

ЭНДОНУКЛЕАЗЫ И АПОПТОЗ У ЖИВОТНЫХ

©2012 г.

Н. И. АЛЕКСАНДРУШКИНА,
Б. Ф. ВАНЮШИН

*Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, Москва*

I. Введение. II. Крупнощепящие эндонуклеазы. III. Главная апоптозная эндонуклеаза CAD и ее ингибитор ICAD. IV. Эндонуклеаза G – вторая основная апоптозная ДНК-аза. V. Нуклеазы семейства ДНК-азы I. VI. Нуклеазы семейства ДНК-азы II. VII. Другие апоптозные нуклеазы. VIII. Нуклеазы аутофагии и некроптоза. IX. Сопряженность действия эндонуклеаз. X. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Ферменты гидролиза нуклеиновых кислот – эндонуклеазы, играют важную роль в жизнедеятельности клетки и животного организма. Они участвуют во многих генетических процессах – репликации, репарации и рекомбинации, активно вовлечены в нуклеиновый обмен, осуществляя деградацию нуклеиновых кислот до низкомолекулярных фрагментов и мононуклеотидов, которые утилизируются для ресинтеза новых молекул нуклеиновых кислот. Многие эндонуклеазы индуцируются или активируются при запрограммированной гибели клеток (ЗГК). Обычно они обладают процессивным характером действия с расpadом хроматина путем гидролиза ДНК (сначала распад на крупные домены, затем межнуклесомная фрагментация ДНК и в конечном итоге гидролиз ДНК до низкомолекулярных утилизируемых фрагментов).

Принятые сокращения: CAD – ДНК-аза, активируемая каспазой; ICAD – ингибитор ДНК-азы, активируемой каспазой; DNA-ПК – ДНК-зависимая протеинкиназа; EndoG – эндонуклеаза G; GAAD – гранзин A-активируемая ДНК-аза; NLS – сайт ядерной локализации; ДЦР – двуцепочечные разрывы в ДНК, ЗГК – запрограммированная гибель клеток.

Адрес для корреспонденции: vanyush@belozersky.msu.ru

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 11-04-00026-а.

Запрограммированная гибель клеток – существенный и обязательный элемент развития животных. Нарушение и искажения апоптоза делает нормальное развитие организма невозможным или приводит к различным заболеваниям. В настоящее время различают три основных типа гибели и удаления нежелательной или поврежденной клетки: апоптоз, аутофагия и некроз [1]. Апоптоз сопровождается характерными изменениями в структуре и организации цитоплазмы, ядра, хроматина и ДНК. В апоптозных клетках прекращается синтез ядерной ДНК, конденсация и маргинация хроматина, межнуклеосомная фрагментация ДНК и сморщивание клеточной мембраны с последующим возникновением так называемых апоптозных телец, на которые распадается гибнущая клетка, эти тельца поглощаются макрофагами или другими клетками [2, 3]. Аутофагия – клеточная гибель, ассоциированная с аутофагосомами-аутолизосомами [4]. Некроз рассматривался как спонтанная форма клеточной гибели, которая часто является следствием непреодолимого стресса и характеризуется набуханием клетки, лизисом клеточных органелл и самой клетки. В настоящее время доказано существование запрограммированного некроза, получившего название некроптоз [5–7].

Молекулярные механизмы апоптоза изучены к настоящему времени достаточно подробно, тогда как механизмы некроза и аутофаговой клеточной гибели менее понятны. Конкретная программа развития организма, особенности клеточной физиологии или сложившиеся в данный момент условия окружающей среды предполагают необходимость и возможность взаимодействия всех этих трех форм клеточной гибели.

Включение программы апоптоза может определяться как внешними сигналами, взаимодействие которых со специфическими рецепторами на клеточной поверхности (Fas) вызывает активацию каспазы 8 или 10 [8], так и внутренними стимулами – выходом из митохондрий цитохрома *c* и связанной с этим активацией каспазы-9. Индукция клеточного суицида может происходить и без участия каспаз – появилось представление о каспазо-независимой клеточной смерти, а исследования характера деградации специализированных клеток показали, что существуют и иные пути клеточной гибели, которые морфологически сходны с апоптозом, но отличаются от него сигнальными путями и конкретными эффекторами (в частности это наблюдается при элиминации эпителиальных клеток, кератинизации кератиноцитов, гибели нервных клеток, клеточном каннибализме при энтозисе) [1].

Об индукторах, сигнальных путях и механизмах инициации и протекания апоптоза накопилось уже довольно много данных [9]; гораздо менее развиты наши представления о завершающих этапах апоптоза, последствия и уникальная функциональная роль которых для организма до сих пор явно недооценивались.

Казалось бы – это все, что можно ожидать в результате завершения апоптоза клетки. Однако, начатый апоптоз должен быть обязательно «правильно» доведен до конца не только с видимой элиминацией клетки и отдельных ее элементов, но и с полным удалением ее генетической информации – ДНК.

Именно деструкция ДНК является одним из обязательных завершающих этапов ЗГК: она служит критичной для умирающей клетки точкой невозврата, а наблюдаемая при этом межнуклеосомная фрагментация ДНК – общепризнанным молекулярным маркером апоптоза. Такая деструкция ДНК – необходимое и обязательное условие сохранения гомеостаза организма в целом [10]: присутствие негидролизованной ДНК во внеклеточном пространстве вызывает активацию естественного иммунитета и в дальнейшем может привести к возникновению аутоиммунных заболеваний.

Известно, что в деградации ДНК при ЗГК участвуют многие нуклеазы, относящиеся к различным семействам. Эти ферменты могут быть разделены на две группы – автономные клеточные ДНК-азы, которые гидролизуют ДНК внутри гибнущей клетки и «нуклеазы-мусорщики», гидролизующие ДНК в фагоцитах и во внеклеточном пространстве [11]. В зависимости от типа клеток, стадии их дифференцировки и/или внешних стимулов функционируют те или иные нуклеазы или наборы нуклеаз, однако, природа, свойства, механизмы и регуляция действия соответствующих эндонуклеаз в каждом конкретном случае все еще мало изучены [12].

II. КРУПНОЩЕПЯЩИЕ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ

Распад ДНК в апоптозных клетках начинается с расщепления ДНК на протяженные фрагменты длиной 50–300 т.п.н. по АТ-обогащенным сайтам (домены петель) в районах прикрепления ДНК к ядерной мембране, следствием чего является наблюдаемая конденсация хроматина [13, 14]. Такие нуклеазы, осуществляющие расщепление ДНК на высокомолекулярные фрагменты, называют «доменными нуклеазами» [15]. На роль «доменных нуклеаз» предлагались ДНК-аза I [16], ДНК-аза II [17], циклофиллины [18] и ДНК-аза γ [19], однако, ни одна из них полностью не соответствовала критериям собственно

апоптозных нуклаз. Так, например, ДНК-аза I, будучи секретлируемым белком, экспрессируется органоспецифично (почки, поджелудочная железа, семенная плазма). ДНК-аза II локализована в лизосомах, но первичная апоптозная деструкция ДНК происходит в условиях целостности лизосом и, скорее всего, этот фермент гидролизует фрагментированную ДНК в фагоцитах.

К настоящему времени идентифицирована единственная активируемая при апоптозе «крупнощепляющая» эндонуклеаза – гранзин А-активируемая ДНК-аза (GAAD) или NM23-H1 [20]. Она присутствует в клетке в латентном состоянии и входит в состав «SET комплекса», ассоциированного с эндоплазматическим ретикулулом. Под действием гранзинов А или К происходит расщепление белка SET и транслокация активированной эндонуклеазы NM23-H1 в ядро, где она вызывает односторонние разрывы в цепях яДНК, что приводит к появлению мультикилобазных фрагментов [20, 21].

Нуклеаза LDFF, специфичная для первого этапа деградации ДНК при индукции апоптоза экзогенным цитохромом *c*, выявлена в экстрактах из яйцеклеток морского ежа. LDFF расщепляет ДНК на фрагменты длиной около 50 т.п.н. По биохимическим свойствам LDFF сходна с ДНК-азой II, кислой лизосомальной нуклеазой: она не чувствительна к специфическому ингибитору CAD, зависит от ионов Mg^{2+} (но не Ca^{2+}), стабильна при 45°C и pH 5,0. Кроме того, LDFF активируется каспазой-3 [22].

При индукции апоптоза агентами, вызывающими двуцепочечные разрывы (ДЦР) в ДНК, в том числе этопозидом и стаурополином, происходит быстрая мобилизация в зоны ДЦР белков, участвующих в репарации по типу соединения негомологичных концов. В зависимости от степени повреждения (дозы агента) решается судьба клетки – репарация ДНК или апоптоз. Наряду с ДНК-зависимой протеинкиназой (DNA-PK) в состав репаративного комплекса входят и мультифункциональные ферменты, кодируемые семейством SNM1 генов (KU70/80, SNM1A, SNM1B/Apollo и Artemis), которые обладают нуклеазной активностью. Гипотеза о возможном участии нуклеазы Artemis (5'–3' экзонуклеаза) в этом процессе, нашла подтверждение. Согласно предложенной схеме [23], DNA-PK, которая регулирует доступность ДНК для процессирующих ферментов, дислоцируется к ДЦР, которые инициируются в районах прикрепления ДНК к матриксу (возможно, что минорная фракция DNA-PK пула постоянно присутствует в этих зонах), связывается с ДНК и фосфорилирует гистоны H2AX вокруг ДЦР. Это приводит к активации эндонуклеазной активности Artemis, связанной с каталитической

единицей DNA-ПК. Кроме того, в районах прикрепления скэффолда к матриксу ДЦР вызывают негативное «закручивающее» напряжение, инициирующее одноцепочечные разрывы, следствием чего является формирование вторичных структур ДНК – шпилек и стеблевых петель – субстратов, предпочтительных для Artemis. Таким образом, DNA-ПК-зависимая активация Artemis может ускорять район-специфическое расщепление ДНК на фрагменты длиной 50–300 т.п.н. Недавно было продемонстрировано независимое участие ферментов SNM1A, SNM1B/Apollo и Artemis в апоптозе, инициированном этопозицидом [24]. Тот факт, что Artemis вносит свой вклад во фрагментацию ДНК на ранних стадиях апоптоза, когда еще возможна его реверсия, с большой вероятностью дает основание предположить, что Artemis принимает участие в сайт-специфическом расщеплении хромосомы на ранних стадиях апоптоза, вызванного и другими агентами (факторами).

В роли возможного медиатора «доменных нуклеаз» может выступать индуцирующий апоптоз AIF фактор, который представляет собой флавопротеин, локализованный в межмембранном пространстве митохондрий. Индукция апоптоза агентами, вызывающими нарушение трансмембранного потенциала митохондрий, приводит к нарушению проницаемости наружной мембраны и высвобождению AIF с последующей его транслокацией в ядро [25, 26]. Причем апоптогенные свойства AIF определяются его ДНК-связывающей способностью, но не его оксидоредуктазной активностью [27].

Следует отметить, что в нейронах под действием определенных индукторов апоптоза деградация ДНК ограничивается расщеплением на высокомолекулярные фрагменты, а последующего гидролиза на олигосомальные фрагменты не наблюдается [28, 29]. Были высказаны предположения об участии в этом сценарии апоптозной деградации ДНК топоизомеразы II альфа [30]. В дальнейшем было показано, что в отличие от апоптоза, ассоциированного с межнуклеосомной деградацией ДНК, апоптозный путь, связанный с эксцизией доменов петель хроматина, не зависит от каспаз и его участниками являются относящаяся к MAPK семейству протеинкиназа p38/JNK, некоторые апоптозные факторы митохондрий и топоизомераза II. Этот апоптозный путь действует независимо или параллельно с каспазо-зависимым путем. Так, каспазо-независимая эксцизия доменов петель хроматина является основным механизмом дезинтеграции ДНК в нейробластах, обработанных стауроспорином, тогда как в промиелоцитах этот индуктор апоптоза вызывает и межнуклеосомную (олигосомальную) фрагментацию ДНК [31].

