

УДК: 576.371

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНЕЛЛ ПРИ АПОПТОЗЕ

Е.С. Снигиревская*, Я.Ю. Комиссарчик

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

* Эл. почта: snigir@incras.ru

Статья поступила в редакцию 26.04.2018; принята к печати 20.06.2018

Гибель клеток в результате генетически запрограммированных процессов апоптоза принимает участие не только в эмбриогенезе и гистогенезе, но также является фактором патогенеза многих заболеваний, в том числе вызываемых факторами окружающей среды, и может индуцироваться ими. В последнее время на первый план вышли исследования молекулярных механизмов апоптоза. В настоящем обзоре основное внимание уделено современным данным об ультраструктурных особенностях основных клеточных органелл и об их изменениях в процессе апоптоза, в том числе перестройкам компонентов интерхроматинового пространства ядра, а также участию убиквитин-протеасомной системы в апоптозе.

Ключевые слова: апоптоз, внутриклеточные органеллы, ультраструктура, хроматин, электронная микроскопия, убиквитин-протеасомная система.

ULTRASTRUCTURAL CHANGED OF INTRACELLULAR ORGANELLES UPON APOPTOSIS

E.S. Snigirevskaya*, Ya. Yu. Komissarchik

Institute of Cytology, the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

* E-mail: snigir@incras.ru

Cell death caused by the genetically determined processes known as apoptosis is implicated not only in embryogenesis and cell and tissue turnover but also in the pathogenesis of many diseases including those induced by environmental factors and may be directly induced by some of the latter. In recent years, the elucidation of the molecular mechanisms of apoptosis was taking the central stage as reflected in a numerous reviews. The present review is focused on recent data about the ultrastructural features of cellular organelles upon apoptosis, including first of all the rearrangements of the interchromatin intranuclear space and the involvement of the ubiquitin-proteasome system in apoptosis.

Keywords: apoptosis, intracellular organelles, ultrastructure, chromatin, electron microscopy, ubiquitin-proteasome system.

Введение

Концепция апоптоза – клеточной смерти, механизм которой запрограммирован на генетическом уровне, – была сформулирована в 1972 г. [72], хотя уже в середине XIX столетия явление локальной физиологической смерти клеток в ходе эмбриогенеза и метаморфоза у Metazoa было отмечено на гистологическом уровне такими известными учеными, как Фогт, Вейсман и Флеминг (см. обзор [95]).

Процесс апоптоза характеризуется высокой эволюционной консервативностью и наблюдается у всех эукариот, от простейших до высших организмов.

В любом многоклеточном организме поддерживаются строго сбалансированные процессы пролиферации одних клеток и смерти других. В организме человека ежедневно возникают и гибнут десятки миллиардов клеток. За год общий вес обновляемых клеток достигает веса тела.

Роль апоптоза чрезвычайно важна в период эмбрионального развития организма, а также в ходе диффе-

ренцировки и морфогенеза тканей. Известно, что в результате апоптоза полностью удаляются некоторые эмбриональные ткани, чтобы могли сформироваться новые, обеспечиваются важные аспекты развития и функционирования внутренних органов, в частности, иммунной системы. На более поздних стадиях развития апоптоз необходим как защитный механизм для элиминации дефектных (мутантных, инфицированных или поврежденных) клеток. В результате строго регулируемого процесса апоптоза клетка распадается на фрагменты, которые фагоцитируются макрофагами или соседними клетками [83]. Так как нарушения целостности мембраны клетки и ее фрагментов в ходе апоптоза не происходит, в этом месте не возникает воспалительная реакция, в отличие от того, что происходит при некрозе.

Нарушения процессов апоптоза лежат в основе различных патологических изменений организма. Так, снижение способности клеток претерпевать апоптоз может привести к развитию злокачественных опухо-

лей, вирусных инфекций, аутоиммунных заболеваний [7, 56, 70, 134], в то время как излишняя активизация апоптоза приводит к болезням Хантингтона, Паркинсона и Альцгеймера [51].

Возможен апоптоз, индуцированный внешними факторами: ультрафиолетовым или гамма-излучением, вирусной инфекцией, гипо- и гипертермией, токсическими веществами. Известно огромное количество экологических факторов, обуславливающих развитие многих заболеваний человека [1]. Накопление промышленных отходов приняло характер «токсической агрессии» [161]. Эти факторы способны вызывать отдаленные последствия, проявляющиеся в нарушении репродуктивной функции, развитии злокачественных опухолей, инфаркта миокарда, мозгового инсульта, нейродегенеративных и других заболеваний [14]. При этом увеличение дозы соответствующего вредного агента, индуцирующего апоптоз, в конце концов приводит к развитию некроза клетки, то есть нерегулируемого типа клеточной смерти. При некрозе клетка разрушается, и гидролитические ферменты, вышедшие из клеток, вызывают дальнейшее повреждение ткани и воспалительный процесс. Поэтому необходимо развивать методы ранней регистрации апоптоза при различных воздействиях среды и заболеваниях, включая морфологические методы с прижизненной окраской тканей и исследование их в световом микроскопе, а также методы электронной микроскопии [13].

Успехи в изучении апоптоза нашли отражение в целом ряде обзоров [33, 38, 40, 42, 43, 89, 90, 104, 134–136, 149, 166]. Установлены основные механизмы реализации апоптоза в эукариотических клетках, разработаны молекулярные и морфологические критерии апоптозной клеточной смерти, исследуются биохимические и молекулярные механизмы активации и регуляции апоптоза, идентифицированы сотни генов, которые контролируют инициацию, осуществление и терминальную фазу апоптоза. Использование модельных объектов (бесклеточные системы, различные клеточные культуры, нематода *Caenorhabditis elegans*) позволяет изучать различные стадии апоптоза в эксперименте. За открытия генетической регуляции развития нематоды *C. elegans* и программируемой клеточной смерти в этом процессе S. Brenner, R. Horvitz и J. Sulston в 2002 г. стали лауреатами Нобелевской премии в области физиологии или медицины [4].

В настоящем обзоре особое внимание будет уделено вкладу электронной микроскопии в изучение ультраструктурных изменений внутриклеточных органелл в процессе апоптоза.

Механизмы апоптоза

При физиологических условиях найти апоптозирующую клетку в ткани *in situ* довольно трудно, так

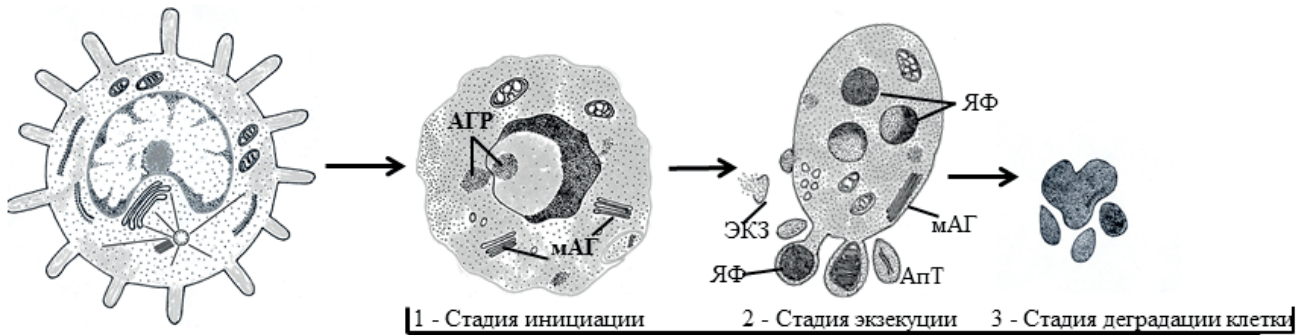
как гибель клетки происходит очень быстро. В связи с этим для изучения особенностей апоптоза в эксперименте широко используются модельные объекты, в частности, клеточные культуры, в которых можно индуцировать апоптоз, синхронизировать его и исследовать процессы затухания клеточных функций. Классическим модельным объектом стала мелкая нематода *Caenorhabditis elegans*, изучение которой привело к выводу о генетической природе и высокой консервативности путей программируемой клеточной смерти от нематоды до человека [35].

Известно, что апоптоз регулируется комплексом биохимических, молекулярных и генетических факторов, число которых увеличивается по мере их изучения современными методами исследования. К наиболее важным регуляторам этого процесса относят рецепторы клеточной смерти (death receptors) и их лиганды, каспазы, митохондрии, протоонкогены семейства Bcl-2, некоторые отдельные супрессоры канцерогенеза, такие как белок p53 и др. [174].

Полученные в последние годы данные позволяют выделить два механизма запуска апоптоза: один – внешний («extrinsic»), опосредованный рецепторами смерти (death receptors), которые локализованы в плазматической мембране (ПМ); второй – внутренний («intrinsic»), вызванный некоторыми внутриклеточными причинами. Наиболее распространенные из них связаны с окислительным стрессом, а также стрессом, который вызывает накопление неправильно свернутых белков в ЭР, приводящее к нарушению гомеостаза ионов кальция в ЭР. В свою очередь нарушения внутриклеточного гомеостаза ионов кальция (Ca^{2+}) обуславливают высвобождение и активацию прокаспазы-12, локализованной в ЭР, являясь еще одним способом инициации апоптоза [59, 134, 145].

Весь процесс программированной клеточной гибели условно можно подразделить на 3 фазы: 1 – инициация, 2 – осуществление апоптоза, или экзекуции, и 3 – терминальная стадия (схема 1).

В фазе инициации, при которой проапоптозный стимул запускает активацию ряда молекулярных механизмов, изменения морфологии клетки крайне слабые. В случае запуска апоптоза внешним лигандом «рецептора смерти» на этом этапе происходит транслокация фосфатидилсерина с внутренней стороны ПМ на клеточную поверхность (появление фосфатидилсерина на наружной стороне клетки может служить индикатором апоптоза) [141]. Затем происходит снижение трансмембранного потенциала митохондрий и экспрессии белков семейства Bcl-2, активация специфических инициаторных каспаз (каспазы 8 в случае рецептор-опосредованного апоптоза и каспазы 9 при митохондриальном пути), причем оба пути сходятся на уровне активации каспазы 3. Это сопровождается уменьшением клеточного объема и увеличе-



Нормальная клетка U-937

Клетки U-937 в состоянии апоптоза

Схема 1. Схема апоптоза, индуцированного в клетках U-937 внешними агентами (гипертонический шок, этопозид). Для нормальной клетки характерно большое количество микроворсинок на поверхности, крупное ядро с одним-двумя ядрышками, примембранным распределением гетерохроматина, хорошо развитым аппаратом Гольджи (АГ), отдельными цистернами ЭР и группами небольших митохондрий (МИ). В апоптотических клетках изображены агрегаты электронно-плотных частиц в ядрах и цитоплазме (Агр), фрагменты АГ (министопки – МАГ), экзосомы (ЭКЗ), апоптотические тела (АпТ), ядерные фрагменты (ЯФ). На терминальной стадии выявляются продукты деградации клетки



Схема 2. Схема путей апоптоза в клетке (объяснения в тексте). Модифицировано из [43]

нием клеточной поверхности. Затем клетки переходят в фазу осуществления апоптоза (execution), которая характеризуется вовлечением в процесс активации все большего количества каспаз и появлением заметных морфологических изменений ядер: конденсация хроматина, приводящая к формированию серповидных ядер, и последующая фрагментация ядра, сопровождающаяся деградацией ДНК. Расщепление каспазами белка, удерживающего деградирующую ДНК эндонуклеазу в неактивной форме, приводит к ее активации и фрагментации ДНК в клеточном ядре. При использовании метода TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) концы ДНК, образовавшиеся при ее расщеплении, выявляются флуоресцентной микроскопией. Кроме того, на этой стадии апоптоза происходит образование множества «волдырей» (blebs) на плазматической мембране и формирование апоптозных тел, содержащих внутриклеточные органеллы и фрагменты ядра. Третья фаза – фаза деградации (терминальная стадия) – сопровождается серьезными морфологическими перестройками, окончательной фрагментацией ядер и цитоплазмы клеток и распадом клеток на апоптозные тела (схема 2). Апоптозная смерть наступает в разное время после запуска сигнала (от 6 до 24 час) в зависимости от типа клеток [143].

Если эти события происходят в ткани, фрагменты клетки фагоцитируются макрофагами или соседними клетками. В клеточной же культуре они накапливаются в среде [81, 145]. Все эти события происходят без возникновения воспаления, которое бывает при некрозе и некоторых других типах клеточной смерти в результате выхода клеточных гидролитических ферментов во внеклеточное пространство.

