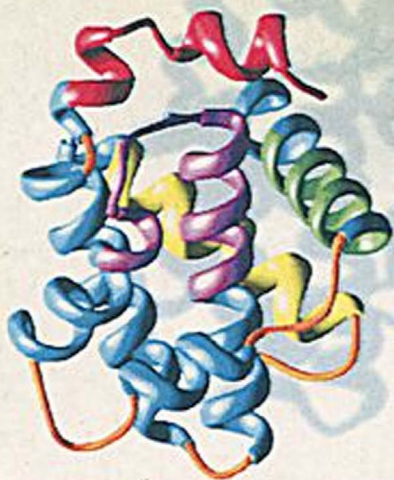




В. Г. Вересов

СТРУКТУРНАЯ БИОЛОГИЯ АПОПТОЗА



УДК 576.32/36:616-091.8

Вересов, В. Г. Структурная биология апоптоза / В. Г. Вересов. — Минск : Белорус. наука, 2008. — 398 с. ISBN 978-985-08-0984-1.

В монографии рассматриваются молекулярные механизмы запрограммированной гибели клеток — апоптоза, исходя из структуры и физических принципов функционирования белков семейства Bcl-2 (антиапоптотических, проапоптотических Вах-подобных и проапоптотических BH3-only), каспаз, белков-ингибиторов и ингибиторов апоптоза. Проанализированы структурные механизмы возникновения патологий, связанных с дефектами апоптоза. Излагаются принципы структурно-обоснованного конструирования лекарственных препаратов с акцентом на противоопухолевые лекарственные препараты и препараты против массовой гибели клеток при нейродегенеративных расстройствах.

Рассчитана на специалистов, работающих в областях молекулярной и структурной биологии, биофизики клетки и белка, биохимии, онкологии, нейробиологии, медицинской химии, фармакологии. Может быть использована при чтении лекций по биофизике, биохимии и медицинской химии в вузах.

Табл. 11. Ил. 171. Библиогр.: 1300 назв.

Р е ц е н з е н т ы :

член-корреспондент НАН Беларуси, профессор С. Н. Черенкевич,
доктор биологических наук, профессор В. П. Голубович

ISBN 978-985-08-0984-1

© Вересов В. Г., 2008

© Оформление. РУП «Издательский дом «Белорусская наука», 2008

ПРЕДИСЛОВИЕ

Предлагаемая вашему вниманию монография посвящена проблемам апоптоза — процесса, часто понимаемого, как запрограммированная, то есть естественная физиологическая гибель клеток. Вместе с тем исследования показали, что в подавляющем большинстве случаев и неестественная гибель клеток, например, при патофизиологических условиях заболеваний, или вследствие действия лекарственных препаратов, происходит по механизмам и с характерными признаками, свойственными классическому апоптозу. Поэтому в широком и современном понимании апоптоз — это процесс гибели клеток с характерными признаками запрограммированной гибели клеток, и именно так он понимается в настоящей книге.

Интерес к исследованиям процессов апоптоза велик. Согласно базе данных Medline с 2001 г. число публикаций, в которых упоминается термин «апоптоз», превышает 18 000. Данный интерес многократно вырос именно в последнее десятилетие, когда стало ясно, что дефекты апоптоза являются критическими факторами в возникновении рака и играют важнейшую роль в нейродегенеративных расстройствах, приводя к массовой гибели клеток и тяжелым клиническим проявлениям при этих заболеваниях.

Автор настоящей монографии работает в области структурной и молекулярной биофизики клетки уже более 30 лет. Настоящая книга является результатом исследований механизмов апоптоза на структурном уровне, которые осуществлялись автором в последнее время. Автор, по образованию физик-теоретик, стремился в ней

объяснить процессы апоптоза исходя из первых принципов, то есть исходя из структуры белков и физических законов взаимодействий между атомами. В течение последних лет появилось несколько прекрасных обзоров посвященных различным проблемам апоптоза таких крупных ученых, как Korsmeyer, Strasser, Youle, Kroemer, Adams, Danial, Andrews, Martinou, Epcand, Cory, Reed, Orrenius, Zhivotovsky, Shore, Скулачев, Агол, Самуилов, Гусев и другие, и, в частности, по отдельным аспектам структурной биологии апоптоза, таких крупных специалистов как Petros, Fesik и Shi. В то время как существует ряд монографий, посвященных проблемам апоптоза, настоящая книга, по сведениям автора, является первой в мировой литературе, в которой апоптоз освещается с позиций структуры и физических взаимодействий. Вместе с тем в книге затрагиваются и широко представлены физиологические, биохимические, медицинские и фармакологические аспекты апоптоза.

Проблемы, рассматриваемые в настоящей монографии, достаточно разнообразны. Это сигнальные пути апоптоза, механизмы функционирования белков семейства Bcl-2, механизмы активации и функционирования каспаз и их ингибиторов, физические механизмы взаимодействия белков с мембранами, и, в частности, механизмы взаимодействия антиапоптотических и проапоптотических амфитропных белков с наружной мембраной митохондрий, а также тесно связанные с процессами апоптоза молекулярные механизмы онкогенеза и гибели клеток при нейродегенеративных расстройствах. Отдельная глава посвящена современным методам разработки лекарственных препаратов. В целом книга включает девять глав, содержит большое количество рисунков и ссылки на 1300 источников. Она может быть полезной для специалистов, работающих в областях молекулярной и структурной биологии, биофизики клетки, биохимии, онкологии и нейробиологии, фармакологии.

Книга написана во время работы автора в Лаборатории биофизики и инженерии клетки (прежнее название — Лаборатория биофизики и фотобиологии мембран)

Института биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, которую в течение длительного времени возглавлял академик С. В. Конев. Автор благодарен сотрудникам данного Института, и особенно всем тем, кто работает и работал с ним в Лаборатории, а также признателен за постоянную поддержку и внимание к его исследованиям Сергею Васильевичу Коневу, первому биофизику Беларуси, крупному ученому и замечательному человеку, которого, к сожалению, уже нет с нами. Постоянное общение с бывшими и нынешними сотрудниками, научное и просто человеческое, в значительной степени способствовали написанию данной книги.

Интерес к биофизике и структурной биологии сформировался у автора в результате общения и сотрудничества с С. Г. Галактионовым, Г. В. Никифоровичем, С. А. Шерманом, В. М. Цейтиным, В. М. Юриным, А. И. Соколиком и многими другими, которым он благодарен за интерес к обсуждавшимся проблемам, советы и помощь.

Автор приносит благодарность сотрудникам Института биофизики и клеточной инженерии: члену-корреспонденту НАН Беларуси, профессору Е. И. Слобожаниной и члену-корреспонденту НАН Беларуси, профессору В. М. Мажулю за ознакомление с текстом рукописи и ценные замечания, которые были учтены при подготовке заключительного варианта книги, а также выразит свою благодарность рецензентам книги: члену-корреспонденту НАН Беларуси, профессору С. Н. Черенкевичу и доктору биологических наук, профессору В. П. Голубовичу.