III. ГЛАВНАЯ АПОПТОЗНАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА CAD И ЕЕ ИНГИБИТОР ICAD

Выделение и характеристика апоптозных нуклеаз стали возможны после появления *in vitro* индуцируемых систем апоптоза, и первой была выделена ДНК-аза, фактор фрагментации ДНК (DFF) [32] или активируемая каспазой (CAD)[33], которую нередко называют «профессиональной апоптозной нуклеазой» [34]. CAD принадлежит к суперсемейству $\beta\alpha$ -Me нуклеаз, является Mg^{2+} -зависимой эндонуклеазой и строго специфична к двуцепочечным ДНК. Установлено, что ни одноцепочечные ДНК, ни одно- и двуцепочечные РНК, ни РНК–ДНК гетеродуплексы не гидролизуются CAD. Заслуживает внимания тот факт, что все типы олигонуклеотидов, которые не гидролизуются CAD, ингибируют расщепление двуцепочечной ДНК [35]. CAD расщепляет ДНК с образованием 5'-P и 3'-ОН групп, причем гидролизуются сразу обе цепи. Кроме того, CAD проявляет исключительное предпочтение к межнуклеосомным линкерным районам хроматина, что в частности определяется структурой активного сайта нуклеазы, напоминающего ножницы [36]. Данная конформация фермента исключает расщепление ДНК, входящей в состав нуклеосом, вследствие чего расщепление цепей ДНК идет по межнуклеосомным областям, и это приводит к появлению фрагментов кратных по длине ~ 180 п.н. (размер участка ДНК на нуклеосоме).

В неапоптозных клетках CAD (40 кДа пептид) ко-экспрессируется со своим шапероном-ингибитором – ICAD. Сразу после их синтеза образуется гетеродимер CAD/ICAD. Каждая субъединица обладает своим сайтом ядерной локализации (NLS), но самостоятельно CAD не может проникнуть в ядро, поскольку экспозиция NLS возможна только после изменения конформации пептида, происходящего при образовании комплекса с ICAD [37]. Ещё недавно полагали, что комплекс CAD/ICAD локализован в цитоплазме [38, 39], однако, позднее было четко установлено, что этот комплекс локализован в ядре [40]. Мнение о том, что CAD связывается с хроматином лишь после индукции апоптоза, было опровергнуто: комплекс CAD/ICAD связан с хроматином в неапоптозных клетках, и активация CAD происходит в связанном с хроматином состоянии [41, 42]. В экспериментах *in vivo* на культуре клеток человека [43] и *in vitro* с рекомбинантным комплексом CAD/ICAD было показано, что апоптозная активация каспазы 3 приводит к протеолизу ICAD по двум специфическим сайтам (остаткам аспаргата D117 и D224) и высвобождению активной эндонуклеазы CAD. Каспаза 7 также может гидролизовать ICAD, но с меньшей эффективностью, чем

каспаза 3 [44, 45]. После диссоциации комплекса CAD/ICAD нуклеаза CAD претерпевает конформационные изменения и образует гомоолигомеры, являющиеся энзиматически активной формой CAD, стабилизация которых зависит и от присутствия следовых количеств цинка [43, 46, 47].

Главными модуляторами активности CAD являются каспаза 3 и ингибитор ICAD, который выполняет двойную функцию, являясь одновременно и молекулярным шапероном, обеспечивающим правильное сворачивание молекулы CAD непосредственно на рибосоме [48]. В клетках обнаружены две изоформы ICAD: длинная ICAD-L (45 кДа пептид) и короткая ICAD-S (35 кДа пептид), причем для регуляции активности CAD существенна ICAD-L [49]. ICAD-S появляется в результате альтернативного сплайсинга и лишена С-концевого NLS, следствием чего является локализация этой изоформы в цитоплазме [46]. ICAD-S не может выполнять функцию шаперона для сворачивания CAD: при экспрессии ICAD-S в ICAD (-/-) эмбриональных фибробластах мыши активная CAD не образуется [50, 51]. В то же время, ICAD-S *in vitro* может ингибировать CAD [52], а в нейронах мыши ICAD-S препятствует активации CAD [53]. *In vivo* в DT40 клетках ICAD-S, устойчивый к каспазе 3 за счет замены сайтов расщепления для каспазы 3 на сайты, чувствительные к TEV протеазе, подавляет активность CAD после ее высвобождения из комплекса CAD/ICAD-L при индукции апоптоза [51]. В ядре неапоптозных клеток обнаружено незначительное количество свободных молекул ICAD-L, которые вместе с цитоплазматической изоформой ICAD-S могут входить в систему, обеспечивающую защиту клетки от активированных молекул CAD. Появление этих в неапоптозных клетках возможно при случайной и/или кратковременной активации каспаз 3 или 7, редких спонтанных изменениях конформации CAD с образованием ауто-каталитической формы или в результате возможной крайне редкой диссоциации комплекса CAD/ICAD [54].

Кроме того, идентифицирован еще ряд белков, которые принимают участие в регуляции активности CAD [55]. Они могут быть разделены на 3 функциональные группы – факторы, контролирующие правильность сворачивания (фолдинга) белка и клеточной локализации, активаторы нуклеазы и ее ингибиторы. Во время трансляции правильность сборки гетеродимера CAD/ICAD контролируют шапероны HSC70 и HSP40, а доставка комплекса в ядро зависит от связывания с импортином α/β гетеродимером [37].

Расщепление ДНК эндонуклеазой CAD стимулируют белки хроматина – гистоны H1, HMGB1/2 и топоизомераза II, причем гистоны

H1 и топоизомераза II непосредственно взаимодействуют с CAD, тогда как HMGB1/2 влияет на активность CAD опосредованно, обеспечивая доступность субстрата [56–58]. Установлено, что CAD связывается со всеми исследованными подтипами гистона H1 (H1.1, H1.3, H1.5 и H1.0), однако, взаимодействие с тем или иным специфическим подтипом гистона H1 зависит от характера индуктора апоптоза [59]. Гистоны H1 и топоизомераза II, скорее всего, вносят свой вклад и в специфичность действия CAD: гистоны определяют межнуклеосомную фрагментацию ДНК и формирование характерной «лестницы» фрагментов ДНК длиной, кратной 180 п.н., а топоизомераза II стимулирует гидролиз петлевых доменов хроматина на ранних стадиях его энзиматической деградации. Также отмечается необходимость фосфорилирования гистона H2A.X для успешного расщепления хроматина CAD. Ингибиторами CAD являются некоторые ядерные белки: комплекс нуклеофосмин/B23 с фосфатидилинозитол-3-киназой, комплекс Ebr с АКТ, СИА [60, 51].

Использование ди- и тригибридных дрожжевых систем для скрининга библиотек кДНК клеток HeLa и тканей мозга человека позволили обнаружить ряд новых регуляторов активности CAD. Один из них, GFAR, связывается с ICAD и препятствует расщеплению каспазой 3; другой предполагаемый регулятор, DRIG, взаимодействует с гетеродимером CAD/ICAD, а его антисмысловая РНК влияет на гидролиз ICAD и расщепление хроматина в апоптотических клетках HeLa [61]. Кроме того, активность CAD подавляют гепарин, некоторые полианионы и поли(АДФ-рибозо)полимераза [62]. Установлено, что трансмембранный белок CD45 и его субстраты, обеспечивают удержание CAD в ядре апоптотических клеток [63].

По характеру расщепления ДНК эндонуклеаза CAD близка микрокковой нуклеазе, которая уже давно используется для анализа структуры хроматина. Однако, в отличие от этой нуклеазы, CAD не расщепляет ДНК внутри нуклеосом с образованием субнуклеосомных фрагментов, она более специфична к линкерным участкам между нуклеосомами, лишена экзонуклеазной активности, специфична к двуцепочечной ДНК, а хроматин, содержащий гистон H1, она гидролизует более эффективно [62]. Все это позволяет рассматривать CAD как потенциальный инструмент для изучения структуры хроматина. Клонирование и секвенирование кДНК CAD и кДНК ICAD, а также создание рекомбинантных векторов для коэкспрессии этих белков в *Escherichia coli* делают возможным коммерциализацию этого предложения [64].

В последние годы появились сведения об участии CAD в процессах, связанных с иными жизненно важными функциями организма, в том числе с клеточной дифференцировкой. Установлено, что на ранних стадиях дифференцировки скелетных мышц CAD, активированная каспазой 3, вызывает появление коротко живущих разрывов в ДНК по всему геному. Инактивация CAD приводила к почти полной остановке дифференцировки. Разрывы в цепях ДНК были также детектированы в промоторе регуляторного фактора клеточного цикла p21, и их появление связывают с индукцией экспрессии гена p21 [65]. Секвенирование фрагментов ДНК, образовавшихся в обработанных актиномицином D лейкемических клетках HL-60 (метод Aroptoseq) позволило составить глобальную карту инициированных CAD апоптозных разрывов в ДНК [66]. Установлено, что распределение сайтов гидролиза ДНК при апоптозе носит неслучайный характер и ассоциировано с активными генами и открытыми районами хроматина, причем значительная доля разрывов приходится на сайты связывания факторов транскрипции. Оказалось, что экстенсивному апоптозному расщеплению подвержены гены, которые с повышенной частотой транслоцируются при канцерогенезе человека. Полагают, что неслучайная фрагментация ДНК при апоптозе может вносить определенный вклад в транслокацию генов и развитие раковых заболеваний [66].

IV. ЭНДОНУКЛЕАЗА G – ВТОРАЯ ОСНОВНАЯ АПОПТОЗНАЯ ДНК-АЗА

При инактивации CAD/ICAD в зависимости от условий индукции апоптоза ядерная ДНК внутри апоптозных клеток либо оставалась нефрагментированной внутри апоптозной клетки и ее деградация происходила в фагоцитах [67], либо наблюдалась межнуклеосомная фрагментация ДНК. В результате этих исследований в клетках HeLa была обнаружена вторая основная апоптозная ДНК-аза – эндонуклеаза G (EndoG) [68], которая исходно была идентифицирована в нормальных неапоптозных клетках как ядерный белок [69–71].

Функционирование этой нуклеазы связывают с каспазо-независимым апоптозом [72, 73], индуцированным окислительным стрессом [74], гипоксией [75] и ишемией [76].

Гомологи EndoG описаны у бактерий (NucA), в том числе у *Anabaena*, *Serratia*, дрожжей (Nuc1p) [77–79], лейшманий [80], беспозвоночных (нематода *Caenorhabditis elegans*) (CPS-6) [81], гриба *Aspergillus nidulans* (NucA) [82] и у растений [83]. В клетках

животных обнаружен паралог EndoG – EXOG, появление которого связывают с дубликацией общего прародительского гена [84]. Все эти ферменты отнесены к подсемейству EndoG внутри суперсемейства $\beta\beta\alpha$ -Me ДНК/РНК неспецифических нуклеаз [36]. Исследование кристаллической структуры рекомбинантной EndoG мыши (с разрешением 2,8 Å), для кристаллизации которой оказался важен остаток Cys 110 [85], и CPS-6 (разрешение 1,8 Å), наглядно продемонстрировало смешанную $\alpha\beta$ топологию с двумя $\beta\beta\alpha$ -металл-содержащими нуклеазными мотивами, локализованными дистально с двух сторон димерного фермента [86].

EndoG и ее гомологи у эукариот локализованы в межмембранном пространстве митохондрий. Эти нуклеазы синтезируются в протоплазме в виде 33 кДа пропептида, содержащего митохондриальную сигнальную N-концевую последовательность; в ходе транслокации в митохондрии происходит процессинг белка с образованием 28 кДа зрелой формы нуклеазы. Высвобождение EndoG из митохондрий и последующая транспортировка ее в ядро связаны с повреждениями наружной митохондриальной мембраны.