Внешний путь апоптоза

Основная роль в запуске апоптоза по внешнему сигнальному пути принадлежит «рецепторам смерти», локализованным на плазматической мембране клеток. Эти белки относятся к суперсемейству рецепторов TNF (tumor necrosis factor) [88]. Их цитоплазматические домены содержат участки, состоящие из 80 аминокислот, так называемые «домены смерти» («death domain») [18]. Именно они играют критическую роль в передаче сигнала смерти от клеточной поверхности к внутриклеточным сигнальным путям. В настоящее время лучше всего охарактеризованы следующие рецепторы и их лиганды: TNFL/TNFR1, FasL/FasR, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 and Apo2L/DR5 [18, 131]. Последовательность событий внешнего пути можно рассмотреть на примере моделей FasL/FasR и TNF/TNFR1. В этих моделях наблюдается кластеризация рецепторов при связывании с тримерным лигандом. Соединение Fas-L (лиганда) с FasR (рецептором) приводит к связыванию адаптерного белка FADD,

а соединение TNF-L с TNF-R приводит к связыванию адаптерного белка TRADD и рекрутированию адаптерного белка FADD вместе со взаимодействующей с рецепторами протеин-киназой RIP (схема 2). На этом этапе образуется индуцирующий смерть сигнальный комплекс (death-inducing signal complex, DISC), приводящий к активации прокаспазы 8 [73]. Как только каспаза-8 активируется, запускается фаза осуществления апоптоза.

Внутренний путь апоптоза

Кардинальное событие внутреннего пути апоптоза – повышение проницаемости наружной мембраны митохондрий – MOMP (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization), основными регуляторами которого являются белки, относящиеся к семейству Bcl-2 [32, 39]. Важно подчеркнуть, что эти белки в зависимости от условий могут быть как проапоптозными (Bim, Bid, Bax, Bak), так и антиапоптозными (Bcl-2, Bcl-x, Mcl-1) регуляторами [102]. Для белков Bax и Bak предполагается следующий путь действия (схема 2) [66]. Они встраиваются в наружную мембрану митохондрий и олигомеризуются. Этот сигнал способствует деполяризации наружной мембраны митохондрий и высвобождению в цитоплазму из пространства митохондрий растворимых белков, участвующих в апоптозе: цитохром C; прокаспазы 2, 3 и 9; флавопротеин AIF (apoptosis inducing factor). В цитозоле цитохром C формирует комплекс с APAF1 (apoptotic inactive initiator caspase activating factor-1), АТФ и неактивной прокаспазой 9, так называемую «апоптосому» [63, 100, 151]. Внутри апоптосомы каспаза 9 активируется и в свою очередь активирует прокаспазу 3 до каспазы 3. Активация каспаз совершается каскадом, который приводит к активации каспаз 3, 6 и 7 путем протеолиза [101]. Эффекторные каспазы расщепляют друг друга, что усиливает и распространяет каспазный каскад.

Таким образом, каспазы могут считаться центральными медиаторами апоптоза в цитоплазме. Каспазы – это цистеиновые протеазы, которые активируются и осуществляют апоптозную деградацию, включая деградацию ДНК и перестройку морфологии клеток. Имеются два типа каспаз: инициаторные и эффекторные. Активированные инициаторные каспазы активируют эффекторные, которые и обеспечивают расщепление клеточных белков и ДНК. При этом клетки зачастую приобретают фантастические формы. Это может быть связано со сверхэкспрессией каспаз, нарушающих формирование связанного с мембраной актинового цитоскелета, который в норме важен для сохранения формы клетки. Более того, каспазы расщепляют и другие цитоскелетные протеины, в частности, плексин и гельзолин, белки ядерной ламины, белки, регулирующие клеточную адгезию [135]. Таким образом, одна из функций эффекторных

каспаз – это прямое и опосредованное разрушение клеточных структур. Другой важной функцией эффекторных каспаз является инактивация белков, блокирующих апоптоз. В частности, разрушению подвергаются антиапоптозные белки семейства Bcl-2; при участии каспаз расщепляется ингибитор белка DFF (DNA fragmentation factor – «фактор фрагментации ДНК»), препятствующий активации апоптозной ДНКазы CAD (caspase-activated DNAase). Наконец, в результате действия эффекторных каспаз происходит диссоциация регуляторных и эффекторных доменов, участвующих в репарации ДНК, сплайсинге мРНК и репликации ДНК.

Следует отметить, что одним из ключевых регуляторов апоптоза является белок p53, активация которого происходит в ответ на повреждения ДНК [3, 119]. В норме белок p53 находится в неактивной, латентной форме. В случае необратимых повреждений ДНК или нарушений регуляции клеточного цикла белок p53 принимает участие в запуске апоптоза путем взаимодействия с промотором гена белка Вах, а также путем активации модулятора апоптоза PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis), который блокирует действие антиапоптотического Bcl-2. Повышение уровня p53 в ответ на повреждения ДНК вызывает апоптоз, например, в клетках кожи, в тимоцитах, в клетках кишечного эпителия.

Многочисленные исследования с помощью световой и электронной микроскопии позволили разработать критерии морфологических изменений при входе клеток в апоптоз и подтвердили идею эволюционной консервативности пути осуществления программируемой клеточной смерти.

В настоящем обзоре мы рассмотрим вклад электронной микроскопии в изучение регуляции процесса апоптоза внутриклеточных органелл и продемонстрируем происходящие с ними ультраструктурные изменения, выявляемые с помощью различных методов электронной микроскопии.

Следует отметить, что внутриклеточные органеллы являются не только источниками регуляторных молекул, создающих сигнальные пути апоптоза, но и сами представляют собой мишени для воздействия регуляторных факторов. Важно, что при апоптозе, который является энергозависимым процессом, функции клеточных органелл затухают, в основном, на терминальных этапах апоптоза, тогда как на стадиях инициации и осуществления апоптоза многие ключевые ферментные системы активизируются, способствуя поддержанию высокоэнергетического состояния клетки.

Апоптоз и ядро

Наиболее характерные морфологические перестройки при инициации апоптоза наблюдаются в

клеточном ядре [2, 23, 27–31, 33, 47, 48]. Рассмотрим ультраструктуру ядра клетки на примере клеток культуры человеческой гистиоцитарной лимфомы U-937 [8, 9, 154–156]. Эти клетки имеют все признаки культивируемых лимфоцитов, а именно – сферическую форму и большое количество микроворсинок на поверхности (схема 1; рис. 1а). Они содержат крупное ядро, часто двухлопастное, занимающее центральную часть клетки. Между лопастями ядра обычно располагается аппарат Гольджи (АГ), удерживающий свое центральное положение в клетке посредством микротрубочек (МТ), отходящих от центриолей (рис. 1б). Ядро содержит одно или два ядрышка и гетерохроматин, распределенный вдоль ядерной оболочки. Ядерная оболочка состоит из двух мембран, пронизанных ядерными порами, и подстилается так называемой ядерной ламиной, состоящей из промежуточных филаментов – ламинов 1, 2 и 3. Ядерная ламина поддерживает ядерную оболочку и контактирует с хроматином и ядерными РНК [15]. При индукции апоптоза внешними агентами (гипертонический шок, этопозид) в ядрах клеток U-937 появляются ультраструктурные перестройки, аналогичные тем, которые описаны на стадии инициации и осуществления апоптоза на других клетках [31, 33, 69, 80, 82, 87, 106, 128, 143, 154, 155, 165]. Одной из ранних реакций ядра является сильная конденсация хроматина и его дислокация на одном из полюсов ядра в виде полумесяца или серпа (схема 1; рис. 1в). Часть ядер фрагментируется, ядрышки исчезают, интерхроматиновые компоненты ядра перераспределяются (схема 3; рис. 1г, д, е). К ним относятся ответственные за транскрипцию и сплайсинг мРНК агрегаты интерхроматиновых гранул (speckles), первичные транскрипты мРНК – перихроматиновые фибриллы (PFs) и перихроматиновые гранулы (запасная форма мРНК) (PGs) (схема 3).

Перечисленные интерхроматиновые компоненты формируют агрегаты, свободно лежащие в нуклеоплазме, часто вблизи ядерной оболочки. Аналогичные агрегаты, лишённые ограничивающей мембраны, наблюдаются и в цитоплазме апоптозных клеток (схема 3; рис. 1д, е; рис. 2а, б). При этом в ряде случаев ядерные и цитоплазматические агрегаты связаны друг с другом в области ядерных пор, что указывает на переход ядерных компонентов в цитоплазму. Эти агрегаты можно отнести к типу так называемых гетерогенных эктопических РНП-содержащих структур HERDS (heterogeneous ectopic RNP-derived structures), описанных при конститутивном апоптозе клеток различных органов грызунов, находящихся в спячке [24, 25, 27, 30]. И ядерные, и цитоплазматические агрегаты, содержащие различного рода белковые частицы ядерного происхождения, не ограничены мембраной и рассматриваются в литературе как морфологические маркеры ослабления транскрипционных процес-

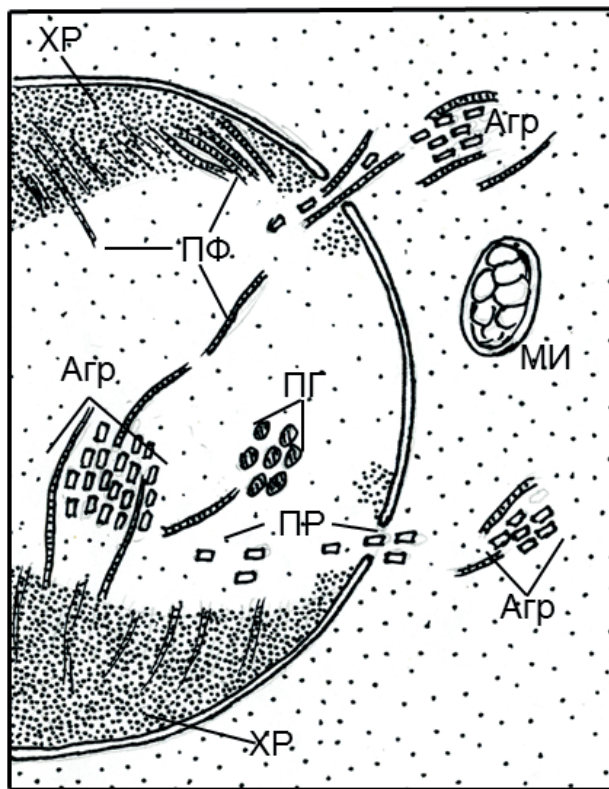


Схема 3. Схематически изображено апоптозное ядро клетки на этапе осуществления апоптоза. Показаны два участка конденсированного гетерохроматина (ХР), по периферии которого формируются первичные транскрипты мРНК – перихроматиновые фибриллы (ПФ). В интерхроматиновом пространстве образуются агрегаты, состоящие из ПФ и протеасом (Агр), а также из перихроматиновых гранул (ПГ). Аналогичные агрегаты наблюдаются и в цитоплазме клеток, что говорит о миграции их компонентов через ядерные поры

сов в клетке [26, 27, 57, 60, 91, 110, 148, 155, 167]. Следует отметить, что при физиологической модуляции транскрипции, как в случае спячки у грызунов, потенциально функциональные мРНК аккумулируются в ядерных агрегатах апоптозных клеток, но когда транскрипция восстанавливается, они начинают нормально функционировать [21, 24, 25, 27]. При индуцированном апоптозе эти изменения необратимы.

Таким образом, в состав ядерных агрегатов входят интерхроматиновые гранулы, первичные пре-мРНК, РНП и протеасомы, выявляемые иммунологическими методами при использовании световой и электронной микроскопии (рис. 2а, б; рис. 4а, б). Предполагается, что протеасомы осуществляют протеолитическую деградацию компонентов агрегатов как в ядре, так и в цитоплазме. Имеющиеся в литературе данные указывают на то, что в ядре протеасомная активность 20S локализуется в области крапинок «speckles» и про-

миелоидных лейкемических тел (PMLs) [20, 139, 172]. При переходе протеасом в цитоплазму они продолжают функционировать как протеолитические органеллы 26S в составе убиквитин-протеасомной системы (УПС) [20, 144, 146, 176].

Кроме протеасом в цитоплазму транспортируются и перихроматиновые фибриллы (ПФ), где они из пре-мРНК созревают в мРНК и, соединяясь с белками, образуют мРНК. Предполагается, что переход ПФ, так же как и протеасом, в цитоплазму происходит через ядерные поры [44, 45, 156, 157]. Это подтверждается исследованием ультратонких срезов, на которых видно, что исчерченные ПФ располагаются в области пор ядерной мембраны клеток, выявляясь со стороны как нуклеоплазмы, так и цитоплазмы (схема 3). В некоторых случаях можно наблюдать сечения ПФ, которые локализованы на выходе из порового комплекса в цитоплазму (не показано). Размер поровых комплексов достаточно большой (300–500 нм), чтобы эти структуры могли быть перенесены через них. Однако механизмы переноса протеасом и ПФ по нуклеоплазме и их переход в цитоплазму до сих пор до конца неясны.