ВВЕДЕНИЕ В АПОПТОЗ

Для того, чтобы в тканях поддерживался гомеостаз, рождение клеток и их гибель должны быть сбалансированы. Уже в середине XIX в. было замечено, что гибель клеток играет значительную роль в физиологических процессах многоклеточных организмов, особенно при эмбриогенезе и поддержании гомеостаза. Однако, только спустя столетие, в 60-е гг. XX в. исследователи пришли к выводу, что во многих случаях смерть клеток не является случайной, а носит физиологически предопределенный (запрограммированный) характер с осуществлением последовательных запрограммированных контролируемых шагов, приводящих к разрушению клетки. В результате многократно повторяемых делений клеток и дифференциации продуцируются миллиарды клеток, что необходимо для формирования тканей и органов. В ходе этого процесса генерируется большое количество избыточных клеток, а иногда и клеток с дефектами. И те, и другие потенциально опасны для организма, и поэтому должны быть удалены и уничтожены. Поразительным примером запрограммированной смерти клеток являются развитие нематоды *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Сформировавшаяся нематода содержит 1089 клеток, из которых во всех случаях неизменно умирает 131 клетка, то есть столько клеток запрограммированы умереть. Запрограммированная смерть клеток (ЗСК) играет важнейшую роль также и в иммунных процессах. Ей подвергаются тимоциты, которые либо не справились с необходимой трансформацией гена, кодирующего рецепторы Т-клеток, либо рецепторы которых способны на иммунный ответ по отношению к собственным

здоровым тканям. В этом случае масштабы гибели клеток потрясающие: в процессе взросления в тимусе погибает более 95% тимоцитов. Процессы запрограммированной гибели клеток присущи также взрослому здоровому организму, когда происходит удаление старых клеток и замена их на новые. Исследования запрограммированной гибели клеток стали особенно популярными в последние 15 лет, после того как была установлена тесная связь между нарушениями в системе ЗСК и возникновением многих заболеваний. Установлено, что раковые клетки хотя и получают сигнал на уничтожение, но из-за дефектов системы ЗСК при этом заболевании не умирают. Точно также не происходит реализация сигнала на уничтожение клеток в случаях различных лимфо-пролиферативных или аутоиммунных заболеваний. И, наоборот, при ряде нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Паркинсона (БП), болезнь Альцгеймера (БА), амиотрофном боковом склерозе, глаукоме и других из-за дефектов в ЗСК происходит массовая гибель нейронов, приводя в конечном итоге к нейродегенерации.

Термин «запрограммированная смерть клеток» был впервые применен в 1964 г. Локшиным и Уильямсом [1], для обозначения совокупности естественных физиологически предопределенных (запрограммированных) контролируемых шагов (процессов), приводящих к гибели клетки. В 1972 г. в статье Керра с сотр. [2] для обозначения совокупности морфологических процессов, приводящих к контролируемому саморазрушению клеток был применен термин «апоптоз» (от греч. — опадание листьев) — апоптотическая гибель клетки. В последующем стало понятно, что процессам ЗСК присущи морфологические изменения, установленные Керром с сотр. Несмотря на то, что основным является аспект программированности и активный характер гибели, а не сопутствующие ей морфологические изменения, в настоящее время из-за краткости для обозначения совокупности процессов ЗСК чаще используется термин «апоптоз». Вместе с тем морфологические изменения, свойственные естественной физиологически предопределенной гибели клеток присущи

в ряде случаев и процессам неестественной гибели клеток, происходящим, например, при действии токсических веществ, радиации или инфекции. Это привело к тому, что в настоящее время термин «апоптоз» используется двояко: в узком смысле — это синоним совокупности процессов, происходящих при запрограммированной физиологически предопределенной гибели клеток, и в более широком — совокупность активных и контролируемых процессов гибели клетки, происходящих с характерными морфологическими признаками апоптоза, такими, как уменьшение размера клетки, конденсация и фрагментация хроматина, уплотнение и сморщивание наружной и цитоплазматических мембран без выхода содержимого клетки в окружающую среду, фрагментация клетки на мембранные везикулы с внутриклеточным содержимым, фагоцитируемые макрофагами и клетками-соседями [3]. Узнавание макрофагами апоптотической клетки, происходит вследствие нарушения асимметричного распределения фосфатидилсерина между монослоями мембраны при апоптозе. Если в нормальной клетке фосфатидилсерин отсутствует в наружном монослое из-за действия АТФ-зависимых ферментов, переносящих аминокислоты снаружи внутрь, то при апоптозе этот процесс нарушается, что приводит к появлению на наружной поверхности мембраны фосфатидилсеринов узнаваемых клетками-фагоцитами с помощью специальных рецепторов [4].

Апоптоз играет важную роль в развитии многоклеточных организмов и поддержании клеточных популяций в тканях в физиологических и патологических условиях. Смерть клеток при эмбриональном развитии исключительно важна при формировании органов и сложных многоклеточных тканей. Апоптоз также исключительно важен для взрослого организма, так как без него невозможен нормальный клеточный гомеостаз. Последнее имеет критическое значение для долгоживущих млекопитающих, которым приходится интегрировать множественные физиологические и патологические сигналы. Есть серьезные основания полагать, что нарушение клеточного гомеостаза является первичным патогенным событием,

приводящим к болезням [3]. Многочисленные и убедительные экспериментальные данные говорят о том, что недостаточный апоптоз — к раку или аутоиммунности, в то время, как избыточный апоптоз может приводить к острым и хроническим нейродегенеративным заболеваниям, иммунодефициту и бесплодию.

1.1. Неапоптотические типы гибели клеток

1.1.1. Некроз

Являясь наиболее распространенной формой смерти клеток, апоптоз не является единственной физиологически значимой формой их гибели. Второй по распространенности формой гибели клеток является некроз — патологическая форма клеточной смерти, характеризующаяся разрывом цитоплазматической и внутриклеточных мембран [5]. Это приводит к тому, что цитоплазма выходит в межклеточное пространство, высвобождаются лизосомальные ферменты, вода по градиенту концентрации поступает внутрь клетки, все органеллы начинают набухать, лизосомы переваривают все содержимое клетки и она лопаются (рис. 1.1). Некротическую гибель клетки могут вызывать вирусы и иные паразиты, если иммунная система не смогла справиться с инфицированной клеткой и решить ее судьбу посредством апоптоза. Как следствие, новое поколение паразитов устремляется в соседние клетки, начинается воспалительный процесс, исходом которого может быть, как полное выздоровление, так и гибель организма. Наличие воспаления у животных и человека является признаком некроза, отличающим его от апоптоза.

