

*Mojemu Drogiemu Nauczycielowi, Profesorowi Lechowi Wojtczakowi,
z okazji Jego siedemdziesiątej rocznicy urodzin*

KONRAD S. FAMULSKI

*Molecular Oncology Program, Cross Cancer Institute
Edmonton, Alberta, T6G 1Z2, Canada*

UDZIAŁ ZAKWASZENIA WEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO W PROCESIE APOPTOZY

Fizjologiczna śmierć komórki jest powszechnym zjawiskiem występującym w organizmach wielokomórkowych (KERR i współaut. 1972). Tę odważną ale zupełnie zlekceważoną hipotezę zaproponował Andrew H. Wyllie 24 lata temu. Dopiero obserwacje dotyczące „koniecznej” śmierci komórek poczynione kilkanaście lat później przekonały niedowiarków i przyczyniły się do zmian w sposobie myślenia biologów i genetyków. Badając rozwój embrionalny *Caenorhabditis elegans* stwierdzono, iż w czasie jego trwania 131 komórek (12% całkowitej liczby komórek) specyficznie umiera w określonym czasie i miejscu (ELLIS i współaut. 1991). Innym przykładem jest proces eliminacji tymocytów niezdolnych do rozpoznania antygenów zgodności tkankowej, co zapobiega chorobie autoimmunologicznej (OSBORNE 1995). W ten sposób 97% tymocytów grasiczych jest wyeliminowanych w ciągu zaledwie pierwszych paru dni ich życia. Morfogeneza kończyn (selekcja właściwej liczby palców, np. u ssaków; KERR i współaut. 1972), regresja prostaty, resorbcja tkanek budujących gruczoły mleczne (KEER i współaut. 1972, ARENDS i WYLLIE 1991) czy eliminacja komórek (np. nerwowych, nabłonkowych) pozbawionych czynników warunkujących przeżycie (O'CONNOR i WYTENBACH 1974, RAFF i współaut. 1993, KOSEKI i współaut. 1992, MEREDITH Jr i współaut. 1993, FRISCH i FRANCIS 1994) są także związane ze śmiercią niepożądanymi komórek.

Celowe obumieranie komórek obserwuje się więc w takich przypadkach, jak embriogeneza, atrofia organów, eliminacja komórek genetycznie niesprawnych czy utrzymywanie dynamicznej równowagi w dojrzałych tkankach. Czynniki naturalnie wywołujące fizjologiczną śmierć komórki mogą czasami powodować wręcz nieuleczalne schorzenia. Niezwykle spektakularnym

przykładem może być tutaj mechanizm działania wirusa HIV. Uważa się, że pewne produkty białkowe kodowane przez genom wirusa wywołują bezpośrednio (w zainfekowanych) lub pośrednio (w niezainfekowanych komórkach) śmierć limfocytów T-CD4 pozytywnych (AMEISEN 1992, OYAIZU i PAHWA 1995). Uszczuplenie tej puli komórek powoduje niezdolność chorego organizmu do przeciwstawiania się infekcjom.

We wszystkich tkankach, które posiadają zdolność odnawiania się musi istnieć równowaga pomiędzy mitogenezą a śmiercią komórek. Zmiany genetyczne, powodujące zwiększenie tempa proliferacji bądź zakłócające proces eliminacji, będą rzutować na rozwój tkanek i mogą prowadzić do procesu nowotworzenia. Z kolei poznanie mechanizmów, które mogą prowadzić do wybiórczej eliminacji komórek (np. rakowych), może mieć podstawowe znaczenie w leczeniu wielu chorób (CANMAN i KASTAN 1995, CRAIG 1995, FISHER 1994, GREEN i MARTIN 1995, LEAKE i współaut. 1996, LOTHEM i SACHS 1996, McDONNELL i współaut. 1995, REED 1995, SCHULTE-HERMANN i współaut. 1995).