Ядерные и цитоплазматические агрегаты существуют в апоптозных клетках вплоть до последней, терминальной, стадии апоптоза, на которой они выводятся во внеклеточное пространство с помощью довольно крупных (от 500 нм до 3–4 мкм) экзосом или вместе с апоптозными телами (схема 1) [154, 167].

В некоторых клетках в деградацию белковых компонентов включаются лизосомы. В этих случаях говорят о вторичном некрозе, при котором агрегаты заключаются в большие аутофагосомы, которые выделяются во внешнюю среду посредством разрушения клеток. Такие картины являются свидетельством существования кооперации между двумя способами протеолиза в клетке: посредством УПС и лизосом [12, 17, 112, 152].

В последние годы проблема агрегации протеинов и РНП в эукариотических клетках привлекает большое внимание в связи с интересом к молекулярным механизмам клеточного ответа на стресс, болезни и индуцированный апоптоз. В цитоплазме описано несколько типов агрегатов, лишенных ограничивающей мембраны: агросомы, процессинг-тельца (PBs), стресс-гранулы, PACS – particle-rich structures и только один тип описан в ядре – HERDS (heterogeneous ectopic RNP-derived structures), эти агрегаты возникают в ядре и затем переходят в цитоплазму [21, 23, 27, 30, 156, 157]. Следует отметить, что цитоплазматические агрегаты, которые содержат чрезмерно экспрессированные, неправильно сложенные или мутантные белки с ненормальной конфигурацией, накапливаясь в цитоплазме, оказывают токсичное действие на клетку. Тогда на помощь клетке приходит убиквитин-протеасомная система (см. ниже).

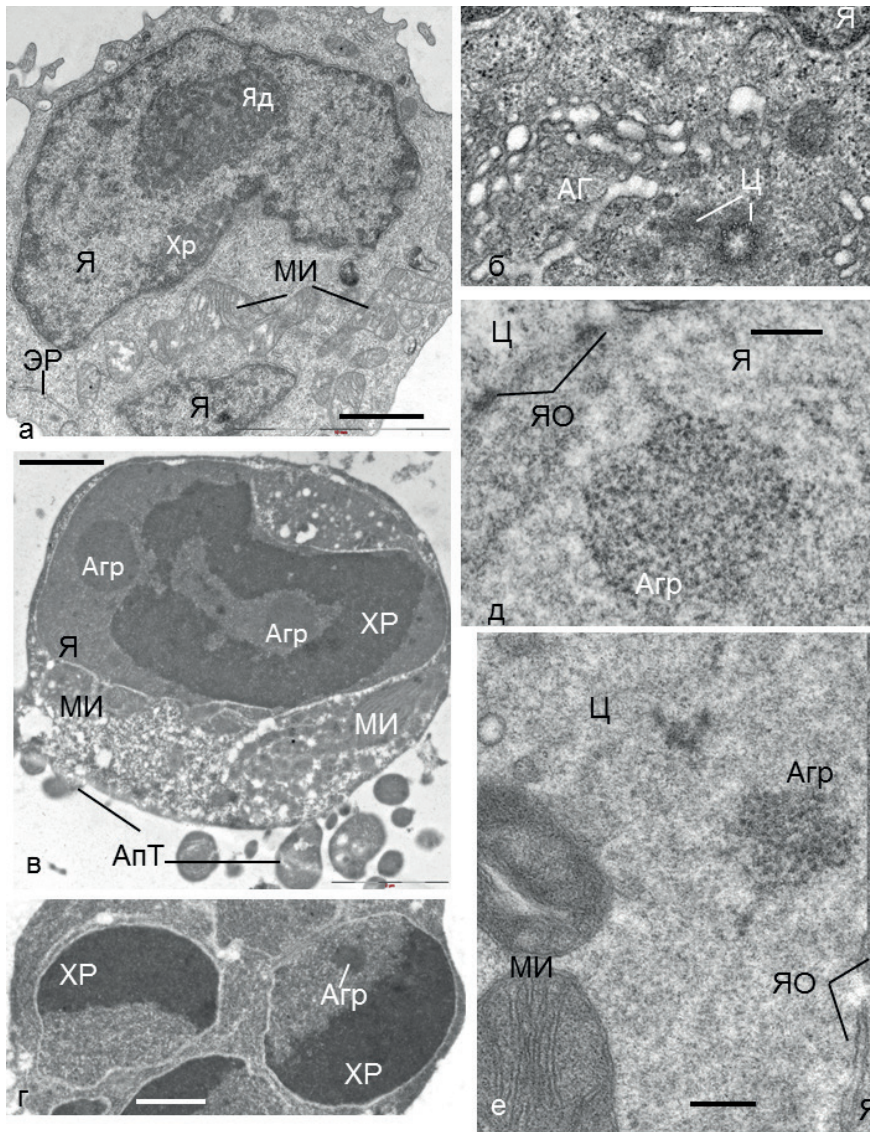


Рис. 1. Участки клеток U-937 в норме и при апоптозе: а – контрольная клетка содержит крупное ядро (Я), большое ядрышко (Яд). Митохондрии (МИ) распределены в цитоплазме группами; б – в околоядерной зоне локализуются аппарат Гольджи (АГ) и центриоли; в – апоптотическая клетка на стадии экзекуции: хроматин конденсируется, в интерхроматиновом пространстве появляются агрегаты; на поверхности клеток формируются апоптотические тела; г – часть ядер фрагментируется, формирование в ядре (д) и в цитоплазме агрегатов, не ограниченных мембраной. Масштаб: а, в, г – 500 нм; б, д, е – 200 нм

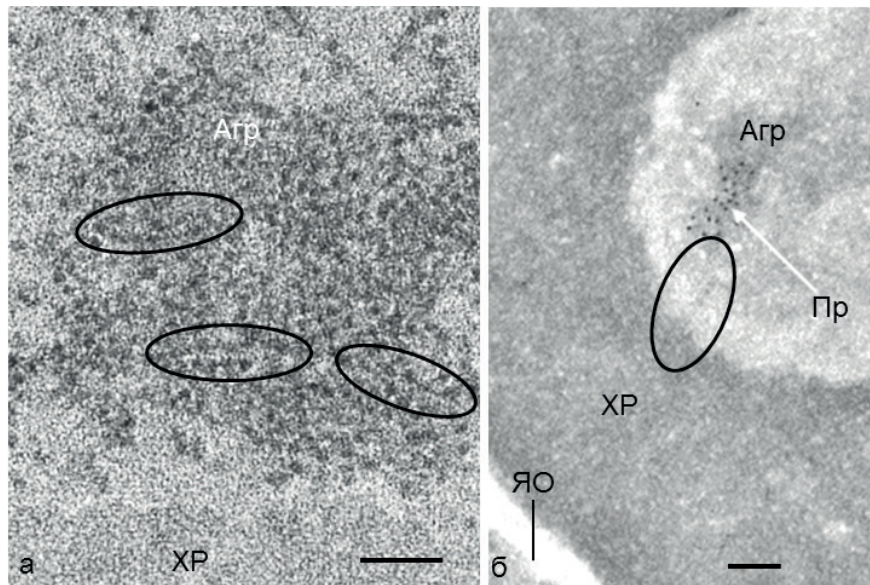


Рис. 2. Агрегаты в интерхроматиновом пространстве ядра, содержащие протеасомы и перихроматиновые фибриллы (ПФ). ПФ отмечены овальной линией, протеасомы содержат иммунную метку, конъюгированную с частицами золота 10 нм. Масштаб: 200 нм

Рис. 1 и 2 произведены из статьи [154] с разрешения издательства Elsevier.

Апоптоз и митохондрии

Митохондрии (МИ), наряду с каспазами и протеасомами, относятся к числу основных участников клеточных событий во время апоптоза. Они интегрируют многочисленные проапоптотные стимулы, инициируют апоптоз и реализуют основной сигнальный путь апоптоза независимо от того, каков был запуск этого процесса: внешний (рецептор-опосредованный) или внутренний (митохондриальный). Известно, что сигналы, исходящие от рецепторов смерти, связавшихся с соответствующим лигандом, стимулируют повышение проницаемости наружной мембраны митохондрий (MOMP – Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization) и способствуют высвобождению цитохрома С из межмембранного пространства. Цитохром С инициирует апоптоз как компонент апоптосомы, которая активирует каспазу 9. Последняя затем активирует другие эффекторные каспазы. В инициацию высвобождения цитохрома С наряду с проапоптотными белками включаются также различные сигналы от окислителей, церамида, высоких концентраций Ca^{2+} [78]. Однако вопросы, связанные с механизмами высвобождения цитохрома С и растворимых белков из митохондрий, до сих пор не решены окончательно. В литературе имеется несколько гипотез, объ-

ясняющих механизмы высвобождения цитохрома С и других растворимых белков из митохондрий.

Наиболее надежные ответы на эти вопросы может дать применение электронной микроскопии высокого разрешения. Прежде чем перейти к описанию результатов тонкого метода электронно-микроскопической томографии (ЭМТ), рассмотрим структуру митохондрий, описанную стандартными методами электронной микроскопии.

Митохондрии имеются во всех эукариотических клетках, занимая значительную часть цитоплазмы. Их главной функцией является сопряжение синтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата с аэробным окислением [107]. К тому же у митохондрий есть своя система синтеза белка, включая ДНК, РНК и рибосомы [46].

Начиная с 50-х годов прошлого века, когда были разработаны методы выделения митохондрий из клеток, начались интенсивные исследования этой органеллы биохимическими и морфологическими методами [121–123, 153]. Было показано, что митохондрии очень динамичные органеллы, изменяющие свою структуру в зависимости от физиологического статуса клетки. На ультраструктурном уровне были выделены две основные конформации МИ: ортодок-

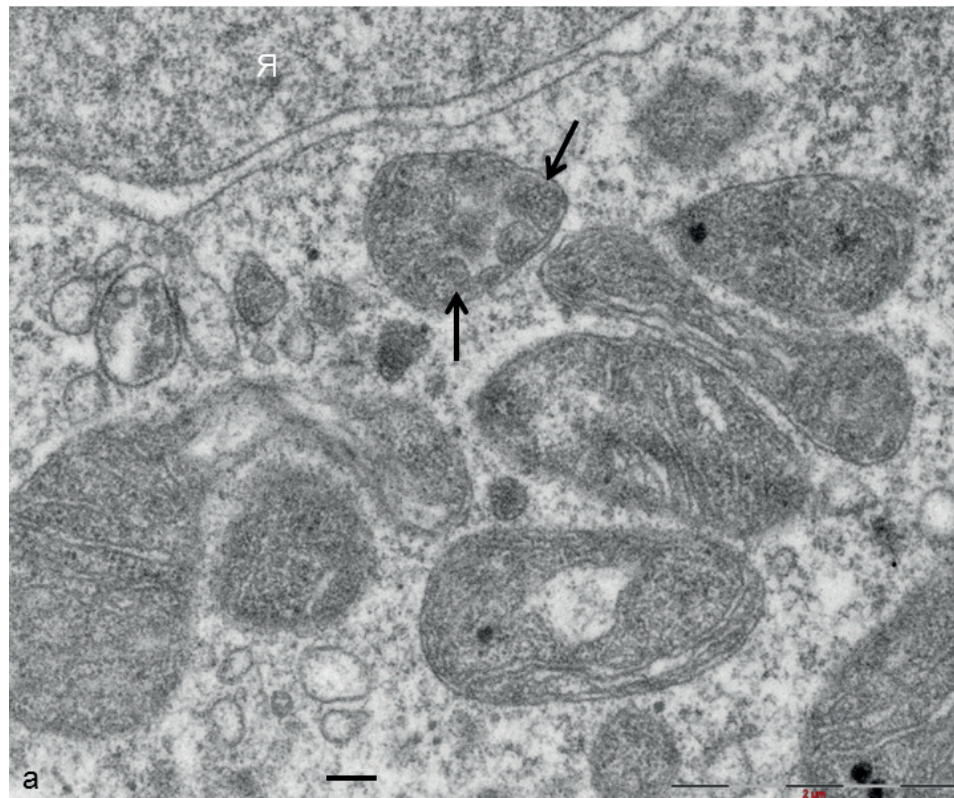


Рис. 3. Митохондрии апоптотной клетки имеют митохондрии смешанного типа. Типичная конденсированная митохондрия отмечена стрелками. Масштаб: – 200 нм. Воспроизведено из статьи [154] с разрешения издательства Elsevier.

сальная (нормальная) и конденсированная (в ответ на различные воздействия). Митохондрии ортодоксальной формы содержат длинные узкие и регулярно расположенные кристы и большой объем матрикса, тогда как в конденсированных МИ кристы расширяются, матрикс конденсируется (рис. 3).