Наиболее детально охарактеризована эндонуклеаза EndoG человека. Фермент представляет собой гомодимер, не обладающий специфичностью по отношению к углеводному компоненту нуклеиновых кислот – он способен расщеплять РНК, а также дву- и одноцепочечные ДНК. Подобно CAD, эта эндонуклеаза активна при нейтральных значениях pH, ее активность зависит от ионов Mg^{2+} , стимулируется Mn^{2+} , и ингибируется миллимолярными концентрациями Zn^{2+} . При гидролизе двуцепочечных ДНК у фермента наблюдаются два оптимума pH – 9,0 и 7,0. EndoG, как и CAD, расщепляет субстраты с образованием олигонуклеотидов с 5'-P и 3'-ОН концевыми группами, которые является субстратом для терминальной дезоксирибонуклеотидтрансферазы (основа метода TUNEL). В отличие от CAD, под действием EndoG образуются как дву-, так и одноцепочечные разрывы [87, 62]. Активность фермента относительно низка при физиологических значениях ионной силы, она значительно выше при гидролизе одноцепочечной, чем двуцепочечной ДНК. В двуцепочечных ДНК EndoG с наибольшей частотой расщепляет участки $(dG)_n \cdot (dC)_n$, а в одноцепочечных – $(dC)_n$ [69], по которым преимущественно осуществляются разрывы в S участках ДНК (районы рекомбинации ДНК при переключении классов Ig) и V(D)J районах ДНК (области соматических гипермутаций). В этих ГЦ-богатых районах ДНК формируются R-, G-петли, структуры стебель-петля, к которым EndoG проявляет выраженное предпочтение. Это позволяет

говорить о ферменте как о структуро-специфичной нуклеазе [88]. У «голой» ДНК EndoG предпочтительно отщепляет 5'-концевой G. Замещение консервативных остатков гистидина, аспарагина и аргинина аланином позволило установить, что для катализа и субстратной специфичности EndoG существенны His-141, Asn-163 и Asn-172 в мотиве H-N-N и локализованный в С-концевой части Asn-251, также существенен для связывания иона металла остаток Glu-271 [89].

По своим биохимическим свойствам рекомбинантные EndoG, EXOG, Nuc1p и CPS-6 близки между собой. За исключением CPS-6, для этих нуклеаз характерен широкий интервал оптимальных концентраций Mg^{2+} (0,2–5,0 мМ). При физиологических концентрациях ионов магния (0,8–1,0 мМ) все ферменты способны катализировать расщепление фосфодиэфирной связи с активностью, близкой к максимальной. EXOG – единственный фермент, который проявляет заметную активность в присутствии Ca^{2+} (1,0 мМ). Несмотря на сходную структуру активного центра, свойственную нуклеазам суперсемейства $\beta\alpha$ -Me, афинность рассматриваемых нуклеаз к индивидуальным ионам металлов различна, и все эти нуклеазы не нуждаются в одновалентных катионах для максимальной активности. При физиологических концентрациях соли (100–150 мМ NaCl) все ферменты демонстрируют до 50% своей индивидуальной максимальной активности. Контакт с субстратом у этих нуклеаз происходит в основном путем электростатического взаимодействия с фосфодиэфирным скелетом субстрата. При слабощелочных рН все эти ферменты расщепляют одноцепочечные, но не двуцепочечные ДНК [90].

Сравнительный анализ рекомбинантных митохондриальных эндо/экзонуклеаз подсемейства EndoG выявил отличия в их способности процессировать различные субстраты ДНК эндо- и экзонуклеолитически: подтверждено наличие единственной эндонуклеазной активности у EndoG млекопитающих, а у ее гомологов присутствует и экзонуклеазная активность [90].

При обработке ядер клеток HeLa рекомбинантной EndoG и разделении продуктов гидролиза электрофорезом в пульсирующем поле или двумерным электрофорезом было установлено, что в самом начале гидролиза наблюдается картина, соответствующая первому этапу деградации ДНК в апоптотной клетке – ДНК гидролизуется на протяженные фрагменты длиной около 50 т.п.н. По-видимому, атаке фермента, прежде всего, подвергаются гиперчувствительные сайты на границе раздела доменов хроматина. Дальнейший гидролиз идет по ДНК линкерам с образованием однонитчатых разрывов [87], а появление характерной «лестницы» олигонуклеосомных фрагментов

ДНК и их более глубокого гидролиза является результатом совместного действия EndoG с другими нуклеазами.

До недавнего времени оставался открытым вопрос о том, как EndoG связывается и гидролизует ДНК. На примере фермента CPS-6 из нематоды *C. elegans* показано, что CPS-6 предпочтительно связывается с G-бороздкой ДНК в низкосолевого буфера при pH 7,0. Структурная модель CPS-6–ДНК комплекса предполагает наличие положительно заряженной ДНК-связывающей «бороздки» рядом с Mg²⁺-связывающим активным сайтом. Мутации по остаткам Phe(122), Arg(146), Arg(156) и Phe(166) заметно снижали связывание и нуклеазную активность CPS-6, то есть эти аминокислотные остатки критичны для взаимодействия фермента с ДНК [86].

Эффекторы, участвующие в функционировании EndoG гомологов, изучены довольно слабо. В роли основного эффектора EndoG выступает фактор индукции апоптоза – AIF. Этот белок транслоцируется в ядро клетки после высвобождения из митохондрий, что инициирует начальную стадию конденсации хроматина, связанную с расщеплением ДНК на фрагменты большой длины [91]. Родственный AIF белок WAH-1 у *C. elegans* взаимодействовал и активировал гомолог EndoG – CPS-6 [92]. Позднее было продемонстрировано образование комплексов EndoG с AIF и эндонуклеазой FEN1 [93]. А ранее было установлено, что гидролиз ядерной ДНК может происходить в результате совместного действия EndoG, экзонуклеазы EcoIII и ДНК-азы I при наличии специфических эффекторов [87]. С помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии выявлено взаимодействие EndoG с гистоном H2B и ДНК-топоизомеразой альфа во время апоптозной гибели клеток; построены соответствующие математические модели. Полагают, что EndoG и ДНК-топоизомераза альфа образуют деградационный комплекс, в состав которого также входят AIF и циклофиллин А [94].

Сходные по свойствам с EndoG эндонуклеазы участвуют в апоптозе у растений [95–97]. Их действие модулируется гистонами (гистон H1) [98], а также короткими биологически активными пептидами [99]. Эти Ca²⁺/Mg²⁺-зависимые растительные эндонуклеазы обладают выраженным процессивным действием, на ранних этапах гидролиза ДНК они обладают выраженной сайтовой специфичностью [100], чувствительны к статусу метилирования ДНК и по-разному (разнонаправленно) контролируются S-аденозилметионином (SAM) [101, 102].

Полученные данные позволяют говорить об открытии нового механизма регуляции активности эукариотических эндонуклеаз. В известной мере все это роднит их с типичными бактериальными

рестрикционными эндонуклеазами и указывает на то, что у высших эукариот (растения) могут существовать, по крайней мере, элементы системы (R–M) хозяйской рестрикции-модификации генома. До сих пор не ясно, могут ли животные эндонуклеазы по аналогии с описанными растительными в принципе обладать выраженным сайт-специфическим действием, модулироваться S-аденозилметионином и распознавать субстратные ДНК по статусу метилирования. По нашим предварительным сведениям (неопубликованные данные) действие EndoG из митохондрий печени кролика может модулироваться SAM.

Немного было известно и о механизме защиты собственной ДНК от EndoG в здоровых клетках при ее незначительной «утечке» из митохондрий. Казалось бы, что локализация EndoG в межмембранном пространстве митохондрий предполагает изоляцию нуклеазы и отсутствие необходимости в других механизмах защиты собственной как митохондриальной, так и ядерной ДНК. Однако, в клетках *Drosophila melanogaster* был обнаружен специфический ингибитор EndoG, EndoGI, который кодируется *cg4930* геном и имеется в ядре нормальных клеток в микромолярных концентрациях. EndoG и EndoGI образуют комплекс 2 : 1, в котором димер EndoG связан с двумя тандемно повторяющимися гомологичными доменами мономерного EndoGI. При индукции апоптоза содержание ингибитора EndoGI в ядре резко снижается и он выходит в цитоплазму. Показано, что *cg4930* мутанты характеризуются существенным снижением жизнеспособности [103]. Анализ трехмерной кристаллической структуры комплекса EndoG/EndoGI подтвердил механизм ингибирования нуклеазы – EndoGI блокирует активные сайты двух мономеров EndoG и связывающую нуклеотид бороздку. Структурно EndoGI отличается от ранее описанных ингибиторов нуклеаз и, возможно, в ходе эволюции он сформировался независимо от других прародительских бактериальных ингибиторов [104].

EndoG является наиболее функционально значимой и активной нуклеазой в митохондриях всех эукариот и одной из наиболее представленных нуклеаз в экстрактах из эукариотических клеток. EndoG экспрессируется у всех эукариот и ее ген в высокой степени консервативен у разных организмов – от дрожжей до приматов. Естественным было предположение об участии EndoG в других жизненно важных для клетки процессах. [72].

В функциональном отношении наиболее изученным представителем этих митохондриальных ферментов является Nuc1p из почкующихся дрожжей. Четко показано, что кроме летальной функции во время клеточной гибели нуклеаза Nuc1p также необходима для

нормальной клеточной пролиферации [78, 79]. Аналогичная функция была выявлена у гомолога CPS-6 из *C. elegans* [105, 106]. Бифункциональность этих ферментов может быть следствием наличия у них двух энзиматических активностей: эндонуклеазной активности по отношению к ДНК/РНК, и 5'-3' экзонуклеазной активности, которая позволяет им создавать одностранные бреши в двуцепочечной ДНК при рекомбинации или репарации [77].

Открытие паралога EndoG – новой EndoG-подобной митохондриальной эндо/эксонуклеазы «EXOG» у млекопитающих, позволило высказать предположение о возможном разделении витальных и летальных функций консервативных митохондриальных эндо/эксонуклеаз низших эукариот между энзиматическими активностями EndoG и EXOG у позвоночных [84].

Сообщение об участии EndoG в процессинге праймеров для репликации мтДНК [107] дальнейшего развития не получило. В то же время установлено, что отсутствие EndoG не сказывается на числе копий митохондриальной ДНК, ее структуре или скорости мутирования по крайней мере в течение первых 5 поколений EndoG (-/-) мышей [72]. Однако, недавно было показано существование связи EndoG с биогенезом митохондрий: при хронической экспрессии EndoG в НЕК клетках и суперэкспрессии в культуре кардиомиоцитов происходит увеличение митохондриальной массы. В ChIP-PCR экспериментах продемонстрировано взаимодействие EndoG с мтДНК, а ранее наблюдали связывание EndoG с митохондриальным фактором транскрипции TFAM [108], который весьма важен для синтеза и репарации мтДНК. Полагают, что EndoG модулирует синтез мтДНК, влияет на ее стабильность и/или транскрипцию [109]. В поддержку мнения о важной роли EndoG в биогенезе митохондрий свидетельствуют данные о связи EndoG с неадаптивной гипертрофией сердечной мышцы. Ингибирование EndoG в культуре кардиомиоцитов приводило к увеличению размеров клеток и появлению биомаркеров гипертрофии в отсутствие про-гипертрофических стимулов. Кардиомиоциты мышей с делецией EndoG содержали истощенные митохондрии с выраженной дисфункцией, вследствие чего наблюдалось повышение уровня содержания активных форм кислорода, что коррелировало с увеличением объема и стеатозом кардиомиоцитов. Кроме того, был обнаружен прямой контроль над EndoG со стороны главных регуляторов митохондриальной и сердечной функций – ERR- α и PGC1 α . Это определенно указывает на взаимосвязь между митохондриальной дисфункцией, реактивными формами кислорода, сердечными патологиями и эндонуклеазой EndoG [109].

Крайне интересна еще одна альтернативная функция EndoG. На мутантных EndoG (-/-) мышцах и EndoG (-/-) В клетках продемонстрирована заметная роль EndoG в образовании двуцепочечных разрывов в S районах ДНК в процессе рекомбинации ДНК при переключении классов Ig (CSR): у мутантов вдвое снижена активность CSR. Это выражается в уменьшении содержания поверхностных IgG1, IgG2a, IgG3 и IgA, секретируемого IgG1, кольцевых транскриптов I γ 3-С μ , I ϵ -С μ , I α -С μ , пост-рекомбинантных транскриптов I μ -С γ 1, I μ -С γ 3, I μ -С ϵ и I μ -С α . У мутантных мышей был также заметно изменен набор мутаций в IgH локусе. Дефицит фермента не отразился на пролиферации и прохождении индуцированного апоптоза в EndoG (-/-) В клетках [88].

V. НУКЛЕАЗЫ СЕМЕЙСТВА ДНК-азы I

Интерес к вопросу об участии Ca²⁺/Mg²⁺-зависимых эндонуклеаз, относящихся к семейству ДНК-аз I, в апоптозной деградации ДНК не ослабевает до настоящего времени и периодически приносит интересные результаты [110–113].