Proces usuwania komórek z tkanek organizmu przebiega nieustannie i jest zwany apoptozą (z greckiego apoptosis — zrzucanie liści). Charakteryzują go pewne stereotypy. Komórki eliminowane w trakcie apoptozy podlegają charakterystycznym zmianom morfologicznym. Tracą one kontakt z sąsiadami i zaokrąglają się. Endoplazmatyczne retikulum rozszerza się i łączy z błoną plazmatyczną. Objętość komórki drastycznie zmniejsza się, jądro jest bardzo skondensowane i z czasem rozpada się na kilka obłonionych tworów. Wreszcie cała komórka zostaje podzielona na wiele tak zwanych ciał apoptycznych, zawierających fragmenty jąder. Zawartość komórki nie uwalnia się do otaczającego środowiska, gdyż integralność błon jest

zachowana przez długi czas. Ciała apoptyczne są fagocytowane przez sąsiednie komórki lub makrofagi, bez wywołania odczynu zapalnego. Usuwane w ten sposób martwe komórki nie powodują zmian w strukturze tkankowej.

Apoptoza nie jest oczywiście jedynym zjawiskiem prowadzącym do śmierci komórki. Nekroza, termin zarezerwowany dla innych (niż apoptoza) typów śmierci komórek, to zdarzenie podczas którego komórka ulega degradacji w sposób bierny. Ulega ona lizie, czyli zawartość komórki uwalnia się do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, powodując tym samym odczyn zapalny i dalsze uszkodzenia sąsiadujących komórek. Nekroza powoduje więc rozległe zaburzenia w strukturze tkanek.

Apoptoza jest ogólnym terminem, który oznacza zmiany morfologiczne. Mechanizmy biochemiczne i genetyczne zachodzące na poziomie komórkowym określa się obecnie mianem „zaprogramowanej śmierci komórki” — PCD (programmed cell death). Trzeba tu jednak podkreślić, że ten termin nie obejmuje zjawisk związanych z procesem starzenia. Dlaczego mówimy o zaprogramowanej śmierci komórki, lub jak kto woli aktywnej śmierci czy śmierci samobójczej? Otóż jest to proces aktywny, regulowany (wywoływany) przez czynniki zewnątrzkomórkowe, które uruchamiają kaskadę wewnątrzkomórkowych sygnałów i prowadzą do ekspresji genów, których produkty działają specyficznym, prowadząc do PCD. Końcowe a więc nieodwracalne etapy śmierci komórki charakteryzują się przede wszystkim pojawieniem się aktywnych form specyficznych proteaz (VAUX i STRASSER 1996, PATEL i współaut. 1996) i nukleaz (BORTNER i współaut. 1995, EASTMAN 1995, KOKILEVA 1994, WALKER i SIKORSKA 1994, ZHIVOTOVSKY i współaut. 1994).

Genom komórkowy, kodujący fundamentalne programy życia komórki będzie, rzecz jasna, głównym celem układów zaangażowanych w aktywnej śmierci komórki. Sposób, w jaki może być degradowana chromatyna (proteoliza białek histonowych i niehistonowych, nukleoliza DNA), jest prawdopodobnie wyznaczony przez jej organizację strukturalną. I tak odłączenie chromatyny od miejsc przyczepu do jądrowej matriks (są to jednocześnie miejsca inicjacji syntezy DNA) będzie pierwszym krokiem na etapie wyłączenia podstawowych funkcji genomu i rozpoczęcia wielostopniowej degradacji DNA. Reakcje te będą prowadziły do PCD obserwowanej podczas końcowego różnicowania się komórek, czy PCD wywołanej stresem, na przykład genotoksycznym. Degradacja DNA podczas PCD następuje w charakterystyczny sposób. Wielkość fragmentów DNA odzwierciedla,

wydaje się, strukturalną organizację chromatyny w jądrze. Początkowo pojawiają się fragmenty o wielkości $50\text{--}300 \times 10^3$ par zasad i jej wielokrotności. Te różnej wielkości fragmenty odzwierciedlają organizację DNA w chromatynie i są wynikiem trawienia struktur rozetkowych, pętli i międzynukleosomalnych odcinków DNA (BORTNER i współaut. 1995, EASTMAN 1995, KOKILEVA 1994, WALKER i SIKORSKA 1994, GROMOVA i współaut. 1995).