На основании электронно-микроскопических работ были построены модели структуры МИ. До конца XX в. доминировала так называемая модель перегородок (baffle model) – модель, предложенная американским ученым Паладе, согласно которой в состав митохондрий входят две мембраны, из которых наружная мембрана окружает органеллу, отделяя ее от цитоплазмы, а внутренняя мембрана образует складки, называемые кристами, значительно увеличивающими ее поверхность [121]. Согласно Шестранду, существуют три мембраны: внешняя, внутренняя и мембрана септ [153]. Мембраны, матрикс и межмембранное пространство содержат огромное количество белков и липидов, играющих кардинальную роль в осуществлении функций МИ.

В последние годы представления о структуре МИ претерпели существенные изменения. Использование криометодов, методов электронно-микроскопической томографии и коррелятивной микроскопии позволило исключить ряд артефактов, связанных с химической фиксацией, получить изображение митохондрии, наиболее близкое к ее нативной структуре, и построить ее трехмерное изображение. Оказалось, что внутренняя мембрана митохондрий состоит из двух субкомпарментов: пограничная мембрана, располагающаяся на определенном расстоянии от наружной мембраны и повторяющая ее контуры, и связанная с ней мембрана, формирующая кристы [55, 84, 175].

Самое поразительное то, что обнаружены совершенно новые структуры во внутренней мембране митохондрий, так называемые «кристные контакты» – КК (cristae junctions), представляющие собой узкие каналы (30–50 нм в длину и диаметром от 12 до 40 нм), пронизывающие кристы и соединяющие их с пограничной мембраной [98, 175]. По мнению ряда авторов, эти структуры могут участвовать в регуляции скорости синтеза АТФ ограничением потоков АДФ [175]. Кроме того, предполагается, что эти «кристные контакты» могут регулировать диффузию больших протеиновых комплексов в липидном бислое внутренней мембраны, которые перераспределяются в плоскости внутренней мембраны при изменении функционального состояния митохондрий.

Однако существует и другая точка зрения в отношении функции этих каналов, связанная с ключевой ролью митохондрий в апоптозе. Согласно данным Скоррано и соавт. [147], во время апоптоза происходит перестройка внутренней мембраны митохондрий и, соответственно, кристных контактов, сопровожда-

ющаяся увеличением высвобождения цитохрома С из матриксного пространства. Вполне возможно, что молекулы цитохрома С размером 3 нм могут пересечь пограничную мембрану и оказаться в межмембранном пространстве митохондрии. Однако механизмы выхода этого и других растворимых белков (Вах и Вак) через наружную мембрану митохондрий до сих пор не получили достоверного объяснения.

В настоящее время существуют три гипотезы, объясняющие механизмы выхода цитохрома С из митохондрий [55]. При исследовании изолированных митохондрий было показано, что определенные стимулы, такие как высокие концентрации Ca^{2+} и/или окислителей, могут вызывать открытие высокопроводящего канала во внутренней мембране (кристные контакты), что приводит к потере электрохимического протонного градиента, и возникшая гиперосмолярность матрикса вызывает его расширение до такой степени, что это может разорвать внешнюю мембрану, через которую и происходит утечка цитохрома С.

Второй механизм предполагает формирование достаточно большой поры во внешней мембране, позволяющей выйти цитохрому С в цитозоль [55] [схема 4]. Исследуя структуру контрольных и апоптотных митохондрий в бесклеточной системе из Хепорус с помощью методов электронной микроскопии и электронно-микроскопической томографии, фон Азен и Фрей и соавт. продемонстрировали неповрежденную наружную мембрану, без разрывов, несмотря на потерю практически всего цитохрома С из митохондрий [16, 55]. В этих работах на реконструированных трехмерных картинах митохондрий четко выявляются выходы трубчатых КК в цитозоль. Эти результаты согласуются с идеей о том, что при высвобождении цитохрома С митохондрии, по-видимому, не теряют свой трансмембранный потенциал и продолжают импортировать белок, для чего требуются как трансмембранный потенциал, так и АТФ, а следовательно, и целостность мембраны [173].

Как было показано в работе Павлова и др. (2001), измерения проводимости наружной мембраны митохондрий согласуются с образованием поры диаметром 4 нм, что коррелирует с размером молекулы цитохрома и началом апоптоза [125].

Третья предполагаемая возможность объяснить выход цитохрома С – это влияние процессов деления и слияния митохондрий на апоптоз [5, 54, 85]. Известно, что проапоптотные белки Вах и Вак нарушают проницаемость наружной мембраны митохондрий и облегчают высвобождение цитохрома С. Обнаружен интересный факт: во время апоптоза белки Вах и Вак способствуют фрагментации митохондрий, возможно, путем активации механизма деления. В связи с этими данными было высказано предположение, что для выделения цитохрома С из митохондриального

межмембранного пространства требуется индуцированное этими белками митохондриальное деление. Этот вопрос до сих пор является предметом обсуждения. Шеридан и соавт. [150] показали, что белок Bcl-xL, так же как и другие члены семейства Bcl-2, ингибирующего апоптоз, противодействуют выходу цитохрома С, индуцированному Вах и/или Вак, но не блокируют фрагментацию митохондрий, связанную с активацией белков Вах и Вак. Эти данные свидетельствуют о том, что индуцированная Вах/Вак перестройка митохондрий и выход цитохрома С являются различными событиями и что белки семейства Bcl-2 могут влиять на динамику слияния митохондрий, не зависящую от апоптоза.

Апоптоз и протеасомы

Внутриклеточные органеллы протеасомы были открыты всего лишь 50 лет тому назад [36, 60], причем, в отличие от остальных внутриклеточных органелл, протеасомы не сразу были визуализированы микроскопически. Однако косвенные данные четко указывали на то, что органеллы с подобной функцией должны быть в клетке. Действительно, оказалось, что лизосомы, которым отводилась основная роль в гидролизе внутриклеточных белков, не являются единственными органеллами, способными удовлетворить все потребности клетки по расщеплению белков. И в 1978 г. Голдберг на примере ретикулоцитов, лишенных лизосом, доказал существование другого пути деградации белков в клетке, а именно, АТФ-зависимой системы переваривания белка, отличной от лизосом. Это так называемая убиквитин-протеасомная система (УПС), основным участником которой и является протеасома [36, 60].

В последние годы показано, что основной объем клеточного белка деградирует именно с помощью УПС, тогда как лизосомная деградация белков составляет 10–20% всех перевариваемых клеткой белков. Белок убиквитин (от ubiquitous – вездесущий) широко распространен во всех клетках эукариот. Это небольшой белок (8,6 кДа), способный присоединяться к белкам-субстратам, предназначенным для переваривания протеасомой, и способствует доставке этих белков к ней [130].

Регуляторные молекулы, которые участвуют в программируемой клеточной смерти, идентифицированы как субстраты протеасом [91]. Среди первых обнаруженных субстратов оказались протеины с ядерными функциями, такие как циклины, ингибиторы циклин-зависимых киназ, факторы транскрипции (NF-kB, IκB, p53) [44, 45, 74].

Протеасомы – очень мелкие внутриклеточные органеллы, до недавнего времени не описанные на срезах материала, подготовленного для исследования в ЭМ стандартными и иммуноцитохимическими методами. И только с 2011 г. такие данные стали появляться в литературе [8, 116, 154, 157–159].

В ядрах в большинстве случаев протеасомы находятся в агрегатах, содержащих и другие частицы ядерного происхождения: интерхроматиновые гранулы (ИГ) и перихроматиновые фибриллы (ПФ) (схема 3; рис. 2б; рис. 4а, б). В цитоплазме апоптотных клеток наряду с агрегатами, содержащими протеасомы и ПФ, выявляются зоны, занятые свободно лежащими протеасомами [157]. Использование антител к белкам протеасомы (TSR2) демонстрирует принадлежность мелких палочковидных структур к этим органеллам (рис. 2б; рис. 4а, б) [8, 155, 157]. На терминальной

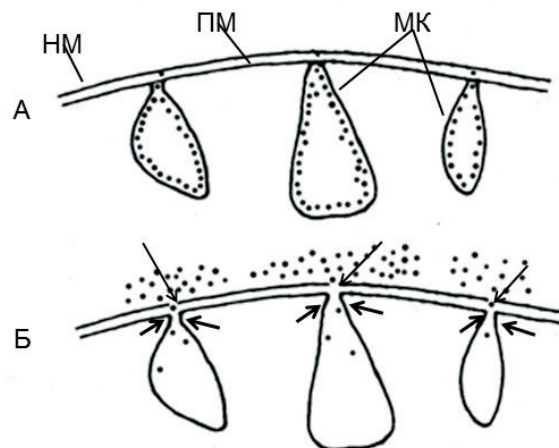


Схема 4. Схематическое изображение выхода цитохрома С из внутрикristного пространства митохондрий при индукции апоптоза различными агентами (А – клетка в норме, Б – апоптотная клетка). Предполагается, что при перекисном окислении липидов из внутренней мембраны митохондрий выходит кардиолипин, что способствует раскрытию «кristных контактов» (толстые стрелки) и высвобождению цитохрома С. Цит. С выходит в межмембранное пространство митохондрии и пересекает наружную мембрану через сформированные с участием Вак/Вах поры (тонкие стрелки) (модифицировано из [173])

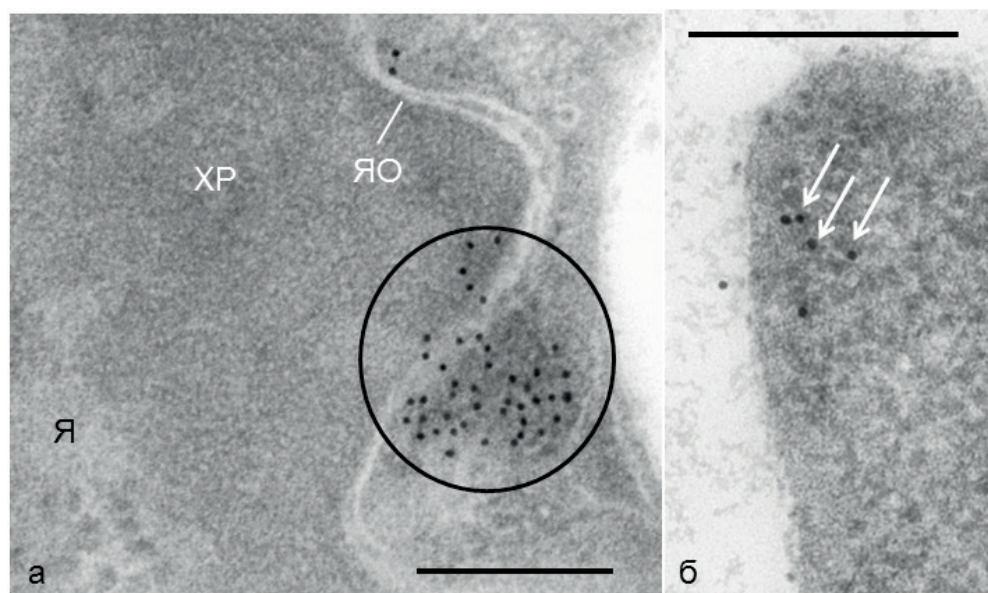


Рис. 4. Протеасомы, помеченные антителами к их белкам (TSR2) и вторичными антителами, конъюгированными с коллоидным золотом, локализуются как в ядре апоптотной клетки, так и в ее цитоплазме (а), а также в цитоплазме апоптотных тел (б). Масштаб: – 200 нм. Воспроизведено из статьи [11] с разрешения редакции журнала Цитология.

стадии апоптоза протеасомы высвобождаются из клеток посредством экзосом размером до 3–5 мкм [155, 157, 167] и могут попадать во внеклеточное пространство как свободные протеасомы, формируя в организме так называемый пул циркулирующих протеасом [7, 12, 176]. Исследования человеческой крови на предмет содержания в ней протеасом показывает, что их количество зависит от состояния здоровья людей. Количество циркулирующих протеасом в плазме здоровых людей намного ниже, чем при ряде заболеваний, таких как рак, различные аутоиммунные заболевания, метастазирующая меланома или острый псориаз и т. д. [176].

Обнаружено 2 типа протеасом: протеасома 20S, так называемая сердцевинная (core) частица, и протеасома 26S, содержащая в своем составе две регуляторные частицы 19S [169]. Именно эта увеличенная структура быстро разрушает белки, которые помечены для деградации убиквитином [36, 67, 91].

Большой интерес представляют собой так называемые деубиквитирующие белки (DUBs), которые способствуют круговороту убиквитина, а в некоторых случаях даже снятию убиквитинового сигнала с белка [137].