К этому семейству кроме самой ДНК-азы I, известной как секретируемая панкреатическая ДНК-аза, относятся и недавно выделенные три ДНК-аза I-подобные нуклеазы – DNase1L1–3 [114]. Родство этих нуклеаз основывается на сходстве структуры кодирующих их генов и предсказанных аминокислотных последовательностей их продуктов [115]. Все они содержат сигнальный гидрофобный пептид, и два существенных для катализа остатка His [116]. Первой была выделена DNase1L1 эндонуклеаза из мышц человека [117], затем была описана DNase1L2 [118], третьим наиболее близким к ДНК-азе I и хорошо изученным членом семейства ДНК-азы I стала DNase1L3, выделенная из ядер тимоцитов крысы [119, 120].

Для большинства нуклеаз семейства ДНК-аз I характерна синергическая активация ионами Ca²⁺ и Mg²⁺, pH оптимум близкий нейтральному, предпочтительное использование в качестве субстрата двуцепочечных ДНК, эндонуклеолитический механизм гидролиза ДНК с образованием 3'-P и 5'-ОН концов, ингибирование миллимолярными концентрациями ионов Zn²⁺ и хелаторами двухвалентных ионов. Однако эти ферменты обладают и некоторыми уникальными особенностями: они различаются по отношению к G-актину, ауринтрикарбоновым кислотам и ионам металлов (Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺), а DNase1L2 имеет оптимум pH в кислой области.

Эти нуклеазы различаются по экстра- и интраклеточной локализации: ДНК-аза I и DNase1L2 – секретируются, а DNase1L1 и DNase1L3 находятся внутри клетки, что обусловлено наличием С-концевых экстрадоменов, препятствующих секреции. Полагают, что исходно прародительские формы этой группы нуклеаз были секретируемыми белками, а С-концевые экстрадомены были приобретены в ходе эволюции.

Экспрессия генов этих нуклеаз имеет выраженную тканевую специфичность, что может указывать на уникальную физиологическую роль этих ферментов: наиболее часто они обнаруживаются при апоптозе, ассоциированном с клеточной дифференцировкой [116].

ДНК-аза I экспрессируется в селезенке и секретируется в кишечный тракт и кровь, где гидролизуемая ею ДНК является источником олигонуклеотидов. Кроме того, утилизация ДНК собственных разрушающихся клеток подавляет анти-ДНК аутоиммунность. Однако не исключают ее участия в деградации 50–300 т.п.н. фрагментов ДНК, образовавшихся под действием крупнощепящих эндонуклеаз на ранних стадиях апоптоза. Анализ субстратной специфичности рекомбинантной ДНК-азы I показал, что фермент эффективно расщепляет «голую» плазмидную ДНК, а также может расщеплять яДНК по межнуклеосомным линкерам, но в присутствии протеаз, гидролизующих белки хроматина. Удаление же сигнального пептида с N-конца приводит к ее накоплению в цитоплазме и ядре [111]

DNase1L1 функционирует в скелетной мускулатуре и миокарде, будучи встроена в наружную клеточную мембрану; она защищает клетку от проникновения чужеродного генетического материала [112].

DNase1L2 экспрессируется в мозге и клетках эпидермиса [113]. Установлено, что деградация ядерной ДНК при терминальной дифференцировке эпидермальных кератиноцитов осуществляется эндонуклеазой DNase1L2, а при нокауте экспрессии DNase1L2 siРНК этого не происходит и ядра сохраняются [113]. У трансгенных мышей с направленной делецией специфичной для кератиноцитов эндонуклеазы DNase1L2 отмечено повышенное содержание ДНК в клетках волос, когтей, эпителия языка и пищевода, а избыток ДНК в корнеоцитах волос снижал их механическую прочность. В отличие от кератиноцитов человека, в клетках эпителия мыши удаление DNase1L2 не влияет на состояние кератицированного слоя эпидермиса. Однако, основной функцией DNase1L2 все же является удаление чужеродной и экзогенной ДНК с поверхностных слоев кожи [121].

DNase1L3, чаще называемая ДНК-аза γ , экспрессируется в лимфоидных органах – селезенке, печени, тимусе, лимфатических узлах, в

В клетках зародышевого центра лимфатического узла, а также в тканях мозга, почках и тонком кишечнике [122]. ДНК-аза γ отличается от остальных членов семейства ДНК-аз I способностью расщеплять ДНК на олигонуклеосомные фрагменты при апоптозе [116, 123]. ДНК-аза гамма имеет молекулярную массу 32 кДа, рI 9,5 и рН оптимум около 7,0. Фермент обладает эндонуклеазной активностью и гидролизует одно- [124], и двуцепочечные ДНК [116] с образованием 3'-ОН и 5'-Р концов, он $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависим, активируется также Mn^{2+} и Co^{2+} , и ингибируется Zn^{2+} , но не подавляется мономерными актинами. Во время апоптоза его активность регулируется поли(АДФ-рибозо)полимеразой. Хотя ДНК-аза гамма содержит N-концевой сигнальный пептид, определяющий ее транспортировку в шероховатый эндоплазматический ретикулум, имеются сведения о присутствии фермента в ядрах неапоптозных клеток в связанном с хроматином состоянии [124, 125]. Это объясняют наличием двух сигналов ядерной локализации (NLS) у зрелого белка [126].

Предложена схема биосинтеза и активации ДНК-азы γ : вновь синтезированная молекула белка переносится в эндоплазматический ретикулум благодаря наличию гидрофобного пептида-предшественника. После удаления пептида сигнальной пептидазой «зрелая» ДНК-аза γ транслоцируется и фиксируется на внешней стороне ядерной оболочки. Появление определенных апоптозных стимулов вызывает высвобождение фермента, а наличие NLS определяет его попадание в ядро [116]. В то же время полагают, что проникновение ДНК-азы γ в ядро становится возможным лишь при выраженном повреждении ядерной мембраны на завершающих стадиях апоптоза [127].

Условия и апоптозные стимулы, вызывающие активацию ДНК-азы γ , еще мало изучены. Известно, что ДНК-аза γ присутствует в активном состоянии в нормальных тимоцитах и ее активность не изменяется в процессе апоптоза, индуцированного X-излучением или дексаметазоном. Это было первым указанием на различный статус фермента в неапоптозных клетках и возможные неоднозначные пути его посттрансляционной активации [126].

Индукция ДНК-азы γ является обязательным условием фрагментации ДНК при апоптозе, инициированным спонтанной миогенной дифференцировкой миобластов линии C2C12 [128]. В пролиферирующих нейробластах линий N1E-115 и PC12 индукция апоптоза тауро-спорином вызывает появление «лестницы» из фрагментов ДНК, и этот процесс ингибируется при экспрессии каспазо-устойчивой формы ICAD. Однако при запуске дифференцировки активность CAD не обнаруживается, но происходит индукция ДНК-азы γ . Таким образом,

впервые было продемонстрировано избирательное использование клетками различных апоптозных ДНК-аз, в зависимости от стадии дифференцировки. Также показано, что ДНК-аза γ участвует в апоптозе, сопровождающем развивающиеся нервные клетки [129]. Установлено, что в незрелых В-клетках линии WENI-231 при индукции апоптоза цитотоксическими соединениями активируется CAD, это сопровождается последующей межнуклеосомной фрагментацией ДНК и дроблением ядра. Однако, при индукции апоптоза лигированием рецептора В-клеток, который происходит без активации CAD, наблюдается аналогичная деструкция ДНК и ядра. При этом отмечено усиление экспрессии ДНК-азы γ . Специфический ингибитор ДНК-азы гамма DR396 подавляет фрагментацию ДНК и ядра. Считается, что ДНК-аза γ «обслуживает» альтернативный механизм распада ядра и яДНК при нарушениях в апоптозном каскаде, активирующем CAD [130].

При индукции апоптоза стауроспорином в культуре лимфоидных клеток человека Ramos начальные этапы деградации ДНК в первые 3 часа после индукции осуществляет CAD, а на завершающих стадиях разрушения ядра и его содержимого через 48 часов после индукции отмечено возрастание активности ДНК-азы γ . Возможно, ДНК-аза γ играет некую вспомогательную роль в процессе деструкции яДНК на завершающих стадиях гибели клетки при классическом апоптозе, обеспечивая более полный и быстрый гидролиз яДНК [127].

Завершающие стадии апоптоза, связанные с деструкцией мембран, иногда называют «вторичным некрозом». ДНК-аза γ может принимать участие и в такой некротической гибели клеток. Следовательно, ДНК-аза γ может отвечать за наиболее полное удаление яДНК в умирающих клетках, хотя механизм активации этого фермента и его истинные функции *in vivo* остаются до конца не ясными.

Что касается альтернативных функций ДНК-азы γ , то существует указание на ее участие в формировании иммунитета. Активность фермента коррелирует со скоростью соматических гипермутаций, включая точечные мутации и нуклеотидные вставки/делеции, а также с образованием ступенчатых двуцепочечных разрывов в реорганизуемом V районе [131]. Также прослеживается корреляция между фрагментацией ДНК при индуцированном стауроспорином апоптозе в клетках HeLa S3/ γ , стабильно экспрессирующих ДНК-азу γ , и секрецией во внеклеточное пространство HMGB1, негистонового белка хроматина, участвующего в формировании воспалительного ответа [132].

VI. НУКЛЕАЗЫ СЕМЕЙСТВА ДНК-азы II

Существенная роль ДНК-азы II у высших эукариот была ярко продемонстрирована на трансгенных мышах, неэкспрессирующих эндонуклеазу CAD [133]. В апоптотных клетках этих мышей фрагментация ДНК либо отсутствовала вовсе, либо была слабо выражена, однако эти мыши нормально росли и развивались. Таким образом, предварительная фрагментация ядерной ДНК при апоптозе еще не является обязательным событием для ее полной деградации, а ее расщепление может происходить в фагоцитах под действием ДНК-азы II.

К семейству ДНК-аз II относятся нуклеазы, которые в отличие от большинства нуклеаз имеют рН оптимум в кислой области, не зависят от двухвалентных катионов и гидролизуют двуцепочечную ДНК на короткие олигонуклеотиды с преимущественным образованием 3'-Р концевых групп [134, 135]. Эти ферменты синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме и затем транслоцируются в лизосомы, однако, они обнаруживаются также в ядрах как нормальных, так и апоптотных клеток, но активности их низки; кроме того, они присутствуют и в секретируемых жидкостях [134]. Во время апоптоза содержимое апоптотной клетки подкисляется, что может активировать кислые нуклеазы, в том числе и ДНК-азы II, и эти ферменты могут включаться в процесс деградации хромосомной ДНК [136].

Из всего многообразия описанных кислых нуклеаз, с деградацией ДНК при запрограммированной клеточной гибели связывают ДНК-азу II α , ДНК-азу II β и L-ДНК-азу II.

ДНК-аза II α является обязательным компонентом лизосом, который гидролизует ДНК апоптотных телец, поглощенных фагоцитами, или ДНК, попавшую в клетки при эндоцитозе [18, 19]. Фермент был выделен из печени свиньи и человека, а затем клонирован и секвенирован одновременно двумя группами исследователей [137, 138]. В дальнейшем были определены аминокислотные последовательности ДНК-азы II α крупного рогатого скота, свиней, мышей, крыс и человека, а также *D. melanogaster* и *C. elegans* [134]. Фермент экспрессируется во всех исследованных тканях млекопитающих [133], синтезируется в виде пропептида с последующим процессингом. Формирование активного фермента идет двумя путями. Два из трех пептидов (35 кДа и 10 кДа), появившиеся в результате расщепления молекулы пропептида, соединяются бисульфитными мостиками, и фермент гликозилируется по шести сайтам [137, 140]. Вторая структурная модель представляет собой мономерный пептид, появляющийся после отщепления от пропептида кодируемого 91 п.н. участка и гликозилируемый по четырем сайтам [141].

ДНК-аза II α участвует в дифференцировке эритроцитов. В макрофагах эмбрионов мыши с мутацией в гене ДНК-азы II α отмечается накопление неповрежденной ДНК, что приводит к остановке эритропоэза и, в конечном итоге, вызывает гибель эмбрионов от анемии [142, 143]. Развитие тимуса у мыши также зависит от ДНК-азы II α : у эмбрионов мыши, лишенных гена ДНК-азы II α , развитие тимуса блокируется на про-Т-стадии [144].