Obecnie uważa się, że aktywacja endonukleaz jest wynikiem działania wewnątrzkomórkowych sygnałów przekazywanych. Z grubsza można je podzielić na te, których działanie jest związane ze zwiększeniem wewnątrzkomórkowego wapnia (MC CONKEY i ORRENIUS 1996, SCHWARTZMAN i CIDLOWSKI 1994) bądź ze zmniejszeniem wewnątrzkomórkowego pH (EASTMAN 1994, 1995).

Komórki zawierają wiele różnych endonukleaz, które potencjalnie mogą być zaangażowane w PCD. Początkowo zainteresowanie badaczy ogniskowało się na nukleazach zależnych od jonów Mg i Ca. Niemniej jednak okazało się, że wiele typów komórek nie posiada takich enzymów i że PCD może być wywołana bez wpływu na podwyższenie stężenia jonów wapnia w komórce.

Pierwsze badania prowadzone nad PCD komórek HL-60 wykazały, że apoptozie towarzyszy wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów H a nie jonów Ca (BARRY i współaut. 1993). Równoległe z obserwowaną degradacją DNA i zmianami morfologicznymi charakterystycznymi dla apoptozy pewna frakcja komórek wykazywała zakwaszenie. Wewnątrzkomórkowe pH tej populacji wynosiło 6,5. Wewnątrzkomórkowe zakwaszenie, będące wynikiem działania cytotoksycznych związków bądź wywołane usunięciem czynników wzrostowych, zaobserwowano w szeregu typach komórek (BARRY i EASTMAN 1992, MORANA i współaut. 1994, LI i EASTMAN 1995, RAJOTTE i współaut. 1992, REBOLLO i współaut. 1995).

Co powoduje wewnątrzkomórkowe zakwaszenie i jaka jest rola tego procesu w PCD? Należałoby tu zacząć od mechanizmów odpowiedzialnych za obniżenie pH w komórce. Frakcja komórek ulegających apoptozie musi w sposób aktywny regulować wewnątrzkomórkowe pH, gdyż jest ono niższe od wartości pH zewnątrzkomórkowego. Przy tym komórki te w dalszym ciągu zachowują swoją integralność, na co wskazuje utrzymywanie odwróconego gradientu jonów Ca. Tak więc zmiana pH komórkowego następuje w wyniku specyficznej regulacji homeostazy jonów H, która nie wpływa na homeostazę innych jonów (MADSHUS 1988).

Komórki regulują swoje wewnątrzkomórkowe pH dzięki wielu układom transportowym, z których najważniejsze są: antyporter Na^+/H^+ , ATP-azy H^+ i wymienniacz dwuwęglanów.

Antyporter Na^+/H^+ jest głównym mechanizmem odpowiedzialnym za usuwanie protonów z komórki. Białko to ma wysokie powinowactwo do jonów H przy pH 6,0 ale nie jest aktywne, gdy wewnątrzkomórkowe pH jest neutralne. Aczkolwiek czynniki wzrostowe bądź onkogeny potrafią stymulować antyporter, powodując jego aktywację nawet w obojętnym pH. Aktywacja ta prowadzi do alkalizacji cytoplazmy — znanego powszechnie zjawiska zapoczątkowującego proliferację komórek (VAIRO i współaut. 1992). Jak dochodzi do zwiększenia aktywności antyportera? Otóż sądzi się, że powoduje to fosforylacja tego białka katalizowana przez kinazę białkową C bądź kinazę zależną od mitogenów (SARDET i współaut. 1989, 1990, 1991). Z kolei wyniki prac poświęconych PCD sugerują, że w przypadku pozbawienia komórek czynników wzrostowych antyporter Na^+/H^+ nie jest w stanie przeciwstawić się obniżaniu pH komórek. Oznaczać by to mogło utratę powinowactwa antyportera do jonów H. Sytuacji tej można zaradzić podając komórkom czynniki wzrostowe lub estry forbolu. Są to znane aktywatory kaskady kinaz zależnych od mitogenów i kinazy białkowej C (gwoli wyjaśnienia trzeba tu podkreślić, że niektóre czynniki wzrostowe będą oddziaływać na komórkę poprzez aktywację tylko jednej z dróg, aczkolwiek nie można wykluczyć faktu, iż kinaza C reguluje aktywność pewnych kinaz szlaku mitogenowego; KOLCH i współaut. 1993). Zakwaszenie komórkowe raptownie ustępuje, a i degradacja DNA jest także zahamowana. Tak więc alkalizacja cytoplazmy spowodowana aktywacją antyportera przez estry forbolu lub czynniki wzrostowe ratuje komórki przed śmiercią. Natomiast zatrucie kinazy C staurosporyną przeciwdziała ratującemu działaniu wyżej wymienionych czynników (CACERES-CORTES i współaut. 1994, LI i EASTMAN 1995, MORANA i współaut. 1994, RAJOTTE i współaut. 1992, REBOLLO i współaut. 1995).