Для того чтобы понять механизмы функционирования внутриклеточной органеллы, совершенно необходимо знать ее тонкую организацию. Такие работы в отношении выделенных из клеток или плазмы крови протеасом стали проводиться с середины 1990-х гг. Основной вклад в построение структурной модели протеасом был внесен с помощью методов негативного контрастирования и высокоразрешающей криоэлек-

тронной микроскопии, а также рентгеноструктурного анализа и ряда биохимических и молекулярно-биологических методов исследования. Для построения модели использовались результаты изучения выделенных протеасом из представителей примитивных организмов архей, а позже и эукариот – от дрожжей до высших позвоночных [19, 61, 62, 70, 93, 176].

Итак, протеасома 20S – это полая цилиндрическая частица, состоящая из семи различных внешних α -субъединиц (α -кольцо) и из 7 различных β -субъединиц (β -кольцо). Каждое β -кольцо содержит три различных протеолитических сайта (на субъединицах $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$) [61, 109]. Все эти активные сайты направлены во внутреннюю камеру цилиндра, и субстраты попадают в нее только через воротные каналы в α -кольцах, которые слишком узки, чтобы через них переносились плотно упакованные глобулярные белки [53, 91]. Таким образом, в отличие от цитоплазматических протеаз, которые имеют легкодоступные активные сайты, протеасомы имеют активные сайты, которые заключены во внутренней полости сердцевинной частицы 20S, чем предотвращается неконтролируемая деструкция клеточных белков.

Эукариотические сердцевинные частицы содержат 6 активных сайтов, по три на каждом из двух центральных β -колец, и эти протеолитические сайты различаются по своей специфичности. Два из них, называемые «химотрипсиноподобными», разрезают белки преимущественно по гидрофобным остаткам и имеют свои каталитические остатки, локализованные на субъединице $\beta 5$. Два сайта, локализованные на субъединице $\beta 2$, являются «трипсиноподобными». Они

участвуют в расщеплении по основным аминокислотам. Два остальных сайта, локализованных на субъединице $\beta 1$, расщепляют пептидные связи, в основном, по кислым остаткам [11, 91]. Предполагается, что эти сайты – каспазоподобные.

Регуляторные комплексы 19S контролируют доступ субстратов в протеолитическую сердцевину. И эти две части рассматриваются как промежуточные элементы при формировании большой протеасомы 26S. Регуляторные частицы 19S содержат рецепторы для убиквитина и таким образом способствуют узнаванию субстрата. Убиквитин пришивается к рецептору, и прикрепленный к нему субстрат перемещается внутрь сердцевины. Каждая частица 19S состоит из основания и крышки [11]. Крышка, которая содержит, по крайней мере, 9 полипептидов, связывает полиубиквитиновую цепь с высоким сродством и отщепляет ее от субстрата. Основание, которое связано с частицей 20S, состоит из 8 полипептидов, включая 6 гомологичных АТФ-аз семейства AAA (ATPases Associated with a variety of cellular Activities) [86, 118]. Эти АТФ-азы взаимодействуют прямо с α -кольцами коровой частицы 20S, приводя к АТФ-зависимому открыванию канала в α -кольцах, что позволяет входу полипептидов в протеолитическую камеру частицы 20S [164].

АТФ-азы комплексов 19S, по-видимому, разворачивают полипептиды и катализируют их перенос в протеасому 20S. Протеасомы режут полипептиды во многих сайтах без высвобождения промежуточных полипептидов, генерируя таким образом пептиды от 3 до 22 остатков длины со средним размером до 6 пептидов [91]. Во время этого процесса недеградировавшие убиквитиновые молекулы высвобождаются частицами 19S для повторного использования в деградации других белков.

У высших позвоночных еще описаны так называемые неканонические протеасомы, у которых с коровой частицей связываются регуляторные субъединицы 11S [58], которые способствуют генерации наиболее коротких пептидов, и гибридные протеасомы, у которых могут присутствовать частицы и 11S, и 19S [75]. И те, и другие протеасомы участвуют в клеточном иммунном ответе.

В последние годы считается общепризнанной ключевая роль УПС в предотвращении злокачественного перерождения клеток. Оказалось, что компоненты УПС могут быть использованы как мишени при применении некоторых лекарственных веществ. В частности, учитывая возможность протеасомной деградации белка p53 (супрессора опухолей), которая индуцирует канцерогенез, можно использовать ингибиторы протеасом, которые могут задержать развитие опухоли. В качестве такого ингибитора был использован бортезомиб, который стал в последнее время одним из признанных лекарственных средств в борьбе с раком [138, 115].

Апоптоз и эндоплазматический ретикулум

Огромную роль в апоптозе играют и везикулярные элементы клетки, такие как эндоплазматический ретикулум (ЭР) и аппарат Гольджи (АГ). В многочисленных работах показано, что некоторые компоненты апоптозной «кухни» (death machinery), включая каспазу-2, каспазу-12, рецепторы смерти (DRs, Death Receptors) и члены семейства Bcl-2 локализуются на мембранах секреторного пути, включающего ЭР и АГ.

ЭР представлен системой каналов и цистерн, связанных между собой и с ядерной мембраной. Огромная мембранная поверхность ЭР в клетке обеспечивает ему выполнение ряда важнейших клеточных функций: синтез, запасание и транспорт синтезированных веществ. ЭР разделяется на два типа мембранных систем: шероховатый ЭР (шЭР) и гладкий ЭР (гЭР). В шЭР происходит синтез и модификация белков. Белок синтезируется на рибосоме и затем входит в полость ЭР, где происходит его модификация, а именно, гликозилирование. Синтезированный белок в везикуле направляется к следующему пункту процессинга, аппарату Гольджи (АГ). гЭР синтезирует фосфолипиды и стероидные гормоны, а также регулирует концентрацию внутриклеточного кальция и разрушает некоторые токсины [160].

Хорошо известно, что ЭР – это основное место свертывания (folding) незрелых белков, а также запасаения кальция [22]. Аккумуляция несвернутых белков, которые агрегируют внутри просвета ЭР, индуцирует известное в литературе явление ЭР-стресса. На этапе «осуществления» апоптоза цистерны ЭР разбухают и везикулируются [91].

Агрегация неправильно свернутых белков приводит к формированию нерастворимых структур более высокого порядка, которые могут быть неупорядоченными, как, например, в случае родопсина в пигментной области аутосомного ретинита, или упорядоченными, как амилоидные фибриллы в случае болезни Альцгеймера или неамилоидные фибриллы в случае дефицита $\alpha 1$ -антитрипсина. Показано, что аккумуляция неправильных белков и/или неправильных белковых агрегатов связана с многочисленными нейродегенеративными заболеваниями человека [133].

Чтобы выдержать ЭР-стресс, клетка активирует ответ типа UPR («unfolded protein response»), который включает повышение уровня белков-шаперонов, способствующих правильному фолдингу. Если этого оказывается недостаточно, UPR запускает внутренний путь инициации апоптоза клетки [33, 34, 68]. В том случае, когда ЭР выводится из стресса с помощью шаперонов, количество белков в ЭР уменьшается, а неправильно свернутые белки завершают правильный процесс фолдинга, выводя ЭР из стресса.

Апоптоз и аппарат Гольджи

Аппарат Гольджи (АГ) играет центральную роль в обработке (processing) и сортировке (sorting) синтезированных клеткой белков и липидов и их доставке к местам назначения. Он был обнаружен при световой микроскопии итальянским ученым Камилло Гольджи в клетках Пуркинье в 1898 г. Современный этап в изучении морфологии АГ с помощью электронной микроскопии (ЭМ) начинается с 1950-х гг. Были изучены детали ультраструктуры АГ, обнаружен векторный транспорт секреторных продуктов (антеро- и ретроградный), изучена его роль в гликозилировании веществ, секреторируемых клеткой, предложены модели его структуры и функции [49, 92, 105, 117, 123, 171].

Установлено, что АГ состоит из набора уплощенных мембранных цистерн, так называемых стопок (stacks), объединенных в ленту, окружающую часть ядра (схема 5а; рис. 5а) [6, 10, 49, 76, 77]. Структурная и функциональная целостность АГ поддерживается цитоскелетными элементами: микротрубочками (МТ) и микрофиламентами (МФ) и ассоциированными с ними макромолекулярными моторными белками. Цистерны удерживаются вместе на близком расстоянии (15 нм) структурными белками АГ: GRASP (Golgi Reassembly and Stacking Proteins) и гольджинами (Gol-

gins) вместе с их регуляторными ГТФ-азами, такими как ARF, ARL и семейство Rab. Кроме того, мембраны Гольджи содержат белки, регулирующие транспорт везикул к нужным компартментам, такие как ГТФ-связывающие белки и белки SNARE [124, 127].

АГ – очень динамичная структура, распадающаяся на фрагменты во время митоза в результате обратимого фосфорилирования его белков. По окончании митоза АГ снова быстро собирается [94, 170].

Но так же, как и другие внутриклеточные органеллы, АГ может быть подвержен и необратимой разборке. Среди факторов стресса, вызывающих необратимую разборку АГ, могут быть названы следующие: фармакологический и окислительный стресс, ингибирование О-гликозилирования, нарушение структуры МТ, фосфорилирование или расщепление структурных белков, повреждение ДНК, нейродегенеративные болезни, апоптоз.

Наиболее часто к апоптозу приводит окислительный стресс в ЭР, который вызывает необратимую опосредованную каспазами деградацию гольджинов [71]. В литературе есть данные о том, что на цитоплазматической поверхности АГ локализуется про-каспаза-2 [37, 92, 97], субстратом которой является гольджин-160. Расщепление этого гольджина приво-

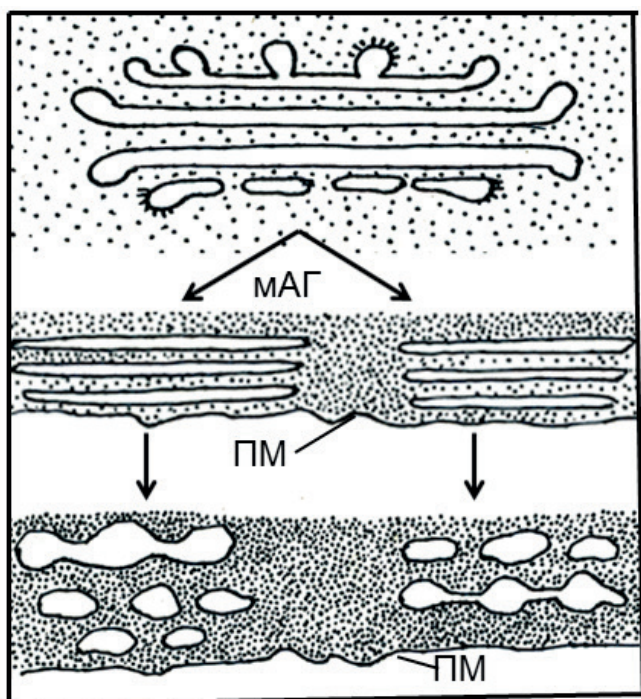


Схема 5. Схема изменений АГ в процессе апоптоза, индуцированного внешними агентами. На стадии осуществления апоптоза АГ распадается на мини-стопки (МАГ), которые мигрируют к клеточной поверхности. На терминальной стадии аппарат Гольджи необратимо везикулируется вблизи плазматической мембраны (ПМ)

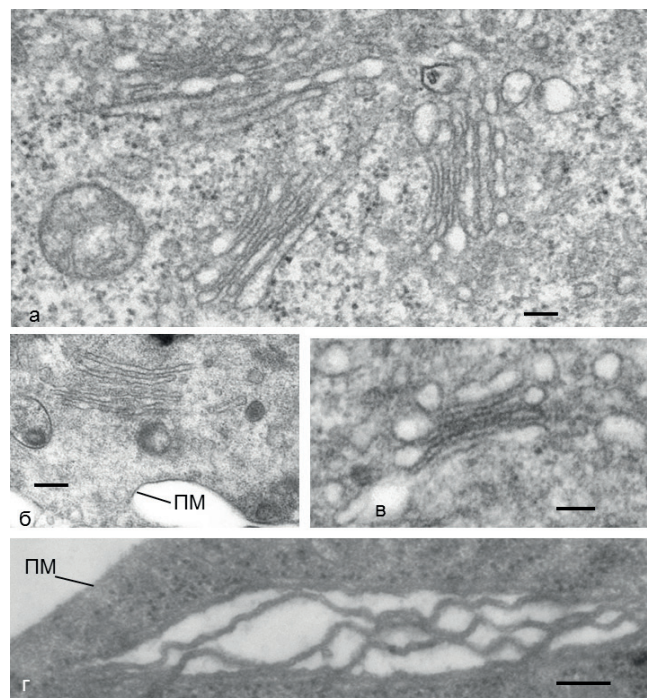


Рис. 5. а – Аппарат Гольджи клеток U-937 хорошо развит, располагается в околоядерной зоне. При входе клеток в апоптоз АГ мигрирует к клеточной поверхности, где распадается на отдельные мини-стопки (б, в) и везикулируется (г). Масштаб: 200 нм. Воспроизведено из статьи [11] с разрешения редакции журнала Цитология.