Идентификация ДНК-азы II β стала возможной после ее клонирования и секвенирования кодирующего ее гена, поскольку по своим биохимическим свойствам она во многом сходна с ДНК-азой II α . Аминокислотные последовательности гомологов ДНК-аз II β у человека, грызунов, дрозофилы и *S. elegans* включают 22-членный сигнальный пептид и содержат большое число консервативных участков [145, 146]. ДНК-аза II β является внутриклеточным белком, но, как и ДНК-аза II α , она может секретироваться. ДНК-аза II β не нуждается в кофакторах и максимально активна при кислых значениях pH, однако фермент сохраняет достаточно высокую активность и при нейтральном значении pH. В результате гидролиза ДНК этим ферментом образуются фрагменты с 3'-P и 5'-ОН концами.

Что касается биологической активности этого фермента, то у человека отмечают его экспрессию в трахеях, легких, простате, лимфатических узлах, но наибольший уровень экспрессии наблюдается в слюнных железах. У крыс и мышей ДНК-аза II β интенсивно экспрессируется в печени. Особый интерес вызывает ДНК-аза II β в связи с дифференцировкой хрусталика. Этот фермент специфическим образом участвует в деградации ДНК клеток хрусталика у мышей, что показано на мышцах с нокаутом гена ДНК-азы II β . Повышенный уровень экспрессии этого фермента отмечен в волокнах развивающегося хрусталика мыши и человека. При инактивации гена ДНК-азы II β у мышей идет накопление негидролизованной ДНК в волокнах развивающегося хрусталика, что ведет к формированию катаракты [147, 148]. Таким образом, ДНК-аза II β ответственна за автономное разрушение ДНК в ядрах клеток волокон формирующегося хрусталика, что во многом обеспечивает его прозрачность. Вопрос о механизмах деградации ДНК в хрусталике дискутировался довольно долго, предполагалось участие апоптоза, цитозольной деградации и аутофагии. Однако, отсутствие макрофагов и активации САД в клетках волокон, как и нормальное развитие хрусталика у мышей с инактивированным геном САД, исключают апоптоз [147], а нормальная деградация органелл в хрусталике и эритроидных клетках у мышей с дефицитом Atg5

(белок, существенный для формирования аутофагосомы) делают невозможным аутофагию [149]. Установлено, что в кортикальных клетках волокон развивающегося хрусталика сильно активируется транскрипция генов ДНК-азы II β , других лизосомальных ферментов. Эти ферменты, скорее всего, играют главную роль в деградации клеточных органелл во время дифференцировки хрусталика [150]. ДНК-аза II β участвует также в деградации клеток межпальцевой мезенхимы на завершающих стадиях формирования конечностей у эмбрионов [151].

На модели дифференцирующихся клеток хрусталика цыпленка показано, что нуклеаза расщепляет ДНК до олигонуклеосомных фрагментов, а в то же время известное TUNEL-мечение было негативным. Авторы высказали предположение об участии в этом процессе нуклеазы семейства ДНК-азы II [152]. Эта нуклеаза была очищена и секвенирована. Оказалось, что ее последовательность идентична последовательности консервативного белка серпина, лейкоцитарного ингибитора эластазы – LEI. В результате протеолиза LEI и появляется L-ДНК-аза II [153]. Подробно механизм протеолиза LEI и конформационные превращения образующихся продуктов гидролиза представлены в работах [154, 155]. Фермент синтезируется в виде предшественника, обладающего активностью, ингибирующей протеазы, и локализован в цитоплазме. В результате посттрансляционной модификации – гидролиза эластазой в области петли реактивного центра – фермент приобретает нуклеазную активность, утрачивая прежнюю протеолитическую активность, и при этом экспонируется сайт, определяющий его ядерную локализацию [154]. L-ДНК-аза II, также как и ДНК-аза II β , дифференциально экспрессируется в ходе морфогенеза конечностей и определяет межнуклеосомную фрагментацию яДНК в гибнущих клетках межпальцевой мезенхимы в случае инактивации эндонуклеазы CAD [151].

Эпидермальный фактор роста (EFG) в питуитарных клетках (GH4C1) индуцирует клеточную гибель с признаками апоптоза и параптоза. Наблюдаемая межнуклеосомная фрагментация ДНК является следствием действия L-ДНК-азы II [156].

VII. ДРУГИЕ АПОПТОЗНЫЕ НУКЛЕАЗЫ

В первое время поиск нуклеаз, участвующих в апоптозной деградации ДНК, ограничивался констатацией корреляции нуклеазных активностей с фрагментацией ДНК. При этом было выявлено несколько $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимых ДНК-аз, которые в основном были иденти-

фицированы только по молекулярной массе. Так, в STLL клетках фрагментацию ДНК при апоптозе, индуцированном удалением из среды IL-2, связывали с 40 кДа и 58 кДа нуклеазами (соответственно NUC40 и NUC58). Активность этих ферментов зависела от ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} . Причем было установлено, что NUC40 локализована в ядре, а NUC58 в цитоплазме; оба фермента имеют оптимум действия при нейтральном значении pH и ингибируются ионами Zn^{2+} [157].

При индукции апоптоза глюкокортикоидами в тимocyтах крысы была обнаружена нуклеазная активность NUC18 (18 кДа), ассоциированная с фрагментацией ДНК. Ферментативная активность выделенной нуклеазы NUC18 зависела от ионов Ca^{2+} , подавлялась Zn^{2+} и ауринтрикарбонowymi кислотами [158]. По структуре NUC18 сходна с белками семейства циклофилинов. Циклофилины А, В и С обладают $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой нуклеазной активностью, сходной с NUC18, и, по-видимому, участвуют в апоптотозной деградации ДНК в лимфоцитах [18]. Рекомбинантные белки циклофилин А (СурА) и АIF совместно участвуют *in vitro* в деградации плазмидной ДНК и вызывают разрушение ДНК в очищенных ядрах. Апоптотозная кооперация СурА и АIF не зависит от пептидил-пролил цис-транс-изомеразной активности СурА. В экспрессирующих СурА клетках суперэкспрессия АIF усиливает апоптотозный хроматолизис. Зависимый от АIF гидролиз ДНК до длинных фрагментов менее выражен в клетках с нокаутом СурА, по сравнению с контролем. АIF мутанты, у которых отсутствует домен связывания с СурА, неэффективны в качестве апоптотозных активаторов в экспериментах по трансфекции. Кроме того, АIF не способен активировать апоптоз в клетках с нокаутом по СурА, этот эффект восстанавливается при введении в клетки интактного гена *сурА*. Таким образом, при гидролизе хроматина СурА и АIF взаимодействуют между собой [159].

В ядрах клеток гематомы крысы 5123tc наблюдали двух-ступенчатый процесс деградации ДНК. Первый этап гидролиза ДНК на длинные фрагменты (50–300 т.п.н.) стимулировался одними ионами Mg^{2+} , тогда как второй этап требовал присутствия и Mg^{2+} и Ca^{2+} . Эндонуклеолитические активности, участвующие в этих двух этапах расщепления ДНК, могут быть разделены в определенных условиях: Mg^{2+} -модулируемая активность прочно связана с хроматином, а $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимая активность легко экстрагировалась буферами с низкой ионной силой. $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимая активность принадлежала новой 97 кДа эндонуклеазе, которая также активируется Mn^{2+} и Co^{2+} , а ингибируется при миллимолярных концентрациях Zn^{2+} . Кроме того, эта активность не экстрагируется низкосолевым буфером из

ядер апоптозных клеток. Изоэлектрофокусирование показало, что белок p97 присутствует в виде множественных форм с различными изоэлектрическими точками, что указывает на его посттрансляционную модификацию. Фермент p97 присутствует конститутивно в различных культурах клеток и тканях крысы. Он активен в широком интервале значений pH (6,0–9,0), и подавляется восстанавливающими агентами. *In vitro* фермент обладает как эндо-, так и экзонуклеазной активностью и способен гидролизовать одно- и двуцепочечные ДНК [160].

Грубый ядерный экстракт из апоптозных тимоцитов крысы вызывал расщепление ядерной ДНК клеток HeLa на олигонуклеосомные и длинные фрагменты (50–300 т.п.н.). С помощью гель-фильтрации из этого экстракта были выделены и идентифицированы новые нуклеазные активности с молекулярной массой 260 кДа и 25 кДа, первая гидролизовала ДНК на протяженные 50–300 т.п.н. фрагменты, а вторая расщепляла ДНК как на длинные, так и олигонуклеосомные фрагменты. Подобно другим участвующим в апоптозе нуклеазам, эти ферменты гидролизуют ДНК с образованием 3'-ОН концевых групп, зависят от ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , ингибируются N-метилмалеимидом, тетраанионом Na, ауринтрикарбонными кислотами и NaCl. Кроме того, они ингибировались некоторыми ингибиторами сериновых протеаз, калпаиновыми ингибиторами и ингибиторами каспазы. Полагают, что в апоптозе участвуют и некаспазные протеазы: эти ферменты, по-видимому, изменяют структуру хроматина, что облегчает доступность ДНК для нуклеолитической атаки [161].

Во время апоптоза в лейкоэмических клетках во фрагментации ДНК участвует и апуриновая/апиримидиновая нуклеаза APE1, известная как ДНК-аза эксцизионной репарации [162]. APE1 – мультифункциональный фермент, кроме эндонуклеолитической активности он обладает также 3'-фосфодиэстеразной, 3'-5'-экзонуклеазной и 3'-фосфатазной активностями [163]. Показано, что укороченная с N-конца форма APE1 (AN34) также участвует в деградации ДНК лейкоэмических клеток [164].

При индуцированном РВОН-6 каспазо-независимом апоптозе миелогенных лейкоэмических (СМЛ) клеток наблюдалась олигонуклеосомная фрагментация ДНК в отсутствие активации САД. Деструкция ДНК в данном случае осуществлялась Mn^{2+} -зависимой кислотной эндонуклеазой, активация которой зависит от присутствия химотрипсин-подобной сериновой протеазы [165].

В SET комплекс, упомянутый ранее в связи с крупнощепляющей эндонуклеазой NM23-H, входит также экзонуклеаза TREX1, которая удаляет нуклеозиды с 3'-ОН концов, появляющихся под действием

NM23-N1. Следствием этого являются необратимое разрушение ДНК и гибель клетки. Предполагается, что компоненты SET комплекса, в том числе и экзонуклеаза TREX1, в зависимости от соответствующего внутриклеточного контекста могут участвовать в репарации ДНК [166, 167]. TREX2 – гомолог TREX1, участвует в каспазо-зависимой деградации ДНК, вызывая в ней 3'-ОН разрывы, неподдающиеся репарации в условиях генотоксического стресса [168].

VIII. НУКЛЕАЗЫ АУТОФАГИИ И НЕКРОПТОЗА

Фрагментация ДНК при неапоптозных формах клеточной гибели, таких как некроптоз и аутофаговая клеточная смерть охарактеризован крайне слабо. При гибели клеток в яичниках *D. melanogaster* показано, что удаление клеток, служащих источником питательных веществ для развивающейся яйцеклетки на поздних стадиях оогенеза, происходит по механизму аутофагии, и основную роль в деградации ядерной ДНК при этом играет ДНК-аза II. Мутанты с дефектом синтеза ДНК-азы II, характеризуются серьезными нарушениями в удалении «клеток-кормилок». Было показано, что в этом случае ДНК-аза II действует непосредственно внутри умирающей клетки, а присутствие аутофагосом в этих клетках указывает на аутофагию – как механизм клеточной гибели на данной стадии оогенеза. [169]. Инактивация генов аутофагии *atg1*, *atg13*, *vps34* приводит на поздней стадии оогенеза к появлению полостей, содержащих неповрежденные ядра вспомогательных питающих клеток [170]. Некроптоз, некроз и вторичный некроз характеризуются идентичной последовательностью субклеточных событий – окислительный взрыв, гиперполяризация митохондриальных мембран, пермембилизация мембран лизосом и плазматической мембраны, кинетики которых заметно различаются [171]. Массированная деструкция цитоплазматических мембран и мембран клеточных органелл при некроптозе указывают на возможное участие в гидролизе ДНК внутри клетки как EndoG, так и ДНК-азы II лизосом. Так, некроптоз, индуцированный в первичных кортикальных нейронах мыши (C57/Black 6J) H_2O_2 , сопровождается высвобождением EndoG и фрагментацией яДНК [172].

IX. СОПРЯЖЕННОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ЭНДОНУКЛЕАЗ

Процесс деградации ДНК, сопровождающий ЗГК, достаточно сложно организован. Участие различных ДНК-аз, очевидно, позволяет сделать этот процесс более эффективным за счет специфического гидролиза

конкретных структур в ДНК и усиления нуклеазных активностей в результате их взаимодействия. По-видимому, тип ткани или клеточной линии, стадия дифференцировки, характер проапоптозного стимула, интенсивность стрессового воздействия, а также специфика патогена могут определять дифференциальную экспрессию клеточных эндонуклеаз при апоптозе. В принципе, в одной и той же клетке может осуществляться несколько сценариев деградации ДНК. Об этом ярко свидетельствуют данные о существовании у *C. elegans* двух разных путей апоптозной деградации ДНК, осуществляемых различными автономными клеточными нуклеазами [11].

Уникальные особенности этой модели позволили проследить за процессом гибели отдельных клеток червя в ходе его развития и в настоящее время известно не только какие инвариантные линии соматических клеток гибнут, но когда и где идет апоптозный процесс. В 2002 г. эта работа [173] была удостоена Нобелевской премии по медицине. Программированная гибель клеток у *C. elegans* происходит на двух стадиях развития – в эмбриональный и постэмбриональный периоды развития нематоды и в различных типах тканей. Была выявлена группа генов, участвующих в расщеплении ДНК во время апоптоза: *nuc-1* и *crn6* (гомологи ДНК-азы II), *cps-6* (гомолог EndoG), *wah-1* (гомолог AIF), *crn1* (гомолог флэп эндонуклеазы FEN-1), *crn2* (гомолог TatD), *crn3* и *crn5* (гомологи рибонуклеазных компонентов экзосом мультисубъединичного комплекса), *crn4* (гомолог нуклеазам семейства 3'-5'-экзонуклеаз, включая РНК-азу T), и *cyp-13*, сходный с геном циклофилина E животных. Утрата или снижение активности любого из этих генов приводит к накоплению TUNEL-позитивных клеток в эмбрионах *C. elegans*. Эти гены образуют две группы – (1) *cps-6*, *wah-1*, *crn1*, *crn4*, *crn5* и *cyp-13* и (2) – *crn2* и *crn3*. Мутации в генах обеих групп не только вызывают серьезные дефекты в деградации яДНК, но и вызывают нарушения в поглощении осколков гибнущих клеток. Белки CPS-6, CRN-1, CRN-4, CRN-5 и CYP-13 образуют комплекс, названный деградосомой. В состав этого комплекса входит и белок WAH-1, взаимодействующий с CPS-6 и усиливающий его нуклеазную активность. Нуклеазы, кодируемые *crn2* и *crn3*, не входят в состав деградосомы, и, как показал генетический анализ, могут функционировать параллельно и независимо от этого комплекса нуклеаз [174].

Гены *nuc-1* и *crn-6*, а также гомологичный ген *crn-7*, кодируют кислые ДНК-азы II типа. Как полагали, продукты этих генов не влияют ни на активацию, ни на динамику апоптоза, а, скорее всего, действуют на поздних стадиях апоптозной деградации ДНК в лизосомальных

компартаментах поглощающих клеток. Для исследования роли генов трех ДНК-аз II у *C. elegans* в апоптозе и развитии были проанализированы характер их экспрессии, особенности мутантных фенотипов, ферментативные активности их продуктов в опытах с обменом промоторов, а также значение их секреции для других функций, связанных с деградацией ДНК. Установлено, что гомологи ДНК-азы II у *C. elegans* в различной степени связаны с деградацией ДНК при апоптозе. Главная роль принадлежит нуклеазе NUC-1; CRN-6, возможно, выполняет вспомогательную функцию, а CRN-7 не существенна для данного процесса. В апоптозной деградации ДНК CRN-6, но не CRN-7, может частично замещать NUC-1, но обе нуклеазы не способны заменить NUC-1 в удалении нежелательной бактериальной ДНК в кишечнике. Впервые установлено, что NUC-1, будучи секретлируемой нуклеазой, может перемещаться на большое расстояние, пересекая границы своей экспрессии, и участвовать в деградации ДНК непосредственно в апоптозных клетках. Однако, не исключается возможность захвата этой «странствующей» нуклеазы и фагоцитами, где завершается деградация ДНК апоптозных телец [175]. На участие ДНК-азы II в деградации ДНК внутри апоптозных клеток указывает и факт обнаружения в них коротких фрагментов ДНК, длина которых ≥ 20 нуклеотидам с интервалом в 10 нуклеотидов и которые можно пометить терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой только после обработки фосфатазой с возникновением 3'-Р концов, что указывает на их появление под действием ДНК-азы II. Наблюдаемая «лестница» коротких интермедиатов ДНК идентична таковой после обработки нуклеазами ДНК, связанной с кором нуклеосомных белков. Следовательно, мишенью ДНК-азы II в апоптозной клетке является ДНК, связанная с нуклеосомой, поскольку гидролиз ДНК в фагоцитах идет в присутствии протеаз, расщепляющих нуклеосомные белки [176].

Все еще остается нерешенным один из важнейших вопросов регуляции клеточной гибели. Каким образом происходит при апоптозе «трансформация» в проапоптозные молекулы ряда компонентов, важных для клеточного роста и выживания? Изучение тонкой структурной организации CRN белков, являющихся гомологами компонентов важных клеточных процессов – контроля сворачивания белков, процессинга РНК, репликации и репарации ДНК и, очевидно, существенных для выживания и правильного развития нематоды, может дать ответ на этот вопрос. Так, при изучении кристаллической структуры CRN-4: помимо характерного каталитического DEDDh нуклеазного домена было выявлено присутствие дополнительного С-концевого ДНК-связывающего Zn-домена, обеспечивающего

взаимодействие с субстратом и/или реорганизацию молекулы. Полагают, что этот дополнительный домен определяет различные варианты олигомерной сборки фермента и/или взаимодействие с новыми кофакторами, следствием чего может быть изменение субстратной специфичности фермента и проявление проапоптозной функции [177]. Анализ кристаллической структуры и биохимических свойств CRN-5 [178] свидетельствует о том, что в норме мономерный белок включен в экзосому, а в апоптозной клетке формируется гомодимер, лишенный нуклеазной активности, но способный связываться с ДНК и взаимодействовать с апоптозной нуклеазой CRN-4, что ведет к возрастанию ее активности.

Х. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эндонуклеазы – главные инструменты обязательной деградации ДНК при апоптозе. Многие из этих ферментов обладают выраженным процессивным характером действия. Сначала они расщепляют ДНК в хроматине на очень крупные домены, а затем осуществляют межнуклеосомную фрагментацию ДНК с последующим гидролизом до мелких фрагментов – олигонуклеотидов. Хроматин при апоптозе подвергается атаке множества нуклеаз с разной активностью и специфичностью действия. Некоторые ферменты обладают как эндо- так и экзонуклеазной активностями, одни из них способны гидролизовать только ДНК, а другие и ДНК, и РНК; они могут образовывать в ДНК точечные разрывы и протяженные бреши или процессивно гидролизовать только одно- или двуцепочечные ДНК либо и те, и другие. К сожалению, очередность действия разных нуклеаз в апоптозной клетке еще неясна, однако она, безусловно, существует. Для каждой эндонуклеазы в клетке имеются свои механизмы регуляции активности, это могут быть ионы металлов и другие эффекторы, в том числе, по-видимому, и S-аденозилметионин. Возможна также модуляция активности нуклеаз гистонами и короткими пептидами. По-видимому, набор и состояние всех этих эффекторов в нормальной и апоптозной клетках различен.

Не исключено, что множественность эндонуклеаз имеет и некий подстраховочный смысл для того, чтобы эффективная и полная деградация ДНК в апоптозной клетке более или менее гарантированно состоялась. Следует иметь в виду, что в клетке эндонуклеазы должны распознавать и находить доступные для гидролиза участки ДНК в составе хроматина. Хроматин и его белковые компоненты (гистоны) в принципе могут влиять на эндонуклеазы и модулировать их действие.

В этом отношении показательны данные о модуляции действия растительных эндонуклеаз гистонами и короткими пептидами [179]. Не исключено, что этот механизм регуляции активности эндонуклеаз существует и у животных.

Как бы то ни было, апоптоз без действия нуклеаз невозможен. Дефекты в этом процессе приводят к накоплению ненужной или даже «вредной» ДНК, нарушению клеточной дифференцировки, эмбриогенеза, развития организмов в целом и сопровождаются многими тяжелыми заболеваниями. Поэтому сейчас как никогда возрос интерес к исследованию собственно апоптозных нуклеаз. Знание их свойств, дальнейшая расшифровка структуры и функций, природы и действия эффекторов, модулирующих их активность, очень важны не только для понимания тонких механизмов апоптоза, но и для регуляции и управления ЗГК, а с ней и клеточной дифференцировкой и развитием разных организмов.

ЛИТЕРАТУРА

- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M.O., Kepp, O., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nuñez, G., Peter, M.E., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H.U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G., Kroemer, G. (2012) *Cell Death Differ.*, **19**, 107–120
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972) *Br. J. Cancer.*, **26**, 239–257.
- Wyllie, A.H. (1980) *Nature*, **284**, 555–556.
- Bredesen, D.E. (2007) *Stroke*, **38**, 652–660. doi: 10.1161/01.STR.0000257802.82826.a7
- Bröker, L.E., Kruyt, F.A., Giaccone, G. (2005) *Clin. Cancer Res.*, **11**, 3155–3162.
- Boujrad, H., Gubkina, O., Robert, N., Krantic, S., Susin, S.A. (1980) *Cell Cycle*, **6**, 2612–2619.
- Galluzzi, L., Kroemer, G. (2008) *Cell*, **135**, 1161–1163.
- Salvesen, G.S., Dixit, V.M. (1997) *Cell*, **91**, 443–446.
- Ulukaya, E., Acilan, C., Yilmaz, Y. (2011) *Cell Biochem. Funct.*, **29**, 468–480.
- Nagata, S. (2005) *Ann. Rev. Immunol.*, **23**, 853–875.
- Samejima, K., Earnshaw, W.C. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 677–688.
- Parrish, J.Z., Xue, D. (2006) *Chromosoma*, **115**, 89–97.
- Oberhammer, F., Wilson, J.W., Dive, C., Morris, I.D., Hickman, J.A., Wakeling, A.E., Walker, P.R., Sikorska, M. (1993) *EMBO J.*, **12**, 3679–3684.
- Lagarkova, M.A., Iarovaia, O.V., Razin, S.V. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 20239–20241.
- Earnshaw, W.C. (1995) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 337–343.
- Peitsch, M.C., Polzar, B., Stephan, H., Crompton, T., McDonald, H.R.,