Aktywacja receptora Fas lub poddanie komórek naświetleniu ultrafioletem także powoduje zakwaszenie wnętrza komórki i degradację DNA (GOTTLIEB i współaut. 1996a). Utrzymanie lekko alkalicznego pH komórek zapobiegało PCD. Receptor FAS należy do dużej rodziny receptorów ligandów typu TNF (tumor necrosis factor), których funkcje polegają na transmitowaniu sygnałów wywołujących śmierć komórek (GILL i współaut. 1994, LYNCH i współaut. 1995). Uważa się obecnie, że głównym pośrednikiem wewnątrzkomórkowym tej drogi jest ceramid —

metabolit powstający w wyniku specyficznej hydrolizy sfingomielinu (OBEID i HANNUN 1995). Bardzo ważnym odkryciem było wykazanie, że związki cyto(gen)otoksyczne, takie jak: promieniowanie UV, promieniowanie γ czy nadtlenek wodoru także stymulują produkcję ceramidu prowadząc do aktywacji zależnych od ceramidu kinaz (VERHEIJ i współaut. 1996) i fosfataz białkowych (HANNUN i OBEID 1995, JARVIS i współaut. 1996), których działanie wywołuje PCD. Wiadomo również, iż ceramid aktywuje czynnik transkrypcyjny AP-1, którego rolę w PCD też się postuluje (SAWAI i współaut. 1995). Stąd, rzecz jasna, nie należy się dziwić, że dodanie samego ceramidu do komórek spowodowało zakwaszenie wewnątrzkomórkowe i degradację DNA (GOTTLIEB i współaut. 1996a).

Tak więc można zaproponować, że to między innymi defosforylacja (zachodząca dzięki zakłóceniu równowagi pomiędzy aktywnością kinaz i fosfataz białkowych) białek, na przykład antyportera Na^+/H^+ , powoduje rozpoczęcie procesu PCD manifestującego się wewnątrzkomórkowym zakwaszeniem, które z kolei prowadzi do aktywacji wrażliwych na niskie pH endonukleaz i ewentualnie do degradacji DNA (MORANA i współaut. 1996).

Interesujące dane przyniosły doświadczenia poświęcone roli białek G (białka wiążące GTP) w procesie PCD. Białka te pełnią kluczową rolę w przewodnictwie sygnałów komórkowych indukowanych przez czynniki wzrostowe czy hormony. Zasadniczą rolę w ich funkcji pełni posttranslacyjna modyfikacja — izoprenylacja, która jest odpowiedzialna za właściwą lokalizację i aktywność biologiczną białek G (CASEY 1992). Zahamowanie procesu izoprenylacji powoduje zakwaszenie wewnątrzkomórkowe, degradację DNA i wreszcie śmierć komórki. Aktywacja antyportera Na^+/H^+ przez estry forbolu, bądź odwrócenie inhibicji izoprenylacji przez mewalonian, powodowały podwyższenie komórkowego pH, zahamowanie degradacji DNA i zatrzymanie PCD (PEREZ-SALA i współaut. 1995). Należy tu dodać, iż bezpośrednio zahamowanie antyportera także powodowało degradację DNA. Białka G pośredniczą w regulacji pH komórki przez czynniki wzrostowe (MOOLENAAR i współaut. 1983, DHANASEKARAN i współaut. 1994). Stąd zahamowanie ich aktywności biologicznej naśladuje konsekwencje wywołane brakiem czynników wzrostowych, kulminujące się w PCD.