дит к ингибированию его транспортной функции [50]. Кроме того, показано, что происходит расщепление гольджиной GM130 и GRASP. При расщеплении их к-пазами также ингибируется их участие в транспорте переносимых ими белков. При этом происходит необратимая разборка АГ. Сначала стопки АГ распадаются на мини-стопки, а позже они везикулируются и распространяются по цитоплазме (схема 5; рис. 5а, б) [113, 157].

Другим стрессом, действующим на комплекс Гольджи, является ингибирование О-гликозилирования. Было показано, что оно индуцирует повышение активности белка теплового шока HSP47, выполняющего функции шаперона в ЭР [108]. HSP47, по-видимому, защищает клетки как от фрагментации АГ, так и от смерти, когда блокируется О-гликозилирование. Механизм, по которому HSP47 ведет к защите от стресса, неизвестен, но известно, что HSP47 является шапероном для коллагена [96]. HSP47 может регулировать количество этого секреторного белка, поступающего в АГ, тогда как в его отсутствие не О-гликозилированный коллаген может накапливаться в АГ, что приводит к его структурным нарушениям и апоптозу.

Кроме того, при серьезных нарушениях процессов гликозилирования многочисленные гликозилтрансферазы формируют специфические гликозилированные эпитопы, которые ассоциируются с прогрессией рака и метастатическим фенотипом клеток [52, 129, 132, 162, 163].

Цитоскелет

Цитоскелет присутствует во всех эукариотических клетках и является весьма динамичной структурой, меняющейся в зависимости от состояния клеток и условий, в которых они находятся. Цитоскелет представлен следующими элементами: актиновые микрофиламенты (АМ), промежуточные филаменты (ПФ) и микротрубочки (МТ) (рис. 6а, б).

Все эти три типа фибрилл вместе с ассоциированными с ними белками создают в клетке взаимосвязанную сеть, которая не только участвует в поддержании формы клеток и стабильного положения в цитоплазме некоторых внутриклеточных органелл, но важна для миграции клеток, а также для транспорта внутриклеточных органелл и везикул в пределах клетки. Актиновые микрофиламенты и промежуточные фила-

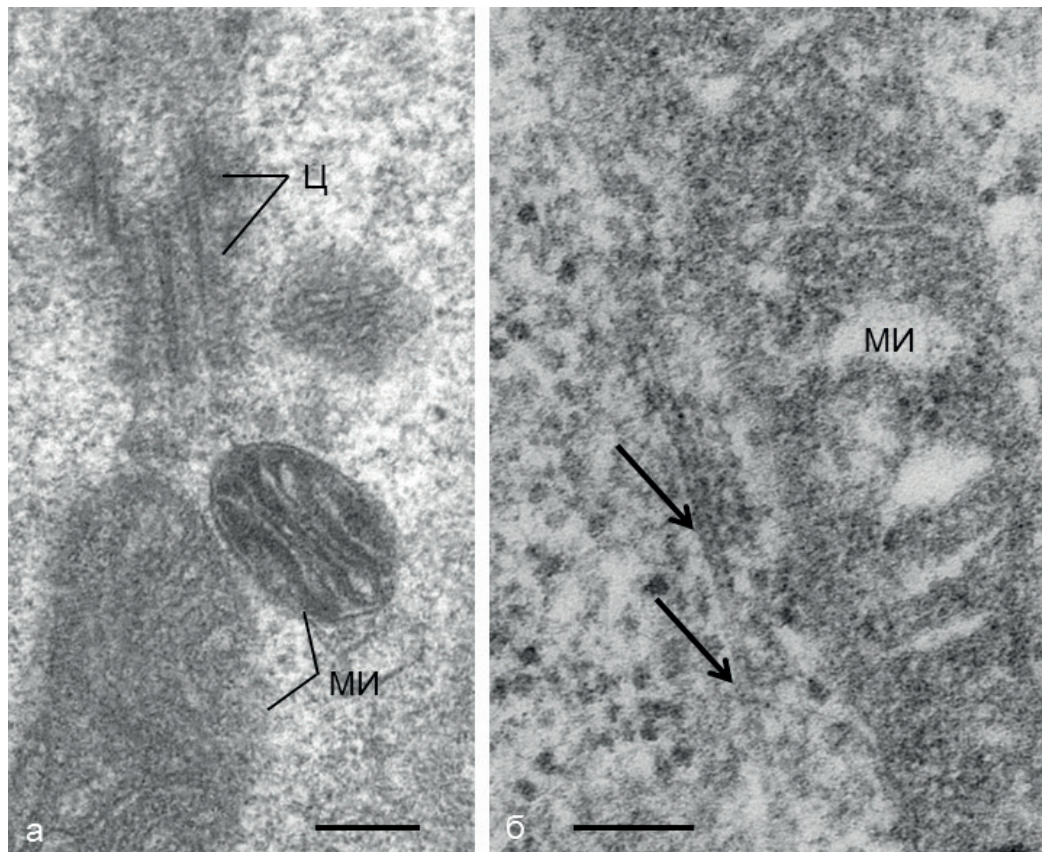


Рис. 6. Участки клеток, находящихся на стадии раннего апоптоза, когда микротрубочки и центриоли еще сохраняют свою целостность, тогда как митохондрии уже имеют конденсированную структуру. Масштаб: – 200 нм. Воспроизведено из статьи [154] с разрешения издательства Elsevier.

менты участвуют в межклеточных взаимодействиях, служа во многих случаях для передачи сигналов. При апоптозе цитоскелет быстро реагирует на изменившиеся физиологические условия. В первую очередь происходит реорганизация актинового цитоскелета, микрофиламентов. Уже на ранних этапах фазы осуществления апоптоза в клетках образуется актомиозинное сократительное кольцо, но вскоре МФ, так же как и ПФ, формирующие ядерную ламину, деполимеризуются [41, 99]. МТ разбираются несколько позже, но к концу фазы осуществления апоптоза МТ вновь собираются в цитоплазме апоптозных клеток и формируют плотные и толстые пучки под ПМ, так называемые AMN (apoptotic microtubule network) [120]. Относительно механизмов сборки МТ в апоптозной клетке пока не получено конкретных данных, однако можно предположить, что нуклеация МТ происходит на каких-то периферических внутриклеточных структурах [111]. Такие реполимеризованные МТ описаны в ряде клеточных линий при действии разных индукторов [111]. Эти пучки МТ образуют довольно плотную кортикальную структуру, окутывающую клетку под ПМ как «кокон». С учетом пространственной организации этой системы МТ можно полагать, что она образует структурный барьер, ограничивающий реакции деградации в клетке, и защищает целостность ПМ [120, 126]. Формирование этой структуры во время апоптоза, индуцированного антираковой терапией, гарантирует клетки от дополнительного повреждения и воспаления. Большой интерес представляет собой применение в целях лечения рака самих апоптозных клеток [64, 142]. Разработан метод стабилизации апоптозных клеток с помощью смеси стабилизатора МТ – таксола, ингибитора каспазы [Zn^{2+}] и антиоксиданта (коэнзим Q_{10} – CoQ).

Апоптоз и плазматическая мембрана

Роль плазматической мембраны (ПМ) в жизнедеятельности клетки невозможно переоценить. Среди множества белков и липидов, выполняющих различ-

ные функции, в ПМ могут присутствовать, как это было отмечено выше, специфические рецепторы смерти, относящиеся к семействам TNF и FAS и участвующие в реализации апоптоза: TNFRs и FASRa. Но этим роль ПМ в апоптозе не ограничивается. Фосфолипиды клеточных мембран могут действовать как модуляторы сигнальных путей, связанных с регуляцией таких клеточных процессов, как рост, адгезия, миграция, старение и клеточная смерть в форме апоптоза, аутофагии и некроза [40, 59, 65, 103, 140]. Показано, что сложные гликофинголипиды кластеризуются в липидных агломератах (рафтах) ПМ, где они взаимодействуют с рецепторами факторов роста, «рецепторами смерти», интегринами и ключевыми молекулами, такими как тетраспанины, кавиолины, и, следовательно, участвуют во внутриклеточном сигналинге и взаимодействиях клетка-клетка и клетка-матрикс.

Заключение

В обзоре представлены современные данные об ультраструктурных особенностях основных клеточных органелл в процессе апоптоза, рассмотрены как теоретические вопросы структурно функциональной организации клетки, переходящей в апоптоз, так и некоторые аспекты практического использования полученных данных.

Будущие исследования должны быть направлены главным образом на молекулярные механизмы, участвующие в регуляции взаимоотношений между клеточными органеллами – ядром, аппаратом Гольджи, эндоплазматическим ретикуломом, цитоскелетом, плазматической мембраной – при апоптозе. Адекватная интерпретация результатов таких исследований возможна только в контексте ультраструктурных данных об изменениях в этих органеллах. Поэтому необходимо и дальше развивать морфологические методы с прижизненной окраской тканей и исследования их в световом микроскопе, а также методы электронной микроскопии. Эти же методы могут быть полезными для регистрации апоптоза при различных заболеваниях и воздействиях среды.

Литература

Список русскоязычной литературы

1. Блинов ЛН, Перфилова ИЛ, Юмашева ЛВ. Экологическая обстановка и здоровье человека. В кн.: Всероссийский форум «Пироговская хирургическая неделя» к 200-летию Н.И. Пирогова. СПб.; 2010. с. 143-8.
2. Боголюбов ДС. Перихроматиновый компартмент клеточного ядра. Цитология. 2014;56:399-409.
3. Зайкова ЮЯ, Евтеева ИН, Цимоха АС. Протеасомы и их возможная роль во внеклеточном пространстве. Цитология, 2013;55:753-60.

4. Залесский ВН, Великая НВ. Методы ранней диагностики апоптоза *in vitro* и *in vivo* для оценки хронических эффектов токсикантов. Совр пробл токсикол. 2006;1:78-82.
5. Залесский ВН, Гавриленко ТИ. Апоптоз при ишемии и реперфузии миокарда. Врач дело. 2002;(1):815-6.
6. Збарский ИБ, Кузьмина СВ. Скелетные структуры клеточного ядра. М.: Наука; 1991.
7. Минуллина РТ, Фахруллин РФ, Ишмухаметова ДГ. *Caenorhabditis elegans* в токсикологии и нанотоксикологии. Вестник ВГУ, Сер Хим биол фармац. 2012;2:172-82.
8. Орлова ДД, Трибулович ВГ, Гарабаджиу АВ и др. Роль митохондриального морфогенеза в регуляции апоптоза. Цитология, 2015;57(3):184-91.
9. Соколова ЮЯ, Снигиревская ЕС, Комиссарчик ЯЮ. Аппарат Гольджи паразитических простейших (Обзор литературы). Цитология, 2007;49(3):163-81.
10. Снигиревская ЕС, Комиссарчик ЯЮ. Электронно-микроскопическое выявление протеасом в апоптотических клетках U-937. ДАН. 2014;454:733-6.
11. Снигиревская ЕС, Мошков АВ, Юринская ВЕ и др. Ультроструктурный и рентгеновский микроанализ клеток U937 при апоптозе, индуцированном гипертензией. Cell Tiss Biol, 2015; 9(2):96-109.
12. Снигиревская ЕС, Соколова ЮЯ, Комиссарчик ЯЮ. Структурно-функциональная организация аппарата Гольджи. Цитология. 2006;48(4):283-307.
13. Цимоха АС. Протеасомы: участие в клеточных процессах. Цитология. 2010;52(4):277-300.
14. Чумаков ПМ. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточных организмах. Успехи биологической химии. 2007;47:3-52.
15. Шашова ЕЕ, Колегова ЕС, Кондакова ИВ, Завьялов АА. Внутриклеточный и циркулирующий пулы протеасом: значение при злокачественных новообразованиях различных локализаций. Сиб онкол журн. 2015;(6):76-82.
4. Zalessky VN, Velikaya NV. [Methods of early diagnosis of apoptosis in vitro and in vivo for evaluation of chronic effects of toxicants]. Sovremennye Problemy Toksikologii. 2006;1:78-82. (In Russ.)
5. Zalessky VN, Gavrilenko TI. [Apoptosis at ischemia and myocardial reperfusion]. Vrachebnoye Delo, 2002(1):815-6. (In Russ.)
6. Zbarsky IB, Kuzmina SV. Skelentye Struktury Kletochnogo Yadra. [Skeletal Structures of Cell Nucleus]. M.: Nauka; 1991. (In Russ.)
7. Minullina RT, Fakhrullin RF, Ishmukhametova DG. [Caenorhabditis elegans in toxicology and nanotoxicology]. Vestnik VGU Ser. Khim Biol Pharm. 2012;2:172-82. (In Russ.)
8. Orlova DD, Tribulovich VG, Garabadzhiu AV et al. [The role of mitochondrial dynamics in regulation of apoptosis]. Tsitologiya. 2015;57(3):184-191. (In Russ.)
9. Sokolova YuYa, Snigirevskaya YeS, Komissarchik YaYu. [Golgi apparatus in parasitic protozoa: A Review]. Tsitologiya. 2007;49(3):163-81. (In Russ.)
10. Snigirevskaya YeS, Komissarchik YaYu. [Electron microscopic detection of proteasomes in apoptotic U-937 cells]. Dokl Ross Akad Nauk. 2014;454:733-6. (In Russ.)
11. Snigirevskaya YeS, Moshkov AV, Yurinskaya VYe et al. [Ultrastructural and X-ray analysis of U937 cells upon hypertension-induced apoptosis]. Cell and Tissue Biology, 2015;9(2):96-109. (In Russ.)
12. Snigirevskaya YeS, Sokolova YuYa, Komissarchik YaYu. [Structural and functional organization of Golgi apparatus]. Tsitologiya. 2006;48(4):283-307. (In Russ.)
13. Tsimokha AS. [Proteasomes: Their role in cellular processes]. Tsitologiya. 2010;52(4):277-300. (In Russ.)
14. Chumakov PM. [p53 protein and its versatile functions in multicellular organisms]. Uspekhi Biologicheskoy Khimii, 2007;47:3-52. (In Russ.)
15. Shashova YeYe, Kollegova YeS, Kondakova IV, Zavyalov AA. [The intracellular and circulating pools of proteasomes: Their significance in neoplasms having different locations]. Sibirskiy Onkologicheskii Zhurnal. 2015;6:76-82. (In Russ.)
16. Ahsen von O, Renken C, Perkins G et al. Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. J Cell Biol. 2000;150:1027-36.
17. Arden N, Betenbaugh MJ. Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. Trends Biotechnol. 2004;22:174-80.
18. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. Science. 1998;281:1305-8.