Характерными признаками апоптоза, позволяющими отличить его от некроза — патологической формы клеточной смерти, характеризующейся разрывом цитоплазматической и внутриклеточной мембран (рис. 1.1), являются: переход фосфатидилсерина из внутреннего монослоя цитоплазматической мембраны в наружный монослой, выход цитохрома *c* из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму, активация цистеиновых про-

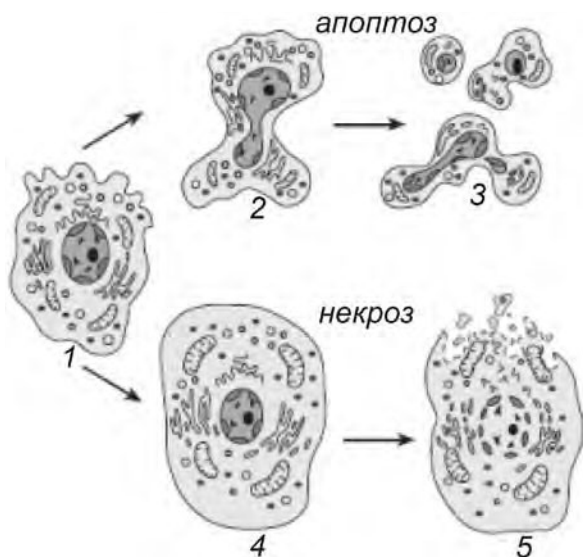


Рис. 1.1. Изменение структуры клеток при некрозе и апоптозе: 1 — нормальная клетка; 2 — апоптотическое сморщивание клетки с образованием пузырчатых выростов; 3 — фрагментация клетки с образованием апоптотических везикул (апоптотическая дезинтеграция); 4 — набухание клетки при некрозе; 5 — некротическая дезинтеграция

теиназ (каспаз), образование активных форм кислорода, сморщивание цитоплазматической мембраны, уменьшение объема клетки, разрывы нитей ядерной ДНК в межнуклеосомальных участках, конденсация хроматина по периферии ядра, последующий распад ядра на части, фрагментация клеток на везикулы с внутриклеточным содержимым — апоптотические тельца.

Решение клетки умереть от некроза или от апоптоза зависит в значительной степени от запасов энергии внутри клетки. В то время, как для апоптоза требуется лишь незначительное количество аденозинтрифосфата (АТФ), при некрозе происходит потребление чуть ли не всего пула внутриклеточного АТФ. С учетом этого, а также того, что некроз еще и не предопределен генетически, его можно рассматривать как случайную гибель клетки. Однако, как показали недавние исследования молекулярных событий, происходящих в ряде случаев некроза, важную роль в его

осуществлении играют активации каспаз и синтез белка [5, 6], что говорит о том, что некроз не является совсем случайной формой клеточной гибели и определяется не только стимулом, но и самой клеткой, в частности ферментами, которые могут регулироваться. Недавно показано, что киназа RIP (receptor interacting protein), которая необходима для осуществления некроза, ингибирует АТФ/АДФ (аденозиндифосфат) обмен на мембранах митохондрий, взаимодействуя с адениннуклеотидтранслоказой (АНТ), вызывая дисфункцию митохондрий и клеточную смерть [7]. Это позволило предположить, что митохондриальные изменения могут являться скоростью-лимитирующим фактором для некротической гибели клеток. В соответствии с этой концепцией, а также с учетом того, что белок Bcl-2 стабилизирует митохондриальную мембрану, было предположено, что реализация апоптоического или некротического сценариев может определяться уровнем экспрессии белка Bcl-2, приводя при его низком уровне к апоптозу, и, наоборот, при высоком — к некрозу.

1.1.2. Аутофагия

В то время, как при апоптозе происходит взрывная активация катаболических ферментов, приводящая к разрушению клеточных структур и органелл, аутофагия является медленным, ограниченным явлением, при котором части цитоплазмы вовлекаются в создание новых органелл — аутофагосом, двухмембранных везикулярных образований, окружающих удаляемые органеллы [8, 9]. Аутофагосомы соединяются с лизосомами, образуя аутофаголизосомы, в которых органеллы перевариваются. При аутофагном типе гибели клеток таким образом перевариваются все органеллы клетки, оставляя лишь клеточный дебрис, поглощаемый макрофагами. Основными стимулами к запуску процессов аутофагии в клетках является нехватка питательных веществ или наличие в цитоплазме поврежденных органелл.

Между апоптозом и аутофагией существуют сложные функциональные взаимоотношения, в результате кото-

рых аутофагия может способствовать клеточной гибели или являться клеточной защитой против острого стресса, например, вызываемого недостатком питательных веществ. Клетки, лишенные экзогенных энергетических источников, катаболизируют часть цитоплазмы с целью генерации АТФ и других промежуточных метаболитов, позволяя удовлетворить в значительной степени часть своих энергетических запросов. Помимо этого, аутофагия удаляет аутофагосомы, содержащие неправильно свернутые белки или опасные для организма агрегаты белков. Примером этого процесса является защитное действие индуктора аутофагии рапамицина, который предотвращает нейродегенеративные расстройства, вызываемые экспрессией мутантного белка хантинтина [10].

Аутофагная вакуолизация часто наблюдается и при апоптозе, поэтому в последнее время активно débатируется вопрос: в каких случаях гибель клетки является следствием исключительно аутофагии, а в каких — аутофагия является сопутствующим фактором апоптоза. Недавно с использованием нокаут-моделей было установлено, что нокаут-выключение гена аутофагии беклина-1 (*atg6*) приводит к развитию эндогенного рака [11] (что первоначально было интерпретировано, как наличие автономной аутофагной клеточной гибели), препятствующего накоплению в клетке поврежденных органелл и, в частности, поврежденных митохондрий. Однако, недавно было установлено, что связывание беклина с белком Bcl-2 приводит к подавлению аутофагии. Это позволило предположить, что белок Bcl-2 является онкогеном потому, что подавляет не только апоптоз, но и аутофагию.

1.1.3. Митотическая катастрофа

Митотическая катастрофа — тип смерти клеток, происходящий при митозе. Морфологические характеристики гибели клеток при митозе, отличаются от имеющих место при апоптозе [12]. В частности, при митотической катастрофе смерти клеток часто предшествуют микронуклеация и мультинуклеация. Причиной митотической

катастрофы является комбинация нескольких факторов, таких как нарушение контроля за клеточным циклом со стороны структуры ДНК или сборки митотического веретена, а также повреждение клетки [12]. В результате может оказаться, что несмотря на наличие дефектов в митотической системе, защитные действия через остановку клеточного цикла могут быть не реализованы, что приведет к аномальному разделению хромосом, имеющим своим конечным итогом запуск апоптотической программы и гибель клетки. Если клеточная смерть в результате митотической катастрофы оказывается заингибированной, например, посредством сверхэкспрессии антиапоптотического белка Bcl-2, прекращение неправильного митоза не происходит, что приводит к генерации анеуплоидных дочерних клеток. Поэтому митотическую катастрофу можно рассматривать как защитный механизм против анеуплоидизации.

1.2. Апоптоз и *C. elegans*

Базовое понимание процессов апоптоза сформировалось в результате изучения процесса апоптоза у червя *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). У гермафродита *C. elegans* запрограммированная гибель клеток имеет четкий и устойчивый характер, что позволяет рассматривать этот организм, как идеальную модель для определения генов, ответственных за судьбу клеток. У взрослой особи *C. elegans* из 1090 клеток запрограммирована умереть 131 клетка. Идентификация генов, ответственных за запрограммированную смерть этой 131 клетки, с использованием мутагенеза показала, что два гена, *ced-3* и *ced-4* являются абсолютно необходимыми для того, чтобы клетка была обречена умереть, в то время, как другой ген *ced-9* необходим для предотвращения гибели клеток. Показано что *ced-9* является гомологом онкогена млекопитающих Bcl-2, который, как было установлено, предотвращает у них апоптоз, и, как оказалось, способен предупреждать его и у *C. elegans*. За пионерские работы, выполненные с использованием в качестве объекта *C. elegans* по генетике ЗСК, триумвират исследователей в составе Бренне-

ра, Хорвица и Сальстона в 2002 г. был удостоен Нобелевской премии.