Natomiast protoonkogen Ras (białko wiążące GDP i GTP odpowiedzialne za zainicjowanie kaskady kinaz mitogenowych) i białko hamujące PCD-blc-2 (REED 1995) działają dokładnie w odwrotny sposób. Transfekcja komórek pro-

toonkogenem Ras powoduje podwyższenie wewnątrzkomórkowego pH (SCHWARTZ i współaut. 1990) i zahamowanie procesu PCD (OSTAD i współaut. 1996). Podobne efekty obserwowano w komórkach zainfekowanych wektorem ekspresji *bcl-2* (REYNOLDS i współaut. 1996, MEISENHOLDER i współaut. 1996).

Opisane powyżej obserwacje wskazują na zależność przyczynowo-skutkową pomiędzy PCD wywołaną pozbawieniem komórek czynników wzrostowych lub działaniem związków cyto(gen)otoksycznych a zmianą wewnątrzkomórkowego pH związaną ze specyficzną regulacją antyportera Na^+/H^+ . Najnowsze badania wskazują także na rolę ATPazy protonowej typu V (wakuolarniej) w homeostazie jonów H i PCD. Zaobserwowano mianowicie, że aktywacja tej pompy zapobiega wewnątrzkomórkowemu zakwaszeniu i degradacji DNA (GOTTLIEB i współaut. 1995a, 1996b). Postuluje się również, iż zakłócenie funkcji mitochondrialnego łańcucha oddechowego może spowodować obniżenie pH komórki i jej śmierć (SCHULTZE-OSTHOFF i współaut. 1993, WOLVELTANG i współaut. 1994). Całkiem zdumiewającej obserwacji dokonano badając komórki posiadające powszechnie spotykaną mutację w genie kodującym kanał chlorkowy typu CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator). Komórki te posiadają wyższe pH wewnątrzkomórkowe i nie są w stanie wydzielać chlorków i dwuwęglanów w odpowiedzi na stymulację przez cAMP. Zatrucie tych komórek cykloheksamidem czy inhibitorem topoizomerazy nie powodowało zakwaszenia cytoplazmy i degradacji DNA bądź kondensacji chromatyny, podczas gdy komórki posiadające właściwy fenotyp wykazywały charakterystyczne cechy apoptozy (GOTTLIEB i DOSANJAH 1996c). Natomiast zahamowanie aktywności kanału w zdrowych komórkach protegowało je przed zgubnym wpływem cytotoksyn.

W ostatnich latach zgromadzono obfite dane dokumentujące udział nukleaz w tak ważnych procesach, jak reperacja DNA czy apoptoza. Sugeruje się wręcz, że wielofunkcyjne endonukleazy biorące udział w procesach rekombinacji lub naprawy DNA mogą niszczyć genom, gdy jest on nie do naprawienia (FRASER 1994). Te mechanizmy umocniły się w drodze ewolucji po to, aby pomóc zachować właściwą strukturę genomu narażonego na niekorzystne wpływy środowiska.