Общий список литературы/Reference List

1. Blinov LN, Perfilova IL, Yumasheva LV. [Ecological conditions and human health]. In: Vserossiyskiy Forum "Pirogovskaya Khirurgicheskaya Nedelia" k 200-Letiyu N.I. Pirogova. Saint Petersburg; 2010. p 143-8. (In Russ.)
2. Bogoliubov DS. [The perichromatin compartment of the cell nucleus]. Tsytologiya 2014;56:399-409. (In Russ.)
3. Zaykova YuYa, Yevteyeva IN, Tsymokha AS. [Proteasomes and their possible role in the extracellular space]. Tsitologiya, 2013;55:753-60. (In Russ.)

19. Babbit SE, Kiss A, Deffenbaugh AE et al. ATP hydrolysis-dependent disassembly of the 26S proteasome is a part of the catalytic cycle. *Cell*. 2005;121:663-5.
20. Baldin V, Militello M, Thomas Y et al. A novel role for PA28g proteasome in nuclear speckle organization and SR protein trafficking. *Mol Biol*. 2008;19:1706-16.
21. Basello D, Cisterna B, Galimberti V et al. Ultrastructural cytochemistry as a tool for studying transcriptional mechanisms. In: Pellicciari C, de Bernardi F, de Carli L (eds.). *The Genome and Its Expression through the Microscope. The Legacy of Maria Gabriella Manfredi Romanini*. 2015; p. 35-44.
22. Bassik MC, Scorrano L, Oakes SA et al. Phosphorylation of Bcl-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *EMBO J*. 2004;23:1207-16.
23. Biggiogera M, Bottone MG, Pellicciari C. Nuclear ribonucleoprotein-containing structures undergo severe rearrangement during spontaneous thymocyte apoptosis. A morphological study by electron microscopy. *Histochem Cell Biol*. 1997;107:331-6.
24. Biggiogera M, Bottone MG, Scovassi AI et al. Rearrangement of nuclear ribonucleoprotein (RNP)-containing structures during apoptosis and transcriptional arrest. *Biol Cell*. 2004; 96:603-15.
25. Biggiogera M, Cisterna B, Bottone MG et al. Nuclear RNP and nucleolar-associated proteins during apoptosis: A politically correct form of segregation? *Dyn Cell Biol*. 2007;1:65-71.
26. Biggiogera M, Cisterna B, Spedito A et al. Perichromatin fibrils as early markers of transcriptional alterations. *Differentiation* 2008;76:57-65.
27. Biggiogera M, Bottone MG, Pellicciari C. Nuclear RNA is extruded from apoptotic cells. *J Histochem Cytochem*. 1998;46:999-1005.
28. Biggiogera M, Fakan S. Fine structural specific visualization of RNA on ultrathin 24, 25, sections. *J Histochem Cytochem*. 1998;46:389-95.
29. Biggiogera M, Fakan S. Visualization of nuclear organization by ultrastructural cytochemistry. *Meth Cell Biol*. 2008;88:431-49.
30. Biggiogera M, Pellicciari C. Heterogeneous ectopic RNP-derived structures (HERDS) are markers of transcriptional arrest. *FASEB J*. 2000;14:828-34.
31. Bonnano E, Tagliaferro G, Carlà EC et al. Synchronized onset of nuclear and cell surface modifications in U937 cells during apoptosis. *Eur J Histochem*. 2002;46:61-74.
32. Borner C. The Bcl-2 protein family: Sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*. 2003;39:615-47.
33. Bottone MG, Santin G, Aredia F et al. Morphological features of organelles during apoptosis: an overview. *Cells*. 2013;2:294-305.
34. Boya P, Cohen I, Zamzami N et al. Endoplasmic reticulum stress-induced cell death requires mitochondrial membrane permeabilization. *Cell Death Differ*. 2002;9:465-67.
35. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1974;77:71-94.
36. Ciechanover A, Hod Y, Hershko A. A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1978;81:1100-05.
37. Chiu R, Novikov L, Mukherjee S, Shields D. A caspase cleavage fragment of p115 induces fragmentation of the Golgi apparatus and apoptosis. *J Cell Biol*. 2002;159(4):349-57.
38. Cohen-Kaplan V, Livneh I, Avnil N et al. The ubiquitin-proteasome system and autophagy: Coordinated and independent activities. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016;79:403-18.
39. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: Roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003;22:8590-607.
40. Delbridge A, Strasser A. The Bcl-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Different*. 2015;22:1071-80.
41. Desouza M, Gunning PW, Stehn JR. The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis. *Bioarchitecture*. 2012;2:75-87.
42. Dewson G, Kluck RM. Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease. *Cell Health Cytoskelet*. 2010;2:9-22.
43. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
44. Enenkel C. Proteasome dynamics. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843:39-46.
45. Enenkel C. Proteasome dynamics: Will the territory of proteasomes be claimed by mitochondrial proteases under stress conditions? *Biochem Mol Biol J*. 2017;3:2-3.
46. Ernster L, Schatz G. Mitochondria: A historical review. *J Cell Biol*. 1981;91:227s-55s.
47. Fakan S. Perichromatin fibrils are in situ forms of nascent transcripts. *Trends Cell Biol*. 1994;4:86-90.
48. Fakan S. The functional architecture of the nucleus as analysed by ultrastructural cytochemistry. *Histochem Cell Biol*. 2004;122:83-93.
49. Farquhar G, Palade G. The Golgi apparatus (complex): From artifact to center stage. *J Cell Biol*. 1981;91:77-103.
50. Fava LL, Bock FJ, Geley S, Villunger A. Caspase-2 at a glance. *J Cell Sci*. 2012;125:5911-15.
51. Favaloro B, Allocati N, Graziano V et al. Role of apoptosis in disease, Aging. 2012;4:330-49.
52. Fernald K, Kurokawa M. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol*. 2013;23:620-33.

53. Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:477-513.
54. Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW et al. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Develop Cell.* 2001;1:515-25.
55. Frey TG, Renken CW, Perkins GA. Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1555:196-203.
56. Fulda S. Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer.* 2009;124:511-5.
57. Gallo C, Munro E, Rasoloson D et al. Processing bodies and germ granules are distinct RNA granules that interact in *C. elegans* embryos. *Dev Biol.* 2008;323:76-87.
58. Gao X, Li J, Pratt G et al. Purification procedures determine the proteasome activation properties of REGg (PA28g). *Arch Biochem Biophys* 2004;425:158-64.
59. Giussani P, Tringali C, Riboni L et al. Sphingolipids: Key regulators of apoptosis and pivotal players in cancer drug resistance. *Int J Mol Sci.* 2014;15:4356-92.
60. Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature.* 2003;426:895-99.
61. Groll M, Ditzel L, Löwe J et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the *Thermoplasma acidophilum* 20S proteasome in complex with protein substrates. *Nature.* 1997;386:463-71.
62. Groll M, Bochtler M, Brandstetter H et al. Molecular machines for protein degradation. *Chem Biochem.* 2005;6(2):222-56.
63. Hakem R, Hakem A, Duncan GS et al. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell.* 1998;94(3):339-52.
64. Hannani D. Extracorporeal photopheresis: Tolerogenic or immunogenic cell death? Beyond current dogma. *Front Immunol.* 2015;6:349.
65. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive Lipid signalling: Lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:139-50.
66. Heath-Engel HM, Shore GC. Regulated targeting of Bax and Bak to intracellular membranes during apoptosis. *Cell Death Differ.* 2006;13:1277-80.
67. Hershko A, Ciechanover A, Varshavsky A. Basic medical research award: The ubiquitin system. *Nat Med.* 2000;6:1073-81.
68. Hiramatsu N, Chiang W-C, Kurt T et al. Multiple mechanisms of unfolded protein response induced cell death. *Am J Pathol.* 2015;185:1800e-08e.
69. Hu R, Ma S, Li H et al. Effect of magnetic fluid hyperthermia on lung cancer nodules in a murine model. *Oncol Lett.* 2011;2:1161-4.
70. Huber EM, Basler M, Schwab R et al. Immun- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity. *Cell* 2012;148(4):727-38.
71. Jiang Z, Hu Z, Zeng L, Lu W, Zhang H, Li T, Xiao H. The role of the Golgi apparatus in oxidative Stress: Is this organelle less significant than mitochondria? *Free Rad Biol Med.* 2011;50:907-17.
72. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26:239-57.
73. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity dependent with the receptor. *EMBO J* 1995;14:5579-88.
74. Kisselev AF, Garcia-Calvo M, Overkleeft HS et al. The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites. *J Biol Chem.* 2003;278(38):35869-77.
75. Kloetzel PM, Souza A, Stohwasser R. The role of the proteasome system and the proteasome activator PA28 complex in the cellular immune response. *Biol Chem.* 1999;380:293-97.
76. Klumperman J. Transport between ER and Golgi. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12:445-9.
77. Klumperman J. Architecture of the mammalian Golgi. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 2011;3:a005181.
78. Korsmeyer SJ. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome C during apoptosis *Dev Cell* 2002;2:55-67.
79. Kotaja N, Sassone-Corsi P. The chromatoid body: A germ-cell-specific RNA processing centre. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:85-90.
80. Koyama T, Oike M, Ito Y. Involvement of Rho-kinase and tyrosine kinase in hypotonic stress-induced ATP release in bovine aortic endothelial cells. *J Physiol.* 2001;532 (3):759-69.
81. Krammer PH. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: Live and let die. *Adv Immunol.* 1999;71:163-210.
82. Lamparska-Przybysz B, Gajkowska B, Motyl T. Cathepsins and Big are involved in the molecular switch between apoptosis and autophagy in breast cancer MCF-7 cells exposed to Camptothecin. *J Physiol Pharmacol.* 2005;56:159-79.
83. Lane JD, Allan VJ, Woodman PG. Active relocation of chromatin and endoplasmic reticulum into blebs in late apoptotic cells. *J Cell Sci.* 2005;118:4059-71.