Клонирование и характеристика *ced-3* позволили сформировать основные представления о том, как работает апоптотическая машина. *Ced-3* кодирует белок, родственный интерлейкин 1 β -конвертирующему ферменту (ICE, interleukin 1 β converting enzyme), который играет важную роль при воспалении [13]. Экспрессия *ced-3* или ICE в клетках млекопитающих приводит к гибели клеток. Установлено, что ICE является цистеиновой протеазой, использующей цистеиновый мотив для расщепления белков по аспарагиновой кислоте, аспартату, и поэтому этот фермент был назван каспазой (Cys+Асп+аза). Вскоре после этого были найдены гомологи каспазы ICE (каспазы-1), которые образуют семейство каспаз. Было установлено, что многие из них участвуют в процессе апоптоза, причем белок, кодируемый *ced-3*, больше похож на каспазу-3, чем на каспазу-1. Оказывается, что многие из каспаз участвуют в процессах апоптоза, выполняя при этом различные задачи.

1.3. Три сценария осуществления апоптоза

Считается, что в зависимости от вида стимула и типа клеток апоптоз может осуществляться по трем сигнальным путям: внутреннему митохондриальному (часто называемому внутренним), внешнему немитохондриальному и внешнему митохондриальному (два последних типа часто объединяют во внешний путь апоптоза) (рис. 1.2).

В случае митохондриального апоптоза происходит прорыв (пермеабиллизация) наружной мембраны митохондрий (НММ) и выброс апоптогенных факторов (главным образом, цитохрома *c*) из межмембранного пространства митохондрий с последующей активацией каспаз-исполнителей (каспаз-эфффекторов), которые осуществляют финальную деструкцию клетки. При внешнем немитохондриальном апоптозе, каспазы-исполнители активируются напрямую каспазами-инициаторами, а они, в свою очередь, в результате связывания внеклеточных лигандов («лигандов смерти») — с поверхностными рецепторами («рецепторами смерти»).

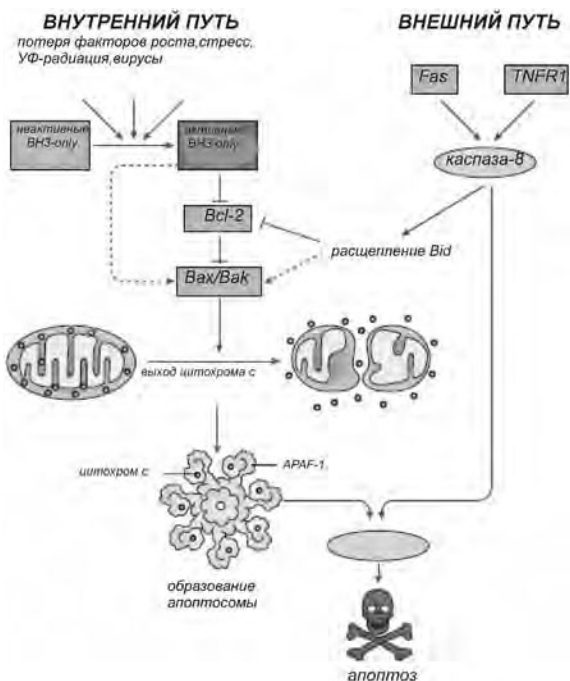


Рис. 1.2. Пути апоптоза

Каспазы относятся к семейству эволюционно-консервативных протеаз, ферментов, катализирующих ограниченное расщепление внутриклеточных белков. В активном центре фермента находится остаток цистеина. Все каспазы являются аспатазами: специфически узнают определенные тетрапептидные звенья белков и расщепляют пептидную связь по карбоксильному остатку аспарагиновой кислоты. В клетке каспазы синтезируются в форме латентных предшественников — проферментов, называемых прокаспазами. По субстратной специфичности различают иницирующие (инициаторные) каспазы, и эффекторные (исполняющие) каспазы. При немитохондриальном сценарии развития апоптоза (рис. 1.3) под действием внешнего стимула — лигандировании поверхностных рецепторов — происходит активация иницирующих каспаз.



Рис. 1.3. Схематическое изображение апоптоза, реализуемого по немитохондриальному пути

При немитохондриальном типе апоптоза субстратами иницирующих каспаз (к ним относятся каспазы -2, -8, -10, -12, которые также называют каспазами первого эшелона), являются латентные формы каспаз-эффекторов (каспаз второго эшелона — прокаспазы -3, -6, -7). В свою очередь, свыше 60 белков являются субстратами эффекторных каспаз (каспаз-исполнителей) и трансформация многих из них приводит к деструкции клетки и апоптозу.

1.3.1. Митохондриальный тип апоптоза, АРАF-1, апоптосома, цитохром с, каспаза-9

Митохондрии-органеллы, осуществляют энергообеспечение эукариотических клеток животных, а также растений в ночные часы. Внутри митохондрии находится митопласт, в котором расположены ферменты цикла лимон-

ной кислоты и β -окисления жирных кислот. Митопласт окружен мембраной (внутренней мембраной митохондрий — ВММ), в которую встроены компоненты дыхательной цепи переноса электронов, фермент АТФ-синтаза и белки-переносчики веществ через мембрану. НММ, пронизанна порами, пропускающими соединения с молекулярной массой до 0,5 кДа. Пространство между наружной и внутренней мембранами является местом локализации некоторых белков, в том числе цитохрома *c* — низкомолекулярного компонента дыхательной цепи, который, будучи положительно заряженным белком, электростатически связывается с отрицательно-заряженной поверхностью внутренней мембраны митохондрий. Стрессовые воздействия, вызванные цитотоксическими соединениями, дефицитом ростовых факторов, активными формами кислорода, нарушением структуры ДНК, приводят к образованию гигантской поры, с диаметром ~ 3 нм, что позволяет пересекать мембрану веществам с молекулярной массой 1,5 кДа и ниже. Вследствие образования гигантской поры, вода поступает внутрь, митохондриальный матрикс набухает, НММ разрывается и растворимые белки межмембранного пространства оказываются в цитоплазме. Среди этих белков несколько апоптотических факторов: цитохром *c*, прокаспазы -2, -3, -9, белок АIF — фактор, вызывающий апоптоз.

