6). Факторы STAT, которые зависят от сигналов, исходящих от разных участков цитоплазматического домена цепи gp130, ответственны за ростовой эффект, экспрессию FcγR и лизоцима.

c-Jun N-концевая киназа (JNK)

JNK, также известная как стресс-активируемая протеинкиназа (SAPK), является одним из основных белков семейства MAP-киназ у млекопитающих. Из-за альтернативного сплайсинга мРНК экспрессируются 10 различных изоформ JNK. Основными изоформами считаются JNK1 (46 кДа) и 2 (54 кДа). JNK активируется факторами роста, воспалительными цитокинами, в результате стресса, вызванного окружающей средой. В JNK/SAPK сигнальный путь последовательно вовлечены активация MAP-киназы, киназы MEKK1, MAPK-киназы 4 (MKK4) или MKK7, SAPK/JNK и c-Jun. Полная активация JNK требует фосфорилирования остатков треонина и тирозина в триplete Thr-Pro-Tyr. MKK7 и 4 фосфорилируют JNK по треонину 183 и

тирозину 185, соответственно. Активация JNK может вызывать как про-, так и анти-апоптозные сигналы, в зависимости от типа клеток. Роль JNK в развитии опухолей показана на примере исследований JNK2 нокаутированных мышей. Было показано, что селективное ингибирование путей JNK способствует выживанию мотонейронов и увеличивает чувствительность клеток мелкоклеточного рака легких к цитотоксическим воздействиям.

Набор BioSource JNK1/2 [pTrY183/185] ELISA предназначен для количественного определения уровня дважды фосфорилированных JNK1 и 2, по треонину 183 и тирозину 185. Уровень фосфорилирования JNK1/2 является непрямым индикатором влияния обратных киназ на JNK1/2 или активности самих JNK1/2. Данный метод предназначен для определения двойного фосфорилирования JNK1/2 в экстрактах клеток человека.

р38 MAP киназа (МАРК)

р38 MAP-киназа (МАРК), также известная как RK (CDC2-подобная протеинкиназа) является гомологом HOG-киназы дрожжей у млекопитающих. Путь сигнальной трансдукции р38 играет важную роль в регуляции многих клеточных процессов, включая воспаление, дифференцировку, рост и гибель клеток. р38 МАРК активируется в ответ на различные виды внеклеточной стимуляции, включая осмотический шок, воспалительные цитокины, липополисахариды, ультрафиолетовое излучение, факторы роста и т.д. Активация р38 МАРК опосредована различными противоположными киназами, включая MAP kinase-kinase 3 (МКК3), 6 (МКК6) и 4 (МКК4, также известная как SEK1 и JNKK1). Эти киназы фосфорилируют р38 по треонину в положении 180 и тирозину в положении 182, в результате чего происходит активация р38.

Фосфорилированные сайт – специфические антитела (PSSAs)

Фосфорилирование белков по одному или более остаткам серина, треонина или тирозина, включенным в белок, регулирует большую часть клеточных процессов. Эта модификация требует, в частности, распознавания протеин-киназой определенной последовательности-мишени (содержащей остатки Ser, Thr или Tyr), входящей в белок.

Наоборот, фосфатаза является ферментом, способным удалять фосфатную группу с соответствующих остатков Ser, Thr или Tyr, включенных в подобную последовательность, устанавливая, таким образом, динамический баланс между фосфорилированием и дефосфорилированием белков.

ЗАО «БиоХимМак» является официальным представителем компании «BioSource», которая разработала и производит множество антител, специфически распознающих присутствие фосфорилированных остатков, входящих в соответствующие последовательности-мишени исследуемых белков. В настоящее время Biosource предлагает широкую панель, более 70 наименований продукции, предназначенной для анализа фосфорилирования белков, в том числе различных клеточных рецепторов, киназ, фосфатаз, опухолевых супрессоров, факторов трансляции, транскрипции, клеточного цикла и апоптоза.

Использование таких антител к фосфорилированным сайтам (phosphorylation site-specific antibodies, PSSAs) позволяет проводить чувствительное и селективное определение сайта/эпитопа фосфорилированного исследуемого белка, который был фосфорилирован по соответствующим специфическим аминокислотным остаткам (то есть по остаткам серина, треонина или тирозина). Использование PSSAs для распознавания индивидуальных мест фосфорилирования дает возможность получения важнейшей информации о селективном и дифференциальном фосфорилировании/дефосфорилировании белка, благодаря которой возможно понимание регуляции отдельного пути сигнальной трансдукции. Кроме того, PSSAs идеально подходят для изучения комплексной модели фосфорегуляции белков, чьи функции регулируются множественными сайтами процесса фосфорилирования, и которые обычно используются клетками для селективной активации различных сигнальных путей.