Na dzień dzisiejszy niewiele wiadomo o endonukleazach aktywowanych przez obniżenie pH komórkowego (nazywanych dalej kwaśnymi endonukleazami). Generalnie rzecz biorąc są one zbliżone do DNAzy II (YASUDA i współaut. 1992), enzymu występującego w dużych ilo-

ściach w śledzionie oraz płynach fizjologicznych. DNAzę II i kwaśne endonukleazy charakteryzuje osiąganie optymalnej aktywności w kwaśnym pH (5–6), sposób hydrolizy wiązania fosfodwuestrowego pomiędzy sąsiadującymi resztami deoksyrybozy, w wyniku której powstają końce nie podlegające reakcji ligacji: 3'-fosforan; 5'-hydroksyl (FAMULSKI i współaut. 1995, HAROSH i współaut. 1991, SHIOKAWA i współaut. 1994) oraz zbliżony w niektórych przypadkach pozorny ciężar cząsteczkowy 28–35 kDa. W neutrofilach (GOTTLIEB i współaut. 1995b), komórkach CHO (BARRY i EASTMAN 1993) czy tymocytach (SHIOKAWA i współaut. 1994) kwaśna endonukleaza posiada ciężar cząsteczkowy właśnie w tych granicach. Natomiast w wątrobie, fibroblastach, komórkach HL-60 (FAMULSKI i współaut. 1994, 1995), mózgu (SUVARCZALA i współaut. 1994), limfoblastach (HAROSH i współaut. 1991) czy włóknach soczewki oka (TORIGLIA i współaut. 1995) ciężar tego enzymu wynosi 56–60 kDa. Podobnie jak DNAza II kwaśne endonukleazy są glikoproteinami. Istotną różnicą pomiędzy wyżej wymienionymi enzymami jest ich rozmieszczenie wewnątrzkomórkowe. Apoptotyczne nukleazy są znajdowane w jądrze komórkowym (BARRY i EASTMAN 1993, FAMULSKI i współaut. 1994, 1995, HAROSH i współaut. 1991, TORRIGLIA 1995), podczas gdy DNAza II jest enzymem lizosomalnym.

Istotnym argumentem przemawiającym na korzyść hipotezy, iż wewnątrzkomórkowe zakwaszenie jest bezpośrednio związane z PCD, jest zjawisko aktywacji endonukleaz podczas PCD. Aktywność kwaśnej endonukleazy o ciężarze 60 kDa ulega znacznemu (kilkakrotnemu) podwyższeniu, gdy komórki zostały poddane działaniu cyto(gen)otoksyn, takich jak promieniowanie UV i g, inhibitor topoizomerazy, nadtlenek wodoru lub były inkubowane z ceramidem (FAMULSKI i współaut. 1995, FAMULSKI i współaut. w przygotowaniu, SIKORA i FAMULSKI w przygotowaniu). Aktywacja enzymu jest związana ze zwiększeniem jego zawartości w stresowanych komórkach i kinetyka tej aktywacji pokrywa się z kinetyką degradacji DNA (SIKORA i FAMULSKI w przygotowaniu).

Listę białek aktywowanych przez niskie pH, które biorą udział w PCD, można uzupełnić o żelzolinę, transglutaminazę i kwaśną sfingomielinazę. Żelzolina jest białkiem regulującym strukturę cytoszkieletu (YIN i STOSSEL 1979). Jej zdolność do destabilizowania filamentów aktynowych może wywoływać obserwowane podczas apoptozy zmiany w cytoszkielecie. Z kolei transglutaminaza katalizuje sieciowanie białek także obserwowane w umierających komórkach (TARSA i współaut. 1992).

Na szczególną uwagę zasługuje tutaj kwaśna sfingomielinaza. Ten cytozolowy enzym wiąże się do karboksylowego końca receptora TNF umiejscowionego w błonie plazmatycznej i inicjuje PCD poprzez raptowną produkcję ceramidu (WIEGMAN i współaut. 1994, SANTANA i współaut. 1996). Aktywacja kwaśnej sfingomielinazy jest także wywołana przez receptor Fas (CIFONE i współaut. 1993, 1995) i promieniowanie γ (SANTANA i współaut. 1996). Powstający ceramid gwałtownie stymuluje kinazę SAPK/JNK, co prowadzi do apoptozy (VERHELJ i współaut. 1996). Stąd nasuwa się tu pytanie, czy obniżenie pH komórkowego pierwotnie powoduje

aktywację sfingomielinazy, czy podtrzymuje aktywność na drodze dodatniego sprzężenia zwrotnego.