Генетические исследования на *C. elegans* показали, что в случае митохондриального апоптоза, активность *ced-4* предшествует действию каспазы *ced-3*. Биохимическое воспроизведение митохондриального пути апоптоза *in vitro* позволило предположить существование трех факторов АРАФ (apoptotic protease activating factors) необходимых для активации каспаз. Идентификация этих трех факторов показала, что один из них, АРАФ-1, гомологичен *ced-4*, а АРАФ-2 и АРАФ-3 идентифицированы соответственно, как цитохром *c*, локализуемый в митохондриях, и каспаза-9 [14, 15]. Каспаза-9 — инициаторная каспаза (каспаза первого эшелона), способна самоактивироваться после связывания с АРАФ-1. Каспаза-9 обладает способностью расщеплять и тем самым активировать каспазу-3

(ced-3 у *C. elegans*) — эффекторную каспазу (каспазу второго эшелона). Структурно-функциональные исследования позволили предложить следующую модель активации каспазы-9. АРАФ-1 связывает цитохром *c* посредством своих WD40-доменов, после чего АРАФ-1 в присутствии АТФ/дАТФ оказывается в состоянии связывать каспазу-9. Это связывание происходит посредством доменов CARD (caspase recruitment domains), присутствующих, как у АРАФ-1, так и у каспазы-9 [14]. CARD-домен АРАФ-1 как правило присоединен к двум доменам WD40 АРАФ-1 и вытесняется из связанного состояния при связывании с WD40 цитохрома *c*. Последующее связывание АТФ/дАТФ с АРАФ-1 вызывает конформационные изменения благоприятствующие образованию гептамера в форме колеса — апоптосомы, способной активировать эффекторные каспазы [16].

Другой белок межмембранного пространства — АIF, представляющий собой флавопротеин и имеющий значительную гомологию с аскорбатредуктазами растений, оказавшись в цитоплазме после пермеабиллизации наружной мембраны митохондрий, транслоцируется в клеточное ядро, где активирует нуклеазу, разрывающую ядерную ДНК на крупные фрагменты длиной 50 тыс. пар нуклеотидов и более. При этом апоптоз происходит без участия каспаз.

Еще один проапоптозный белок митохондрий — SMAC (second mitochondrial apoptosis activating factor — второй митохондриальный фактор, активирующий апоптоз) вызывает активацию каспаз-3 и -9, связываясь с ингибитором этих каспаз белками IAP (inhibitor of apoptosis), и снимая их ингибирующее действие на эти каспазы.

1.4. Белки семейства Bcl-2 — важнейшие регуляторы апоптоза

Из-за своей фундаментальной значимости запрограммированная смерть клеток является процессом, важнейшими регуляторами которого (особенно реализуемого по митохондриальному пути) являются гомологичные белки семейства Bcl-2 (рис. 1.4). Оно получило свое название от

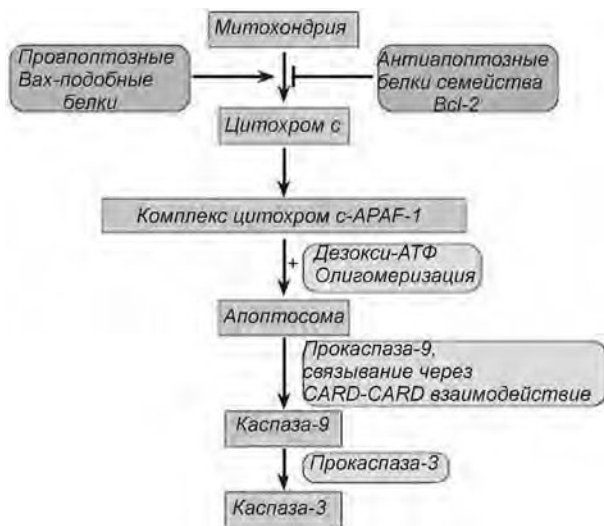


Рис. 1.4. Схематическое изображение апоптоза, реализуемого по митохондриальному пути

базового белка семейства — B-cell lymphoma-2, кодируемого протоонкогеном Bcl-2, который был впервые идентифицирован в точке разрыва хромосомы при транслокации *t* (14; 18), обуславливающей возникновение фолликулярной В-клеточной лимфомы [17–19]. Оказалось, что в отличие от ряда других онкогенов, экспрессия Bcl-2 не промотировала пролиферацию, а блокировала гибель клетки при многих физиологических и патологических стимулах [20].

Млекопитающие обладают большим количеством белков семейства Bcl-2, которые включают проапоптотические и антиапоптотические белки. Первый проапоптотический гомолог Вах был идентифицирован при его гетеродимеризации с Bcl-2 [21]. Мыши, лишённые Вах обнаруживали разрастание клеточных популяций. Отношение количества антиапоптотических белков (таких как Bcl-2) к проапоптотическим (таким как Вах) определяет судьбу клетки. Семейство белков Bcl-2 может быть подразделено на три подсемейства pBCL2-типа-I, pBCL2-типа-II,

pBCL2-типа-III в зависимости от того, являются они апоптотическими или антиапоптотическими, а также в соответствии с гомологией с четырьмя доменами базового белка Bcl-2, названных BH-доменами.

К первому подсемейству (pBCL2-типа-I) относятся все антиапоптотические белки семейства, включая Bcl-2, Bcl-X_L [22], Bcl-w [23] и sed-9, гомологичные белку Bcl-2 по всем четырем доменам (BH1—BH4), а также белки Mcl-1 [24], A1[25] и KSHV-Bcl-2 [26], гомологичные белку Bcl-2 по BH1—BH3 доменам.

Второе подсемейство (pBCL2-типа-II, или Вах-подобное подсемейство) образуют проапоптотические белки, гомологичные белку Bcl-2 по доменам BH1-BH3, такие как Вах [21], Вак [27], Вок [28]. Исследования с использованием мутагенеза показывают, что домены BH1, BH2, BH3 сильно влияют на гомо- и гетеродимеризацию этих белков.

Третье подсемейство (pBCL2-типа-III или BH3-only) включает белки, гомологичные белку Bcl-2 лишь по одному домену BH3—Bid (BH3 interacting domain death agonist) [29], Vim (Bcl-2 interacting mediator of cell death) [30], Bmf (**Bcl-2 modifying factor**) [31], Puma (**p53—53kDa promoter-upregulated modulator of apoptosis**) [32], Noxa [33], Bad (Bcl-2 antagonist of cell death) [34], Hrk (hara-kiri) [35]. Считается, что BH3-only белки играют двойную роль при апоптозе: они могут связываться с препятствующими апоптозу антиапоптотическими белками семейства Bcl-2, а также напрямую активировать мультидоменные проапоптотические белки семейства Bcl-2, такие как Вах или Вак.

1.5. Другие формы апоптоза

В эндоплазматическом ретикулуме локализована прокаспаза-12, которая активируется при нарушении внутриклеточного Ca²⁺-гомеостаза или накоплении избыточного количества белка в эндоплазматическом ретикулуме. Каспаза-12 активирует каспазу-3, осуществляющую апоптоз. Существует связь между этой формой апоптоза и БА, при которой разрушаются нервные клетки мозга. Одним

из субстратов каспазы-3 является белок β -амилоид (A β), накапливающийся в нейронах. Каспаза-3 разрушает A β с образованием цитотоксического амилоидного β -пептида, который ускоряет превращение прокаспазы-3 в агрессивную каспазу-3 и тем самым ускоряет гибель нейрона.