84. Lapajne J. Detailed Structure of Mitochondrion. Ljubljana; 2015.
85. Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opal in apoptosis. *Mol Biol Cell*. 2004;15:5001-11.
86. Leev C. ATP-dependent proteases degrade their substrates unraveling them from the degradation Signal. *Mol Cell* 2001;7:627-37.
87. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998;94:491-501.
88. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
89. Lockshin RA, Zakeri Z. Cell death in health and disease. *J Cell Mol Med*. 2007;11:1214-24.
90. Lopez J, Tait SWG. Mitochondrial apoptosis: Killing cancer using the enemy within. *Brit J Cancer*. 2015;112:957-62.
91. Low P. The role of proteasome in apoptosis. In: Srivastava R (ed.). *Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases: Molecular Mechanisms*. Vol 2. Totowa, NJ: Humana Press Inc.: 2007.
92. Lowe M, Lane JD, Woodman PG, Allan VJ. Caspase-mediated cleavage of syntaxin 5 and giantin accompanies inhibition of secretory traffic during apoptosis. *J Cell Sci*. 2004;117:1139-50.
93. Löwe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R. Crystal structure of the 20S proteasome from the Archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*. 1995;268:533-39.
94. Machamer CE. The Golgi complex in stress and death. *Frontiers Neurosci*. 2015;9:421-5.
95. Maghsoudi N, Zakeri Z, Lockshin RA. Programmed cell death and apoptosis—where it came from and where it is going. From Elie Metchnikoff to the control of caspases. *Exp Oncol*. 2012;34:146-52.
96. Mala JG, Rose C. Interactions of heat shock protein 47 with collagen and the stress response: An unconventional chaperone model? *Life Sci*. 2010;87:579-86.
97. Mancini M, Machamer CE, Roy S, Nicholson DW, Thornberry NA, et al. Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves Golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol*. 2000;149:603-12.
98. Mannella CA, Pfeiffer DR, Bradshaw PC et al. Topology of the mitochondrial inner membrane: Dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life* 2001;52:93-100.
99. Marceau N, Schutte B, Gilbert S et al. Dual roles of intermediate filaments in apoptosis. *Exp Cell Res*. 2007;313:2265-81.
100. Marsden VS, O'Connor L, O'Reilly LA et al. Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome C/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature*. 2002;419:634-7.
101. Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:63-7.
102. Martinou JC, Youle RJ. Which came first, the cytochrome C release or the mitochondrial fission? *Cell Death Differ*. 2006;3:1291-95.
103. Maurer BJ, Metelitsa LS, Seeger RC et al. Increase of ceramide and induction of mixed apoptosis/necrosis by N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide in neuroblastoma cell lines. *J Natl Cancer Inst*. 2009;91:1138-46.
104. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature* 2000;407:796-801.
105. Mironov AA, Beznoussenko GV, Polishchuk RS, Trucco A. Intra-Golgi transport: A way to a new paradigm? *Biochim Biophys Acta* 2005;1744:340-50.
106. Mita P, de Luca A, Abbro I, Dini, L. Ultrastructural analysis of apoptosis of U-937 cells conditioned medium. *Ital J Zool*. 2003;70:141-6.
107. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*. 1961;191:144-8.
108. Miyata S, Mizuno T, Koyama Y et al. The endoplasmic reticulum-resident chaperone heat shock protein 47 protects the Golgi apparatus from the effects of O-glycosylation inhibition. *PLoS One*. 2013;8:e69732.
109. Morris EP, da Fonesca PCA. High-resolution cryo-EM proteasome structures in drug development. *Acta Cryst*. 2017;D73:522-33.
110. Mosevitsky MI, Snigirevskaya ES., Komissarchik YaYu. Immunoelectronmicroscopic study of BASP1 and MARCKS location in the early and late spermatids. *Acta Histochem*. 2012;114:237-43.
111. Moss DK, Lane JD. Microtubules: forgotten players in the apoptotic execution phase. *Trends Cell Biol*. 2006;16:330-8.
112. Mueller O, Anlasik T, Wiedeman J et al. Circulating extracellular proteasome in the cerebrospinal fluid: A study on concentration and proteolytic activity. *J Mol Neurosci*. 2012;46:509-15.
113. Mukherjee S, Chiu R, Leung SM, Shields D. Fragmentation of the Golgi apparatus: An early apoptotic event independent of the cytoskeleton. *Traffic*. 2007;8(4):369-78.
114. Nawrocki ST, Carew JS, Dunner K et al. Bortezomib inhibits PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2005;65:11510-9.
115. Nawrocki ST, Carew JS, Pino MS et al. Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmic

- reticulum stress-mediated apoptosis. *Cancer Res.* 2005;65(24):11658-67.
116. Necchi V, Sommi P, Vanoli A et al. Proteasome particle-rich structures are widely present in human epithelial neoplasm: Correlative light, confocal and electron microscopy study. *PLoS One* 2011;6:e21.
 117. Neutra M, Leblond CP. Synthesis of the carbohydrate of mucus in the Golgi complex as shown by electron microscope radioautography of goblet cells from rats injected with glucose- H^3 . *J Cell Biol.* 1966;30:137-50.
 118. Nyquist K, Martin A. Marching to the beat of the ring: Polypeptide translocation by AAA+ proteases. *Trends Biochem Sci.* 2014;39:53-60.
 119. Oda E, Ohki R, Murasawa H et al. A Bcl-2 family C and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 2000;12:1053-8.
 120. Oropeso-Avila M, Vega AF, Maraver JG et al. Emerging roles of apoptotic microtubules during the execution phase of apoptosis. *Cytoskeleton.* 2015;72:435-46.
 121. Palade G. The fine Structure of mitochondria. *Anat Record.* 1952;114:427-51.
 122. Palade G. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem.* 1953;1:188-211.
 123. Palade GE. Intercellular aspects of the process of protein synthesis. *Science.* 1975;189:347-54.
 124. Paumet F, Brugger B, Parlati F et al. A t-SNARE of the endocytic pathway must be activated for fusion. *J Cell Biol.* 2001;155:961-68.
 125. Pavlov EV, Priault M, Pietkiewicz D et al. A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J Cell Biol.* 2001;155:725-31.
 126. Pavon D, Cordoba MA, Cotan D et al. Emerging roles of apoptotic microtubules during the execution phase of apoptosis. *Cytoskeleton.* 2015;72:435-46.
 127. Pelham HR, Rothman JE. The debate about transport in the Golgi: Two sides of the same coin? *Cell.* 2000;74:71-82.
 128. Pellicciari C, Bottone MG, Scovassi AL et al. Rearrangement of nuclear ribonucleoproteins and extrusion of nucleolus-like bodies during apoptosis induced by hypertonic stress. *Eur J Histochem.* 2000;44:247-54.
 129. Petrosyan A. Onco-Golgi: Is fragmentation a gate to cancer progression? *Biochem Mol Biol J.* 2015;1:6-11.
 130. Pickart CM. Back to the future with ubiquitin. *Cell* 2004;116:181-90.
 131. Pinkel D, Dyer MJ, Martinez-Climent JA. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B cell. *Blood* 2005;106:3214-22.
 132. Rajamahanty S, Alonzo C, Aynehchi S et al. Growth inhibition of androgen-responsive prostate cancer cells with Brefeldin A targeting cell cycle and androgen receptor. *J Biomed Sci.* 2010;17:5.
 133. Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis.* 2009;4:996-1007.
 134. Rastogi PR, Sinha RP. Apoptosis: Molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI J.* 2009; 8:155-181.
 135. Rathmell JC, Thompson CB. The central effectors of cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:781-828.
 136. Reece SE, Pollitt LC, Colegrave N, Gardner A. The meaning of death: Evolution and ecology of apoptosis in protozoan parasites. *PLoS Pathogens.* 2011;7(12):e1002320.
 137. Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:363-97.
 138. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J et al. A Phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med.* 2003;348:2609-17.
 139. Rockel TD, Stuhlmann D, Von Mikesz A. Proteasomes degrade proteins in focal subdomains of the human cell nucleus. *J Cell Sci.* 2005;118:5231-42.
 140. Ryland LK, Fox TE, Liu X et al. Dysregulation of sphingolipid metabolism in cancer. *Cancer Biol Ther.* 2011;11:138-49.
 141. Rysavy NM, Shimoda LMN, Dixon AM et al. Beyond apoptosis: The mechanism and function of phosphatidyl serine asymmetry in the membrane of activated mast cells. *BioArchitecture.* 2014;4:4-5.
 142. Saas P, Kaminski S, Perruche S. Prospects of apoptotic cell based therapies for transplantation and inflammatory diseases. *Immunotherapy.* 2013; 5:1055-73.
 143. Saraste A, Pulkki K. Morphological and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000;45:528-37.
 144. Savulescu AF, Glickman MH. Proteasome activator 200: the heat is on. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10:1-8.
 145. Schmitz I, Kirchhoff S, Krammer PH. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000;32:1123-36.
 146. Schreiber A, Peter M. Substrate recognition in selective autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Biochem Biophys Acta.* 2014;1843:163-81.

147. Scorrano L, Ashiya M, Buttle K et al. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome C during apoptosis. *Dev Cell*. 2002;2:55-67.
148. Scovassi AI, Torriglia A. Activation of DNA-degrading enzymes during apoptosis. *Eur J Histochem*. 2003;47:185-94.
149. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*. 2015;22:526-39.
150. Sheridan C, Delivani P, Cullen SP, Martin SJ. Bax or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release. *Mol Cell*. 2008;31:570-85.
151. Shiraishi H, Okamoto H, Yoshimura A, Yoshida H. ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *J Cell Sci*. 2006;119:3958-66.
152. Sixt SU, Peters J. Extracellular alveolar proteasomes: Possible role in lung injury and repair. *Proc Am Thorac Soc*. 2010;7:91-6.
153. Sjöstrand FS. The ultrastructure of cells as revealed by the electron microscope. *Int Rev Cytol*. 1956;5:455-533.
154. Snigirevskaya ES, Komissarchik YaYu. Ultrastructural analysis of human leukemia U-937 cells after apoptosis induction: Localization of proteasomes and perichromatin fibers. *Acta Histochem*. 2017;119:471-80.
155. Snigirevskaya ES, Mosevitsky MI, Komissarchik YaYu. The role of chromatoid bodies and cytoskeleton in differentiation of rat spermatozooids. *Cell Tissue Biol*. 2012;6(3):254-67.
156. Snigirevskaya ES, Moshkov AV, Komissarchik YaYu. Ultrastructural study and X-ray microanalysis of apoptotic lymphoma cells U-937. *Biochem Mol Biol J*. 2017;3(3):1-2.
157. Snigirevskaya ES, Moshkov AV, Yurinskaya VE et al. Ultrastructural and X-ray analysis of U937 cells in hypertension induced apoptosis. *Cell Tissue Biol*. 2015;9(2):96-109.
158. Solcia P, Sommi P, Necchi V et al. Particle-rich cytoplasmic structure (PaCS): Identification, natural history, role in cell biology and pathology. *Biomolecules* 2014;4:848-61.
159. Sommi P, Necchi V, Vitali A et al. PaCS is a novel cytoplasmic structure containing functional proteasome and inducible by cytokines/trophic factors. *PLoS One* 2013;8:e82560.
160. Szegezdi E, MacDonald DC, Ni CT, Gupta S, Samali A. Bcl-2 family on guard at the ER. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009;296:C941-53.
161. Suess MJ, Huismaus JW (Eds.) Management of Hazardous Waste. Copenhagen: WHO Regional Publication. European Series; 1993.
162. Sun JY, Yang H, Miao S, Li JP, Wang SW et al. Suppressive effects of swainsonine on C6 glioma cell in vitro and in vivo. *Phytomedicine*. 2009;16:1070-4.
163. Sun JY, Zhu MZ, Wang SW, Miao S, Xie YH et al. Inhibition of the growth of human gastric carcinoma in vivo and in vitro by swainsonine. *Phytomedicine*. 2007;14:353-9.
164. Tomko RJ, Jr, Hochstrasser M. Molecular architecture and assembly of the eucaryotic proteasome. *Annu Rev Biochem*. 2013;82:415-45.
165. Tu J-B, Ma R-Z, Dong Q, Jiang F, Hu X-Y et al. Induction of Apoptosis in Infantile Hemangioma Endothelial Cells by Propranolol. *Exp Ther Med* 2013; 6: 574-8
166. Urra H, Dufey E, Lisbona F, Rojas-Rivera D, Hetz C. When ER Stress reaches a dead end. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833:3507-17.
167. Van der Pol E, Boing AN, Harrison P et al. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol*. 2012;64:676-705.
168. Vasileva A, Tiedau D, Firooznia AM et al. Tdrd6 is required for spermiogenesis, chromatoid body architecture, and regulation of miRNA expression. *Curr Biol*. 2009;19:630-9.
169. Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: A molecular machine designed for controlled proteolysis. *Ann Rev Biochem* 1999;68:1015-68.
170. Wang Y, Seemann J. Golgi biogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3:a005330.
171. Witkos TM, Lowe M. Recognition and tethering of transport vesicles at the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol*. 2017;47:16-23.
172. Wojcik C, DeMartino GN. Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35:579-89.
173. Yamaguchi R, Perkins G. Dynamics of mitochondrial structure during apoptosis and the enigma of Opa. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1787(8):963-72.
174. Yang YL, Li CCH, Weissman AM. Regulating the p53 system through ubiquitination. *Oncogene*. 2004;23:2096-106.
175. Zick M, Rabl R, Reichert AS. Cristae formation – linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:5-19.
176. Zoeger A, Blau M, Egerer K, Feist E, Dahlmann B. Circulating proteasomes are functional and have a subtype pattern distinct from 20S proteasomes in major blood cells. *Clin Chem*. 2006;52:2079-86.