Biorąc pod uwagę ścisły związek istniejący pomiędzy PCD a wewnątrzkomórkowym zakwaszeniem można zaryzykować stwierdzenie, że komórki posiadają specyficzny zestaw enzymów, białek strukturalnych i być może czynników transkrypcyjnych, które są wymagane do katalizy śmierci komórki. Białka te w normalnych warunkach pozostawałyby nieaktywne i dopiero obniżenie wewnątrzkomórkowego pH powoduje ich aktywację i umożliwia realizację programu samobójczej śmierci komórki.

THE ROLE OF INTRACELLULAR ACIDIFICATION IN APOPTOSIS

Summary

In many cell lines intracellular acidification occurs during apoptosis. This phenomenon was observed following various cytotoxic treatments, as well as following withdrawal of growth factors and activation of Fas receptor. It seems that ceramide, a novel signalling molecule, could be at least partially responsible for intracellular acidification and ensuing cell death. The factors which alleviate the drop in cellular pH rescue cells from apoptosis, include Ras proto-oncoprotein, BCL-2 protein, inhibitors of protein phosphatases and activators of protein kinase C and the Raf/MAP kinase cascade. Intracellular acidification is the consequence of selective loss of pH regulation. It is caused by an

alteration in the set point of the Na^+/H^+ antiport, a major proton extruding mechanism. However, a contribution of proton V-type ATPase and CFTR channel has also been postulated. Thus, more than one pathway can contribute to intracellular acidification during apoptosis. Additionally, cells contain enzymes and proteins thought to participate in apoptosis that operate at low pH: i.e., acidic endonuclease, transglutaminase, acidic sphingomyelinase and gelsolin. It is conceivable that every cell contains a dormant set of proteins the activity of which is triggered by a fall in the intracellular pH and help execute the programmed cell death.

LITERATURA

- AMEISEN J. C., 1992. *Programmed cell death and AIDS: from hypothesis to experiment*. Immunol. Today 13, 388-391.
- ARENDS M. J., WYLLIE A. H., 1991. *Apoptosis: Mechanisms and roles in pathology*. Int. Rev. Exp. Pathol. 32, 223-254.
- BARRY M. A., EASTMAN A., 1992. *Endonuclease activation during apoptosis: The role of cytosolic Ca^{2+} and pH*. Biophys. Res. Commun. 186, 782-789.
- BARRY M. A., EASTMAN A., 1993. *Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis*. Arch. Biochem. Biophys. 300, 440-450.
- BARRY M. A., REYLNODS J. E., EASTMAN A., 1993. *Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification*. Cancer Res. 53, 2349-2357.
- BORTNER C. D., OLDENBURG N. B. E., CIDLOWSKI J. A., 1995. *The role of DNA fragmentation in apoptosis*. TICB 5, 21-26.
- CACERES-CORTES J., RAJOTTE D., DUMOUCHEL J. HADDAD P., HOANG T., 1994. *Product of the steel locus suppresses apoptosis in hemopoietic cells. Comparison with pathways activated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor*. J. Biol. Chem. 269, 12084-12091.
- CANMAN C. E., KASTAN M. B., 1995. *Induction of apoptosis by tumor suppressor genes and oncogenes*. Semin. Cancer Biol. 6, 17-25.
- CASEY P. J., 1992. *Biochemistry of protein prenylation*. J. Lipid Res. 33, 1731-1740.
- CIFONE M. G., DE MARIA R., RANCAIOLI P., RIPPO M. R., AZUMA M., LANIER L. L., SANTONI A., TESTI R., 1995. *Apoptotic signaling through CD95 (Fas/APO-1) activates an acidic sphingomyelinase*. J. Exp. Med. 177, 1547-1552.
- CIFONE M. G., RANCAIOLI P., DE MARIA R., CAMARDA G., SANTONI A., RUBETI G., TESTI R., 1995. *Multiple pathways originate at the Fas/APO-1 (CD95) receptor: Sequential involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acidic sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal*. EMBO J. 14, 5859-5868.
- CRAIG R. W., 1995. *The BCL-2 gene family*. Semin. Cancer Biol. 6, 35-43.
- DHANASEKARAN N., VARA PRASAD M. V. V. S., WADSWORTH S. J., DERMOTT J. M., van ROSSUM G., 1994. *Protein kinase C-dependent and -independent activation of Na^+/H^+ exchanger by G alpha 12 class of G proteins*. J. Biol. Chem. 269, 11802-11806.
- EASTMAN A., 1994. *Deoxyribonuclease II in apoptosis and significance of intracellular acidification*. Cell Death Diff. 1, 7-9.
- EASTMAN A., 1995. *Survival factors, intracellular signal transduction, and the activation of endonucleases in apoptosis*. Semin. Cancer Biol. 6, 45-52.
- ELLIS R. E., YUAN J., HORVITZ H. R., 1991. *Mechanisms and functions of cell death*. Ann. Rev. Cell Biol., 7, 663-698.
- FAMULSKI K. S., LIUZZI M., CHAN J., BASHIR S., REESE C., PATERSON M. C., 1994. *Purification and characterization of a novel endonuclease/cyclobutane pyrimidine dimer phosphodiesterase from human liver*. Gen. Soc. Canada Bull. 25, 38.