Цитотоксические Т-лимфоциты вызывают апоптоз инфицированной клетки-мишени посредством впрыскивания белка-перфорина в зону контакта с клеткой-мишенью. Полимеризуясь, перфорин образует в плазматической мембране клетки-мишени трансмембранные каналы, по которым внутрь последней поступают гранзимы — смесь протеолитических ферментов, выделяемых Т-киллером. Существенным компонентом этой смеси является гранзим В — специфическая к остатку аспарагиновой кислоты сериновая протеаза (в активном центре остаток — серин), превращающая прокаспазу-3 в каспазу-3. Гранзим В обладает значительно большей эффективностью по превращению прокаспазы-3 в каспазу-3 по сравнению с иницилирующими каспазами -8 и -10.

Несколько каспаз, включая каспазу-3, содержат RGD (аргинин-глицин-аспартат) — последовательность вблизи активного центра фермента. Она вовлечена во внутримолекулярные взаимодействия с участком белка с аминокислотной последовательностью DDM (аспартат—аспартат—метионин), придающие молекуле профермента конформацию, при которой последний не проявляет протеазной активности. Низкомолекулярный пептид RGD, проникая в клетку и вступая в конкуренцию с RGD-последовательностью прокаспазы-3, вытесняет ее из области, где она взаимодействует с DDM, что приводит к изменению конформации и олигомеризации прокаспазы-3 с образованием протеазно-активной каспазы-3.

1.6. Физиологическая роль апоптоза

Физиологическая роль апоптоза связана со следующими тремя его основными функциями: обеспечением программы индивидуального развития организма (онтогенеза) и дифференциации клеток; поддержанием тканевого гомеостаза; защитой от патогенов.

**ВНЕШНИЙ ПУТЬ
АПОПТОТИЧЕСКОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ.
«РЕЦЕПТОРЫ СМЕРТИ» —
ИНИЦИАТОРЫ АПОПТОЗА**

2.1. «Лиганды смерти» и «рецепторы смерти»

Часто под запрограммированной смертью клеток (ЗСК) понимают «клеточный суицид», однако во многих случаях апоптоз инициируется действием внешних факторов, таких как УФ- и γ -излучение, тепловой шок, окислительный стресс, действие ряда лекарственных препаратов, вирусная инфекция, потеря привязки к клеточному матриксу, недостаток факторов роста, действие глюкокортикоидов, связывание цитокинов с рецепторами на клеточной поверхности и т. д. Во всех случаях апоптоза на заключительной его стадии осуществляется активация каспаз-исполнителей, которые и выполняют деструкцию клетки. Одним из распространенных механизмов активации каспаз-исполнителей (эффекторных каспаз) является механизм активации эффекторных каспаз через первоначальное связывание определенных лигандов (лигандов смерти, death ligands, DL) с группой поверхностных рецепторов (рецепторов смерти, death receptors, DR) [1]. Исторически этот путь получил название внешнего пути апоптотической сигнализации, что нельзя считать удачным термином, так как в ряде случаев инициации апоптоза под действием внешних факторов используется иной механизм активации каспаз-исполнителей.

DR передают внутрь клетки сигналы, поступающие в виде DL и принадлежат к суперсемейству рецептора фактора некроза опухолей (ФНО, TNFR)/рецептора фактора роста нервов (NGFR) [2—4]. Отличительной чертой членов этого суперсемейства является наличие внеклеточной части, содержащей повторы, богатые цистеином — CRD (cystein rich domain). Некоторые белки этого

суперсемейства содержат также 70—80 аминокислотный цитоплазматический мотив, ответственный за белок-белковые взаимодействия и называемый доменом смерти (death domain, DD), потому, что с его помощью рецепторы взаимодействуют с клеточной апоптотической машиной. Что касается доменов CRD, то они формируют поверхность, ответственную за взаимодействие с лигандом. Суперсемейство DR можно разделить на две подгруппы в зависимости от того содержат они домены смерти или нет. Рецепторы, которые содержат домен смерти (Fas, TNFR1) относятся к подсемейству DR суперсемейства TNF-рецепторов [5] и вовлечены в осуществление апоптоза. Ко второму подсемейству суперсемейства TNF-рецепторов относятся TNF-рецепторы, которые не содержат доменов смерти (TNFR2, CD40, CD30 и др.). Эти рецепторы вовлечены главным образом в транскрипцию генов способствующих выживанию, росту и дифференциации клеток.

К настоящему времени наиболее полно охарактеризованными являются рецепторы смерти CD95 (FAS), TNFR1 (p55), DR3 (Apo3, WSL-1, TRAMP, LARD), DR4 (TNF-related apoptosis inducing ligand receptor, TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2, Apo-2, TRAILCK2, KILLER), DR6 (TRADD), а также рецепторы EDA-1R и EDA-2R (табл. 2.1).

Таблица 2.1. Рецепторы смерти и их лиганды

Лиганды	Рецепторы
TNF	TNFR1/DR1/CD120a/p55
FasL/CD95L	Fas/CD95/Apo1/DR2
Apo3L/TWEAK	DR3/Apo3/WSL-1/TRAMP/LARD
TALL-1/BAFF	BCMA, TACI, BAFFR
EDA-1	EDAR
EDA-2	XEDAR
TRAIL/Apo2L	TRAIL-R1/DR4 TRAIL-R2/DR5/Apo-2/TRAILCK2/KILLER
TRADD	DR6

Физиологически активные лиганды рецепторов смерти существуют в виде тримеров. Тример лиганда связывается с тремя молекулами рецептора, индуцируя таким образом тримеризацию последнего (рис. 2.1).

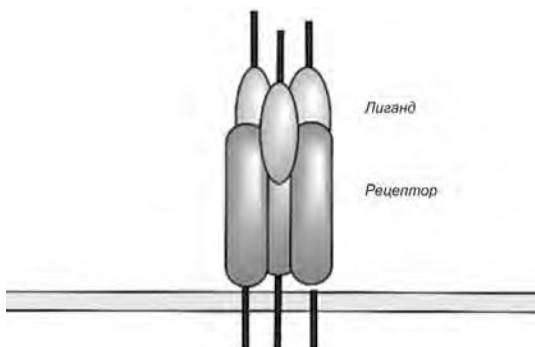


Рис. 2.1. Тримеризация рецептора тримером лиганда

Топология комплексов лиганд — рецептор сходна для всех рецепторов смерти, в то время как гомология аминокислотных последовательностей довольно низка. С доменами смерти DR посредством собственных DD связываются разнообразные адапторные белки, которые осуществляют дальнейшую передачу сигнала внутрь клетки. Не все адапторные белки принимают участие в индукции апоптоза. Некоторые из них запускают сигнальные пути, не связанные с апоптозом и даже антиапоптотические. Проапоптотические адапторные белки, вовлеченные в передачу сигнала от DR, помимо DD, с помощью которых они связываются с DR, также содержат эффекторные домены смерти (DED — death effector domains). DED относится к CARD (caspase recruitment domain) — группе доменов, взаимодействующих с каспазами. Взаимодействие CARD, принадлежащего неактивному проферменту каспазы, с CARD, принадлежащим адапторному белку, вызывает аутокаталитический процессинг профермента, сопровождающийся переходом фермента в активное состояние.