- Mannherz, H.G. (1993) EMBO J., **12**, 371–377.
17. Barry, M.A., Eastman, A. (1993) Arch Biochem. Biophys., **300**, 440–450.
18. Montague, J.W., Hughes, F.M.Jr., Cidlowski, J.A. (1997) J. Biol. Chem., **272**, 6677–6684.
19. Shiokawa, D., Ohyama, H., Yamada, T., Tamuma, S. (1997) Biochem. J., **326**, 675–681.
20. Fan, Z., Beresford, P.J., Oh, D.Y., Zhang, D., Lieberman, J. (2003) Cell., **112**, 659–672.
21. Zhao, T., Zhang, H., Guo, Y., Zhang, Q., Hua, G., Lu, H., Hou, Q., Liu, H., Fan, Z. (2007) Cell Death Differ., **14**, 489–499.
22. Lu, Z.G., Zhang, C.M., Zha, Z.H. (2004) Cell Research., **14**, 134–140.
23. Britton, S., Frit, P., Biard, D., Salles, B., Calsou, P. (2009) Cancer Res., **69**, 8120–8126.
24. Hosono, Y., Abe, T., Ishiai, M., Takata, M., Enomoto, T., Seki, M. (2011) Biochem. Biophys. Res. Commun., **410**, 568–573.
25. Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., Kroemer, G. (1999) Nature, **397**, 441–446.
26. Joza, N., Galindo, K., Pospisilik, J.A., Benit, P., Rangachari, M., Kanitz, E.E., Nakashima, Y., Neely, G.G., Rustin, P., Abrams, J.M., Kroemer, G., Penninger, J.M. (2008) Cell Death Differ., **15**, 1009–1018.
27. Ye, H., Cande, C., Stephanou, N.C., Jiang, S., Gurbuxani, S., Larochette, N., Daugas, E., Garrido, C., Kroemer, G. (2002) Nat. Struct. Biol., **9**, 680–684.
28. Ankarcona, M., Dypbukt, J.M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S., Nicotera, P. (1995) Neuron, **15**, 961–973.
29. Saura, J., MacGibbon, G., Dragunow, M. (1997) Brain Res. Mol. Brain Res., **48**, 382–388.
30. Bezvenyuk, Z., Miettinen, R., Solovyvan, V. (2003) Brain Res. Mol. Brain Res., **110**, 140–146.
31. Solovyvan, V.T. (2007) Exp. Cell Res., **313**, 1347–1360.
32. Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. (1997) Cell, **89**, 175–184.
33. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. (1998) Nature, **391**, 43–50.
34. Samejima, K., Earnshaw, W.C. (2005) Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **6**, 677–688.
35. Hanus, J., Kalinowska-Herok, M., Widlak, P. (2008) Apoptosis, **13**, 377–382.
36. Yang, W. (2011) Q. Rev. Biophys., **44**, 1–93.
37. Neimanis, S., Albig, W., Doenecke, D., Kahle, J. (2007) J. Biol. Chem., **282**, 35821–35830.
38. Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W.T., Wang, X. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **95**, 8461–8466.
39. Nagata, S. (1997) Cell, **88**, 355–365.
40. Schindler, C.K., Pearson, E.G., Bonner, H.P., So, N.K., Simon, R.P., Prehn, J.H., Henshall, D.C. (2006) J. Cereb. Blood Flow Metab., **26**, 583–589.
41. Korn, C., Scholz, S.R., Gimadudinow, O., Lurz, R., Pingoud, A., Meiss, G. (2005) J. Biol. Chem., **280**, 6005–6015.
42. Ninios, Y.P., Sekeri-Pataryas, K.E., Sourlingas, T.G. (2010) Apoptosis, **15**, 128–138.
43. Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S. (1998) Nature, **391**, 96–99.
44. Wolf, B.B., Schuler, M., Echeverri, F., Green, D.R. (1999) J. Biol. Chem., **274**, 30651–30656.
45. Liu, X., Zou, H., Widlak, P., Garrard, W., Wang, X. (1999) J. Biol. Chem., **274**, 13836–13840.

46. Widlak, P., Lanuszewska, J., Cary, R.B., Garrard, W.T. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 26915–26922.
47. Woo, E.-J., Kim, Y.-G., Kim, M.-S., Han, W.-D., Shin, S., Robinson, H., Park, S.-Y., Oh, B. (2004) *Mol. Cell.*, **14**, 531–539.
48. Mukae, N., Enari, M., Sakahira, H., Fukuda, Y., Inazawa, J., Toh, H., Nagata, S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**, 9123–9128.
49. McCarty, J.S., Toh, S.Y., Li, P. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **264**, 176–80.
50. Nagase, H., Fukuyama, H., Tanaka, M., Kawane, K., Nagata, S. (2003) *Cell Death Differ.*, **10**, 142–143.
51. Ageichik, A.V., Samejima, K., Kaufmann, S.H., Earnshaw, W.C. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 27374–27382.
52. Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 15740–15744.
53. Chen, D., Stetler, R.A., Cao, G., Pei, W., O'Horo, C., Yin, X.M., Chen, J. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 38508–38517.
54. Widlak, P., Garrard, W.T. (2005) *J. Cell. Biochem.*, **94**, 1078–1087.
55. Widlak, P., Garrard, W.T. (2009) *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 263–274.
56. Liu, X., Zou, H., Widlak, P., Garrard, W., Wang, X. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 13836–13840.
57. Widlak, P., Li, P., Wang, X., Garrard, W.T. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 8226–8232.
58. Kalinowska-Herok, M., Wudlak, P. (2008) *Acta Biochim. Pol.*, **55**, 21–26.
59. Ninios, Y.P., Sekeri-Pataryas, K.E., Sourlingas, T.G. (2010) *Apoptosis*, **15**, 128–138.
60. Ahn, J.Y., Liu, X., Cheng, D., Peng, J., Chan, P.K., Wade, P.A., Ye, K. (2005) *Mol. Cell.*, **18**, 435–445.
61. Hanus, J., Kalinowska-Herok, M., Widlak, P. (2010) *Acta Biochim. Pol.*, **57**, 521–527.
62. Widlak, P., Garrard, W.T. (2006) *Biochem. Cell Biol.*, **84**, 405–410.
63. Desharnais, P., Dupéré-Minier, G., Hamelin, C., Devine, P., Bernier, J. (2008) *Apoptosis*, **13**, 197–212.
64. Xiao, F., Widlak, P., Garrard, W.T. (2007) *Nucleic Acids Res.*, **35**, 93–97.
65. Larsen, B.D., Rampalli, S., Burns, L.E., Brunette, S., Dilworth, F.J., Megeney, L.A. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **107**, 4230–4235.
66. Fullwood, M.J., Lee, J., Lin, L., Li, G., Huss, M., Ng, M., Sung, W.-K., Shenolikar, S. (2011) *PLoS One.*, **6**, e26054.
67. McIlory, D., Tanaka, M., Sakahira, H., Fukuyama, H., Suzuki, M., Yamamura, K., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Nagata, S. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 549–558.
68. Li, L., Luo, X., Wang, X. (2001) *Nature*, **412**, 95–99.
69. Ruiz-Carrillo, A., Renaud, J. (1987) *EMBO J.*, **6**, 401–407.
70. Gerschenson, M., Houmiel, K.L., Low, R.L. (1995) *Nucleic Acids Res.*, **23**, 88–97.
71. Yu, F., Sugawara, T., Nishi, T., Liu, J., Chan, P.H. (2006) *J. Neurotrauma*, **23**, 595–603.
72. Irvine, R.A., Adachi, N., Shibata, D.K., Cassell, G.D., Yu, K., Karanjawala, Z.E., Hsieh, C.-L., Lieber, M.R. (2005) *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 294–302.
73. David, K.K., Sasaki, M., Yu, S.W., Dawson, T.M., Dawson, V.L. (2006) *Cell Death Differ.*, **13**, 1147–1155.
74. Ishihara, Y., Shimamoto, N. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 6726–6733.
75. Zhao, S.T., Chen, M., Li, S.J., Zhang, M.H., Li, B.X., Das, M., Bean, J.C., Kong, J.M., Zhu, X.H., Gao, T.M. (2009) *BMC Neurosci.*, doi:10.1186/1471-2202-10-113.

76. Xu, Z., Zhang, J., David, K.K., Yang, Z.-J., Li, X., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Koehler, R.C. (2010) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **299**, R215–R221.
77. Dake, E., Hofmann, T.J., McIntire, S., Hudson, A., Zassenhaus, H.P. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 7691–7702.
78. Buttner, S., Eisenberg, T., Carmona-Gutierrez, D., Ruli, D., Knauer, H., Ruckstuhl, C., Sigrist, C., Wissing, S., Kollroser, M., Frohlich, K.U., Sigrist, S., Madeo, F. (2007) *Mol. Cell.*, **25**, 233–246.
79. Burhans, W.C., Weinberger, M. (2007) *Mol. Cell.*, **25**, 323–325.
80. Rico, E., Alzate, J.F., Arias, A.A., Moreno, D., Clos, J., Gago, F., Moreno, I., Domínguez, M., Jiménez-Ruiz, A. (2009) *Mol. Biochem. Parasitol.*, **163**, 28–38.
81. Parrish, J., Li, L., Klotz, K., Ledwich, D., Wang, X., Xue, D. (2001) *Nature*, **412**, 90–94.
82. de Castro Pimentel Figueiredo, B., de Castro, P.A., Dinamarco, T.M., Goldman, M.H., Goldman, G.H. (2011) *Eukaryot. Cell*, **10**, 276–283.
83. Balk, J., Chew, S.K., Leaver, C.J., McCabe, P.F. (2003) *Plant J.*, **34**, 573–583.
84. Cymerman, I.A., Chung, I., Beckmann, B.M., Bujnicki, J.M., Meiss, G. (2008) *Nucleic Acids Res.*, **36**, 1369–1379.
85. Yoon, S.M., Song, H.N., Yang, J.H., Lim, M.Y., Chung, Y.J., Ryu, S.E., Woo, E.J. (2009) *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **65**, 504–507.
86. Lin, J.L., Nakagawa, A., Lin, C.L., Hsiao, Y.Y., Yang, W.Z., Wang, Y.T., Doudeva, L.G., Skeen-Gaar, R.R., Xue, D., Yuan, H.S. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 7110–7120.
87. Widlak, P., Li, L.Y., Wang, X., Garrard, W.T. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 48404–48409.
88. Zan, H., Zhang, J., Al-Qahtani, A., Pone, E.J., White, C.A., Lee, D., Yel, L., Mai, T., Casali, P. (2011) *Molecular Immunology*, **48**, 610–622.
89. Wu, S.L., Li, C.C., Chen, J.C., Chen, Y.J., Lin, C.T., Ho, T.Y., Hsiang, C.Y. (2009) *J. Biomed. Sci.* doi: 10.1186/1423-0127-16-6 .
90. Kieper, J., Lauber, C., Gimadutdinov, O., Urbanska, A., Cymerman, I., Ghosh, M., Szczesny, B., Meiss, G. (2010) *Protein Expr. Purif.*, **73**, 99–106.
91. Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., Kroemer, G. (1999) *Nature*, **397**, 441–446.
92. Wang, X., Yang, C., Chai, J., Shi, Y., Xue, D. (2002) *Science*, **298**, 1587–1592.
93. Kalinowska, M., Garncarz, W., Pietrowska, M., Garrard, W.T., Widlak, P. (2005) *Apoptosis*, **10**, 821–830.
94. Vařecha, M., Potěšilová, M., Matula, P., Kozubek, M. (2012) *Mol. Cell. Biochem.*, **363**, 301–307.
95. Александрюшкина Н.И., Ванюшин Б.Ф. (2009) *Физиология растений*, **56**, 1–17.
96. Александрюшкина Н.И., Середина А.В., Ванюшин Б.Ф. (2009) *Физиология растений*, **56**, 1–11.
97. Александрюшкина Н.И., Коф Э.М., Середина А.В., Борзов А.А., Ванюшин Б.Ф. (2008) *Физиология растений*, **55**, 1–10.
98. Федореева Л.И., Смирнова Т.А., Коломийцева Г.Я., Ванюшин Б.Ф. (2009) *Биохимия*, **74**, 181–189.
99. Хавинсон В.Х., Федореева Л.И., Ванюшин Б.Ф. (2011) *Докл. РАН*, **437**, 124–127.