Специфичность PSSAs по отношению именно к фосфорилированной форме исследуемого белка обеспечивается различными подходами к получению антител, включая тщательный выбор пептидной последовательности, окружающей фосфорилированный остаток, основанный на множестве выверенных сиквенсов, с использованием одной или более баз данных, содержащих данные о белковых последовательностях, а также использовании подходящих схем иммунизации и тщательную аффинную очистку, с использованием методов позитивной и негативной аффинной очистки.

Другая линия продукции компании «BioSource» – антитела, специфичные к сайтам расщепления (cleavage site-specific antibodies, CSSAs), которые позволяют селективно анализировать события, происходящие в процессе протеолиза, катализируемого каспазами, калпаином, катепсинами и т.д. К настоящему времени хорошо известно, что

активация протеолитических каскадов ведет к селективному протеолизу большого количества различных сигнальных белков, играющему важнейшую роль как в позитивной, так и в негативной регуляции активности или локализации таких белков. Во многих случаях такая активация протеолитических каскадов по своей природе подобна соответствующим каскадам протеинкиназ. CSSAs, разработанные

компанией Biosource, могут быть использованы при исследованиях различными методами, включая метод ИФА в микропланшетном формате (например, набор ELISA для измерения процессинга предшественника амилоида) а также Вестерн-блот (western blotting), иммуноцитохимическое окрашивание и проточную цитометрию.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА



Кат.№	Производитель	Наименование, количество/упаковка
BMS245	Bender Medsystems	sAPO-1/FAS, 96
BMS260	Bender Medsystems	sFAS-лиганд, 96
BMS252	Bender Medsystems	Аннексин V, 96
BMS244	Bender Medsystems	Bcl-2 (в лизате клеток) 96
BMS240	Bender Medsystems	sCD30, 96
BMS265	Bender Medsystems	sCD40, 96
BMS239	Bender Medsystems	sCD40 лиганд, 96
BMS296	Bender Medsystems	sCD134 (OX40) Instant ELISA , 96
BMS289	Bender Medsystems	sCD137, 96
KHR5081	Biosource	DR5 (Death Receptor), 96
KHO0051	Biosource	Цитохром C, 96
KHC1631	Biosource	TRAIL, 96
BMS2006INST	Bender MedSystems	TWEAK, 96
BMS2009	Bender MedSystems	LIGHT, 96
194-0751	BioVendor	sDcR3, 96
DCA100	R&D	Каспаза-1 (IL-1 β - конвертирующий фермент), 96
BMS2012	Bender Medsystems	Каспаза-3 (в лизате клеток), 96
BMS2024	Bender Medsystems	Каспаза-8, 96
BMS2025	Bender Medsystems	Каспаза-9, 96
DCATB0	R&D	Прокатепсин B, 96
488-5000	BCM Diagnostics	Hsp27, 96
917-010	BCM Diagnostics	NO, 192
BMS 2027	Bender Medsystems	Гранзим B, 96
BMS222	Bender Medsystems	Супероксиддисмутаза (Cu/ZnSOD), 96
BMS256	Bender MedSystems	p53, 96
900-445	BCM Diagnostics	NFkB, p 50 (в лизате клеток), 192
900-446	BCM Diagnostics	NFkB, p 65 (в лизате клеток), 192
KHO0371	Biosource	NFkB (общий) в лизате клеток, 96
KHO0071	Biosource	p38MARK [pTpY180/182] phosphoELISA (стресс-зависимая протеинкиназа), 96 (в лизате клеток)
KHO0061	Biosource	p38MARK (общий), 96 (в лизате клеток)
KHO0131	Biosource	JNK[pTpY183/185] phosphoELISA, 96 (в лизате клеток)
KHO0121	Biosource	Human JNK (Total) ELISA, 96 (в лизате клеток)
FNN0011	Biosource	Буфер для экстракции клеток, 100 мл

Тест-системы для определения сигналов трансдукции, PSSAs в экстракте клеток – по запросу.