В настоящее время наиболее детально охарактеризованы процессы активации Fas и рецептора фактора некроза опухолей-1 (ФНО-1, TNFR1). К доменам смерти Fas, подвергшимся агрегации в результате взаимодействия рецептора с лигандом, посредством собственного домена смерти присоединяется адапторный белок FADD (fas associated death domain). FADD содержит DED, гомологичный домену,

присутствующему в виде тандема в составе неактивного профермента каспазы-8. В результате взаимодействия вышеупомянутых гомологичных доменов каспазы-8 связывается с FADD, формируя сигнальный комплекс DISC (death inducing signaling complex), который в свою очередь вызывает активацию каспазы-8, запуская каспазный каскад, что приводит в конечном итоге к смерти клетки. В рамках DISC каспаза-8 олигомеризуется и активируется посредством самопроцессинга. Активный фермент, представляющий собой гетеротетрамер, уходит из DISC, в то время как продомен, содержащий два DED, остается в составе комплекса. Каспаза-8 является инициаторной — запускает апоптоз посредством активации других, эффекторных каспаз, которые расщепляют множество клеточных субстратов, разрушая клетку.

Передача сигнала от TNFR1 осуществляется иначе, так как в данном случае индукция апоптоза не является единственным следствием взаимодействия рецептора с лигандом. С DD, принадлежащим TNFR1, взаимодействует адапторный белок TRADD (TNF receptor associated death domain) с которым взаимодействуют DD-содержащие белки RIP (receptor interacting protein) и FADD. Последний осуществляет индукцию апоптоза по механизму, аналогичному описанному выше. RIP взаимодействует с еще одним адапторным белком — TRAF2 (TNF receptor associated factor-2), который вместе с RIP запускает сигнальные пути, приводящие к активации транскрипционных факторов AP-1 (activator protein-1) и NF- κ B, под контролем которых экспрессируются провоспалительные и иммуномодулирующие гены, а также синтезируются антиапоптотические белки (различные белки семейства IAP, Bcl-x и др.). Благодаря продукции антиапоптотических белков, активация TNFR1 приводит к апоптозу лишь в определенных условиях, например, в случае отсутствия белкового синтеза в клетке. Из вышеупомянутых рецепторов лучше всего изучены последствия активации DR3, который очень похож на TNFR1, а его лиганд (Ap3L) — на TNF. С DR3 взаимодействуют те же адапторные белки, что и с TNFR1.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Глава 1. Введение в апоптоз	6
1.1. Неапоптотические типы гибели клеток	9
1.1.1. Некроз	9
1.1.2. Аутофагия	11
1.1.3. Митотическая катастрофа	12
1.2. Апоптоз и <i>C. elegans</i>	13
1.3. Три сценария осуществления апоптоза.....	14
1.3.1. Митохондриальный тип апоптоза, АРАФ-1, апоптосома, цитохром <i>c</i> , каспаза-9.....	16
1.4. Белки семейства Bcl-2 — важнейшие регуляторы апоптоза....	18
1.5. Другие формы апоптоза	20
1.6. Физиологическая роль апоптоза	21
Глава 2. Внешний путь апоптотической сигнализации. «Рецепторы смерти» — инициаторы апоптоза	22
2.1. «Лиганды смерти» и «рецепторы смерти».....	22
2.2. Структура TNF (ФНО)-лигандов.....	29
2.2.1. Лиганд FasL.....	30
2.2.2. Лиганд TNF- α	32
2.2.3. Лиганд TRAIL	33
2.2.4. Лиганд TALL-1	35
2.2.5. Лиганды EDA-1 и EDA-2.....	37
2.3. Структуры TNF-рецепторов.....	40
2.3.1. Рецептор Fas	41
2.3.2. Рецептор TNFR1.....	43
2.3.3. Рецепторы DR4 и DR5	44
2.3.4. Рецептор DR5 в комплексе с TRAIL	46
2.4. Структура адапторных белков.....	49
2.4.1. Структура FADD	49
2.4.2. Структура адапторного белка TRADD.....	53

2.5. Узнавание лигандов и рецепторов	55
2.5.1. Взаимодействие TNF β —TNF-R1	57
2.5.2. Взаимодействие TRAIL—DR5	57
2.5.3. Взаимодействие TALL-1—BCMA	58
2.5.4. Взаимодействие TALL-1—BAFF-R	58
2.6. Сигнализация рецептором TNFR1	59
2.7. Сигнализация рецептором Fas/CD95	60
2.8. Индукция апоптоза лигандами TRAIL	60
2.9. Образование DISC	61
Глава 3. Белки семейства Bcl-2 — регуляторы апоптоза	63
3.1. Классификация белков семейства Bcl-2	63
3.2. Антиапоптотические белки семейства Bcl-2	65
3.2.1. Белок Bcl-x _L	66
3.2.1.1. 3D-структура белка Bcl-x _L в растворе	67
3.2.1.2. 3D-структура белка Bcl-x _L , связанного с мембраной	72
3.2.2. Белок Bcl-2	73
3.2.2.1. 3D-структура белка Bcl-2	74
3.2.3. Белок Bcl-w	75
3.2.3.1. 3D-структура белка Bcl-w	76
3.2.4. Белок Mcl-1	77
3.2.4.1. Свойства белка Mcl-1 в растворе. Связывание белка Mcl-1	78
3.2.4.2. 3D-структура белка Mcl-1	79
3.2.5. Белок A1	83
3.3. Проапоптотические Bax-подобные белки семейства Bcl-2	85
3.3.1. Белок Bax	85
3.3.1.1. 3D-структура белка Bax	86
3.3.1.2. Структурные изменения Bax, ассоциированные с возрастом рН	88
3.3.1.3. Роль С-концевого участка Bax в реализации апоптоза	88
3.3.1.4. Противоположные биологические функции, контрастирующие с близкой структурой Bax и Bcl-x _L	89
3.3.2. Белок Bak	90
3.3.2.1. 3D-структура белка Bak	90
3.4. Проапоптотические BH3-only белки	92
3.4.1. Первичная структура и основные сведения о белках семейства BH3-only	94
3.4.1.1. Белки Bid и tBid	94
3.4.1.2. Белок Bim	96
3.4.2. Белок Puma	100
3.4.3. Белок Noxa	102
3.4.4. BH3-only белки — инструмент для тонкого контроля апоптоза. Формы регуляции BH3-only белков	104
3.4.5. 3D-структура белков BH3-only	105
3.4.5.1. Белок Bid	105