100. Федорева Л.И., Ванюшин Б.Ф. (2011) Биохимия, **76**, 799–806.
101. Fedoreyeva, L.I., Sobolev, D.E., Vanuyushin, B.F. (2007) Epigenetics, **2**, 50–53.
102. Федорева, Л.И., Соболев, Д.Е., Ванюшин, Б.Ф. (2008) Биохимия, **73**, 1243–1251.
103. Temme, C., Weissbach, R., Lilie, H., Wilson, C., Meinhart, A., Meyer, S., Golbik, R., Schierhorn, A., Wahle, E. (2009) J. Biol. Chem., **284**, 8337–8348.
104. Loll, B., Gebhardt, M., Wahle, E., Meinhart, A. (2009) Nucleic Acids Res., **37**, 7312–7320.
105. Wang, X., Yang, C., Chai, J., Shi, Y., Xue, D. (2002) Science, **298**, 1587–1592.
106. Huang, K.J., Ku, C.C., Lehman, I.R. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **103**, 8995–9000.
107. Côté, J., Ruiz-Carrillo, A. (1993) Science, **261**, 765–769.
108. Tiranti, V., Rossi, E., Ruiz-Carrillo, A., Rossi, G., Rocchi, M., DiDonato, S., Zuffardi, O., Zeviani, M. (1995) Genomics, **25**, 559–564.
109. McDermott-Roe, C., Ye, J., Ahmed, R., Sun, X.M., Serafin, A., Ware, J., Bottolo, L., Muckett, P., Cañas, X., Zhang, J., Rowe, G.C., Buchan, R., Lu, H., Braithwaite, A., Mancini, M., Hauton, D., Martí, R., García-Arumí, E., Hubner, N., Jacob, H., Serikawa, T., Zidek, V., Papousek, F., Kolar, F., Cardona, M., Ruiz-Meana, M., García-Dorado, D., Comella, J.X., Felkin, L.E., Barton, P.J., Arany, Z., Pravenec, M., Petretto, E., Sanchis, D., Cook, S.A. (2011) Nature, **478**, 114–118.
110. Yakovlev, A.G., Wang, G., Stoica, B.A., Boulares, H.A., Spoonde, A.Y., Yoshihara, K., Smulson, M.E. (2000) J. Biol. Chem., **275**, 21302–21308.
111. Napirei, M., Wulf, S., Eulitz, D., Mannherz, H.G., Kloeckl, T. (2005) Biochem J., **389**, 355–364.
112. Shiokawa, D., Shika, Y., Araki, S., Sunaga, S., Mizuta, R., Kitamura, D., Tanuma, S. (2007) Cell Death Differ., **14**, 992–1000.
113. Fischer, H., Eckhart, L., Mildner, M., Jaeger, K., Buchberger, M., Ghannadan, M., Tschachler, E. (2007) J. Investigative Dermatology, **127**, 24–30.
114. Liu, Q. Y., Ribocco, M., Pandey, S., Walker, P. R., Sikorska, M. (1999) Ann. NY Acad. Sci., **887**, 60–76.
115. Shiokawa, D., Shika, Y., Tanuma, S. (2003) Biochem. J., **376**, 377–381.
116. Shiokawa, D., Tanuma, S. (2001) Biochemistry, **40**, 143–152.
117. Parrish, J. E., Ciccodicola, A., Wehhert, M., Cox, G. F., Chen, E., Nelson, D. L. (1995) Hum. Mol. Genet., **4**, 1557–1564.
118. Rodriguez, A. M., Rodin, D., Nomura, H., Morton, C. C., Weremowicz, S., Schneider M.C. (1997) Genomics, **42**, 507–513.
119. Shiokawa, D., Ohyama, H., Yamada, T., Takahashi, K., Tanuma, S. (1994) Eur. J. Biochem., **226**, 23–30.
120. Rauch, F., Polzar, B., Stephan, H., Zanotti, S., Paddenberg, R., Mannherz, H.G. (1997) J. Cell. Biol., **137**, 909–923.
121. Oliveri, M., Daga, A., Cantoni, C., Lunardi, C., Millo, R., Puccetti, A. (2001) Eur. J. Immunol., **31**, 743–757.
122. Fischer, H., Szabo, S., Scherz, J., Jaeger, K., Rossiter, H., Buchberger, M., Ghannadan, M., Hermann, M., Theussi, H.-C., Tobin, D.J., Wagner, E.F., Tschachler, E., Eckhart, L. (2011) J. Invest. Dermatol., **131**, 1208–1215.
123. Baron, W.F., Pan, C.Q., Spencer, S.A., Ryan, A.M., Lazarus, R.A., Baker, K.P. (1998) Gene, **215**, 291–301.
124. Yakovlev, A.G., Wang, G., Stoica, B.A., Simbulan-Rosenthal, C.M., Yoshihara, K., Smulson, M.E. (1999) Nucleic Acids Res., **27**, 1999–2005.

125. Liu, Q.Y., Pandey, S., Singh, R.K., Lin, W., Ribecco, M., Borowy-Borowski, H., Smith, B., LeBlanc, J., Walker, P.R., Sikorska, M. (1998) *Biochemistry*, **37**, 10134–10143.
126. Nishimura, K., Tanuma, S. (1998) *Apoptosis*, **3**, 97–103.
127. Mizuta, R., Mizuta, M., Araki, S., Suzuki, K., Ebara, S., Furukawa, Y., Shiokawa, D., Tanuma, S., Kitamura, D. (2009) *Biochem. Res.*, **30**, 165–170.
128. Shiokawa, D., Kobayashi, T., Tanuma, S. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 31031–31037.
129. Shiokawa, D., Tanuma, S. (2004) *Cell Death Differ.*, **11**, 1112–1120.
130. Shiokawa, D., Shika, Y., Araki, S., Sunaga, S., Mizuta, R., Kitamura, D., Tanuma, S. (2007) *Cell Death Differ.*, **14**, 992–1000.
131. Okamoto, N., Okamoto, M., Araki, S., Arakawa, H., Mizuta, R., Kitamura, D. (2009) *Immunol. Letters*, **125**, 22–30.
132. Yamada, Y., Fujii, T., Ishijima, R., Tachibana, H., Yokoue, N., Takasawa, R., Tanuma, S. (2011) *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 168–171.
133. Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. (1997) *Cell*, **89**, 175–184.
134. Counis, M.-F., Torriglia, A. (2006) *Biochimie*, **88**, 1851–1858.
135. Evans, C.J., Aguilera, R.J. (2003) *Gene*, **322**, 1–15.
136. Gottlieb, R.A., Nordberg, J., Skowronski, E., Babior, B.M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**, 654–658.
137. Wang, C.C., Lu, S.C., Chen, H.L., Liao, T.H. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 17192–17198.
138. Yasuda, T., Takeshita, H., Iida, R., Nakajima, T., Hosomi, O., Nakashima, Y., Kishi, K. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 2610–2616.
139. Liu, M., Wu, X., Wang, X., Yu, Y., Wang, W., Chen, Q., Boireau, P., Liu, M. (2008) *DNA Cell Biology.*, **27**, 223–228.
140. Cheng, Y.C., Hsueh, C.C., Lu, S.C., Liao, T.H. (2006) *Biochem. J.*, **398**, 177–185.
141. Schäfer, P., Cymerman, I.A., Bujnicki, J.M., Meiss, G. (2007) *Protein Sci.*, **16**, 82–91.
142. Kawane, K., Fukuyama, H., Kondoh, G., Takeda, J., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Nagata, S. (2001) *Science*, **292**, 1546–1549.
143. Yoshida, H., Okabe, Y., Kawane, K., Fukuyama, H., Nagata, S. (2005) *Nat. Immunol.*, **6**, 49–56.
144. Kawane, K., Fukuyama, H., Yoshida, H., Nagase, Y., Ohsawa, H., Uchiyama, Y., Okada, K., Iida, T., Nagata, S. (2003) *Nat. Immunol.*, **4**, 138–144.
145. Shiokawa, D., Tanuma, S. (1999) *Nucleic Acids Res.*, **27**, 4083–4089.
146. Krieser, R.J., MacLea, K.S., Park, J.P., Eastman, A. (2001) *Gene.*, **269**, 205–216.
147. Nishimoto, S., Kawane, K., Watanabe-Fukunaga, R., Fukuyama, H., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Hashida, N., Ohguro, N., Tano, Y., Morimoto, T., Fukuda, Y., Nagata, S. (2003) *Nature*, **424**, 1071–1074.
148. Nagata, S. (2005) *Annu. Rev. Immunol.*, **23**, 853–875.
149. Matsui, M., Yamamoto, A., Kuma, A., Ohsumi, Y., Mizushima, N. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **339**, 485–489.
150. Nakahara, M., Nagasaka, A., Koike, M., Uchida, K., Kawane, K., Uchiyama, Y., Nagata, S. (2007) *FEBS J.*, **274**, 3055–3064.
151. Montero, J.A., Lorda-Diez, C.I., Certal, A.C., Moreno, N., Rodriguez-Leon, J., Torriglia, A., Hurler, J.M. (2010) *Apoptosis*, **15**, 1197–1210.
152. Counis, M.F., Chaudun, E., Arruti, C., Oliver, L., Sanwal, M., Courtois, Y., Torriglia, A. (1998) *Cell Death Differ.*, **5**, 251–261.
153. Torriglia, A., Perani, P., Brossas, J.Y., Chaudun, E., Treton, J., Cour-

- tois, Y., Counis, M.F. (1998) *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 3612–3619.
154. Padron-Barthe, L., Lepretre, C., Martin, E., Counis, M.-F., Torriglia, A. (2007) *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 4028–4036.
155. Torriglia, A., Lepretre, C., Pardon-Barthe, L., Chahory, S., Martin, E. (2008) *Biochem. Pharmacol.*, **76**, 1490–1502.
156. Fombonne, J., Padron, L., Enjalbert, A., Krantic, S., Torriglia, A. (2006) *Apoptosis*, **11**, 367–375.
157. Deng, G., Podack, E.R. (1995) *FASEB J.*, **9**, 665–669.
158. Gaido, M.L., Cidlowski, J.A. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 18580–18585.
159. Cande, C., Vahsen, N., Kouranti, I., Schmitt, E., Daugas, E., Spahr, C., Luban, J., Kroemer, R.T., Giordanetto, F., Garrido, C., Penninger, J.M., Kroemer, G. (2004) *Oncogene*, **23**, 1514–1521.
160. Pandey, S., Walker, P.R., Sikorska, M. (1997) *Biochemistry*, **36**, 711–720.
161. Hughes, Jr. F.M., Evans-Storms, R.B., Cidlowski, J.A. (1998) *Cell Death Differ.*, **5**, 1017–1027.
162. Yoshida, A., Urasaki, Y., Waltham, M., Bergman, A.C., Pourquier, P., Rothwell, D.G., Inuzuka, M., Weinstein, J.N., Ueda, T., Appella, E., Hickson, I.D., Pommier, Y. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 37768–37776.
163. Dyrkheeva, N.S., Khodyreva, S.N., Lavrik, O.I. (2007) *Mol. Biol. (Mosk)*, **41**, 450–466.
164. Yoshida, A., Pommier, Y., Ueda, T. (2006) *Int. J. Hematol.*, **84**, 31–7.
165. McGrath, L.B., Onnis, V., Campiani, G., Williams, D.C., Zisterer, D.M., Mc Gee M.M. (2006) *Apoptosis*, **11**, 1473–1487.
166. Chowdhury, D., Beresford, P.J., Zhu, P., Zhang, D., Sung, J.-S., Demple, B., Perrino, F.W., Lieber, J. (2006) *Molecular Cell.*, **23**, 133–142.
167. Lieberman, J. Gramzyne, A. (2010) *Immunol. Rev.*, **235**, 93–104.
168. Parra, D., Manils, J., Castellana, B., Viña-Vilaseca, A., Morán-Salvador, E., Vázquez-Villoldo, N., Tarancón, G., Borràs, M., Sancho, S., Benito, C., Ortega, S., Soler, C. (2009) *Cancer Res.*, **69**, 6676–6684.
169. Bass, B.P., Tanner, E.A., Mateos San Martín, D., Blute, T., Kinser, R.D., Dolph, P.J., McCall, K. (2009) *Cell Death Differ.*, **16**, 1362–1371.
170. Nezis, I.P., Shrivage, B.V., Sagona, A.P., Lamark, T., Bjørkøy, G., Johansen, T., Rusten, T.E., Brech, A., Baehrecke, E.H., Stenmark, H. (2010) *J. Cell Biol.*, **190**, 523–531.
171. Vanden Berghe, T., Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., Guerin, C.J., Brunk, U.T., Declercq, W., Vandenebeele, P. (2010) *Cell Death Differ.*, **17**, 922–930.
172. Higgins, G.C., Beart, P.M., Nagley, P. (2009) *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 2773–2787.
173. Conradt B., Xue D. *WormBook* (2005) Ed. The C. elegans Research Community, *WormBook*. 1–13. doi/10.1895/wormbook.1.32.1, <http://www.wormbook.org>.
174. Parrish, J.Z., Xue, D. (2003) *Mol. Cell.*, **11**, 987–996.
175. Lai, H.J., Lo, S.J., Kage-Nakadai, E., Mitani, S., Xue, D. (2009) *PLoS ONE*, **4**, e7348.
176. Aruscavage, P.J., Hellwig, S., Bass, B.L. (2010) *PLoS ONE*, **5**, e11217.
177. Hsiao, Y.-Y., Nakagawa, A., Shi, Z., Mitani, S., Xue, D., Yuan, H.S. (2009) *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 448–457.
178. Yang, C.C., Wang, Y.T., Hsiao, Y.Y., Doudeva, L.G., Kuo, P.H., Chow, S.Y., Yuan, H.S. (2010) *RNA.*, **16**, 1748–1759.
179. Хавинсон В.Х., Федорева Л.И., Ванюшин Б.Ф. (2011) *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, **151**, 76–81.