3.4.6. Гипотезы взаимодействия между белками Вах/Вак, белками ВНЗ-only и антиапоптотическими белками семейства Вcl-2	107
3.4.7. Роль ВНЗ-only белков в иммунной системе	110
Глава 4. Взаимодействия белок—белок при апоптозе	112
4.1. Физические принципы белок—белковых взаимодействий	112
4.2. Гомодимеризация и гетеродимеризации белков семейства Вcl-2..	114
4.2.1. Гомодимеры белков семейства Вcl-2.....	115
4.2.1.1. Димеризация белка Вcl-x _L . «Обмен доменов».....	115
4.2.1.2. Zn-опосредованная димеризация Вак.....	115
4.3. Взаимодействие между антиапоптотическими белками и Вах-подобными проапоптотическими белками.....	116
4.3.1. Комплекс Вcl-x _L /пептид из Вак.....	116
4.4. Взаимодействие между антиапоптотическими белками и ВНЗ-only белками.....	118
4.4.1. Комплекс Вcl-x _L с фрагментом из Вад.....	119
4.4.2. Комплекс Вcl-x _L с фрагментом из Вим.....	122
4.4.3. Комплекс Вcl-w с фрагментом из Вid.....	122
4.4.4. Комплекс MCL-1 с ВНЗ-фрагментами Вим и Ноха.....	123
4.5. Взаимодействие между проапоптотическими Вах-подобными белками и ВНЗ-only белками.....	124
4.5.1. Взаимодействие ВНЗ-пептида из Вим с Вах.....	124
Глава 5. Пермеабилзация наружной мембраны митохондрий	126
5.1. Взаимодействие мембран с белками	126
5.1.1. Энергетика связывания белков с мембраной	127
5.1.2. Структура липидного бислоя и мембранные предпочтения аминокислот	129
5.1.3. Частичное проникновение белков в мембрану. Белки, содержащие С-концевой гидрофобный якорь	133
5.1.4. Рецепторный импорт белков в митохондрии. Рецепторный комплекс ТОМ	135
5.1.5. Кинетика безрецепторных взаимодействий белок—мембрана.....	140
5.1.6. Влияние химического состава клеточных мембран на взаимодействие белок—липид. Корреляция между связыванием белков с мембранами <i>in vitro</i> и клеточными мембранами.....	141
5.1.7. Механизмы запуска ассоциации периферических белков с мембранами	143
5.1.7.1. Электростатическое включение	143
5.1.7.2. Конформационное включение	144
5.1.8. Структурные особенности интегральных мембранных белков.....	145
5.2. Молекулярные механизмы пермеабилзации НММ.....	147
5.2.1. Прямая активационная модель.....	148
5.2.2. Модель смещения	150

Глава 6. Каспазы — исполнители апоптоза	151
6.1. Каспазы: общие сведения.....	151
6.1.1. Каспазы-активаторы цитокинов.....	154
6.1.2. Каспазы-инициаторы апоптоза.....	154
6.1.3. Каспазы-эффекторы апоптоза.....	155
6.2. Структура и механизмы функционирования каспаз.....	155
6.2.1. Эффекторные каспазы	156
6.2.2. Инициаторные каспазы	158
6.2.2.1. Активирование каспазы-2. PIDDосома.....	159
6.2.2.2. Активирование каспазы-8. Комплекс DISC.....	162
6.2.2.3. Активирование каспазы-9. Апоптосома.....	163
6.3. Структурные механизмы ингибирования каспаз белками семейства ИАП	168
6.3.1. Эффекторные каспазы	169
6.3.2. Инициаторные каспазы	171
 Глава 7. Апоптоз и рак	 173
7.1. Основные положения молекулярной биологии рака.....	174
7.1.1. Рак и внутриклеточная сигнализация.....	174
7.1.2. Регуляция деления клеток и роста	175
7.1.2.1. Сигнальный путь рецепторных тирозиновых киназ ...	175
7.1.2.1.1. Рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR) ..	175
7.1.2.1.2. Ras/MAPK-зависимый сигнальный путь	180
7.1.2.1.3. Akt/PKB и mTOR	186
7.1.3. Протеасома.....	193
7.1.4. Ангиогенез. Ангиогенные факторы VEGF	194
7.2. Рак и ингибирование апоптоза.....	200
7.2.1. Инактивация p53.....	200
7.3. Белки-ингибиторы апоптоза и паракаспазы.....	206
7.4. Корреляция между экспрессией анти- и проапоптотических белков и раком.....	207
7.5. Терапевтический индекс и апоптоз нормальных клеток	208
7.6. Новое понимание старых методов лечения рака.....	209
7.7. Лиганды рецепторов смерти, как противоопухолевые препараты.....	210
7.7.1. Лиганды ФНО (TNF).....	210
7.7.2. Лиганды TRAIL	210
7.8. Антагонисты Bcl-2, как лекарственные препараты.....	211
7.9. Ингибиторы XIAP, как лекарственные препараты	213
7.10. Антагонисты MDM2, как лекарственные препараты	215
7.11. Другие противоопухолевые стратегии.....	216
 Глава 8. Апоптоз и нейродегенеративные расстройства.....	 218
8.1. Естественная смерть нейронов. Апоптоз в процессах развития..	219
8.1.1. Апоптоз постмитотических нейронов.....	220
8.1.2. Специфические сигнальные пути нейронального апоптоза ...	221

8.2. Патофизиологическая смерть нейронов. Дефекты апоптоза и нейродегенеративные расстройства	230
8.2.1. Болезнь Альцгеймера	230
8.2.1.1. БА и образование β -амилоидов	231
8.2.1.2. БА и окислительный стресс	234
8.2.1.3. БА и нарушенный гомеостаз Ca^{2+}	235
8.2.1.3.1. Кальпаины	237
8.2.1.4. Терапевтические подходы к лечению БА	240
8.2.2. Болезнь Паркинсона	240
8.2.2.1. α -синуклеин	241
8.2.2.2. α -синуклеин и апоптоз нейронов	244
8.2.3. Боковой (латеральный) амиотрофический склероз	245
8.2.3.1. Генетика БАС	245
8.2.3.2. Мутации SOD1	246
8.2.4. Болезнь Хантингтона	247
8.2.4.1. Структура N-концевого домена хантингтина	249
8.2.4.2. Гибель нейронов при БХ	250

Глава 9. Структурно-обоснованное конструирование лекарственных препаратов

9.1. Краткая история создания лекарственных препаратов и их нерациональное конструирование	251
9.2. Современные принципы конструирования лекарственных препаратов	253
9.2.1. Рациональное и структурно-обоснованное конструирование лекарственных препаратов	253
9.2.1.1. QSAR	253
9.2.1.2. Использование структуры белков при конструировании лекарственных препаратов	254
9.2.1.2.1. Моделирование структуры белков	256
9.2.1.2.2. Методы предсказания структуры белков	260
9.2.1.2.2.1. Анализ первичной структуры белков	260
9.2.1.2.2.2. Поиск гомологий в базах данных	260
9.2.1.2.2.3. Идентификация белковых доменов	264
9.2.1.2.2.4. Предсказание неупорядоченных областей	265
9.2.1.2.2.5. Предсказание вторичных структур	266
9.2.1.2.2.6. Гомологическое моделирование	268
9.2.1.2.2.7. Подходы, основанные на распознавании топологий. Методы «протягивания»	270
9.2.1.2.2.8. Моделирование белков <i>ab initio</i>	272
9.2.1.2.3. Компьютерные методы анализа межбелковых взаимодействий	277
9.2.1.2.3.1. Компьютерное докирование	277
9.2.2. Структурно-обоснованная идентификация лекарственных мишеней	279
9.2.3. Использование структурной информации для разработки лекарственных препаратов и виртуальный скрининг	280

9.3. ВНЗ-миметики.....	283
9.4. Нейтрализация проапоптотических белков семейства Bcl-2...	288
Заключение.....	291
Литература	294
Список сокращений и краткий глоссарий	374
Предметный указатель.....	384