- FAMULSKI K. S., BASHIR S., MIRZAYANS R., LIUZZI M., PATERSON M. C., 1995. Purification and functional characterization of a novel human acidic nuclease: Its potential role in UV-induced apoptosis. UNESCO Conference on New frontiers In Cell And Molecular Biology, Abstract No. 62.
- FISSHER D. E., 1994. Apoptosis in cancer therapy: Crossing the threshold. *Cell* 78, 539-542.
- FRASER M. Y., 1994. Endo-exonucleases: enzymes involved in DNA repair and cell death? *BioEssays* 16, 761-766.
- FRISH S. M., FRANCIS H., 1994. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* 124, 619-626.
- GILL B. M., NISHIKATA H., CHAN G., DELOVITCH T. L., OCHI A., 1994. Fas antigen and sphingomyelin-ceramide turnover-mediated signaling: Role in life and death of T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 142, 113-125.
- GOTTLIEB R. A., GIESING H. A., ZHU J. Y., ENGLER R. L., BABIOR B. M. 1995a. Cell acidification in apoptosis: Granulocyte colony-stimulating factor delays programmed cell death in neutrophils by up-regulating the vacuolar H^+ -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5965-5968.
- GOTTLIEB R. A., GIESING H. A., ENGLER R. L., BABIOR B. M., 1995b. The acid deoxyribonuclease of neutrophils: A possible participant in apoptosis-associated genome destruction. *Blood* 86, 2414-2418.
- GOTTLIEB R. A., NORDBERG J., SKOWRONSKI E., BABIOR B. M., 1996a. Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 654-658.
- GOTTLIEB R. A., GRUOL D. L., ZHU J. Y., ENGLER R. L., 1996b. Preconditioning rabbit cardiomyocytes: Role of pH, vacuolar protein ATPase. *J. Clin. Invest.* 97, 2391-2398.
- GOTTLIEB R. A., DOSANJAH A., 1996c. Mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibits acidification and apoptosis in C127 cells: Possible relevance to cystic fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3587-3591.
- GREEN D. R., MARTIN S. J., 1995. The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 694-703.
- GROMOWA I. L., NILSEN O. F., RAZINN S. V., 1995. Long-range fragmentation of the eucariotic genome by exogenous and endogenous nucleases proceeds in a specific fashion via preferential DNA cleavage at matrix attachment sites. *J. Biol. Chem.* 270, 18685-18690.
- HANNUN Y. A., OBEID L. M., 1995. Ceramide: An intracellular signal for apoptosis. *TIBS* 20, 73-77.
- HAROSH I., BINNIGER D. M., HARRIS P. V., MEZZINA M., BOYD J. B., 1991. Mechanism of action of deoxyribonuclease II from human lymphoblasts. *Eur. J. Biochem.* 202, 479-484.
- JARVIS W. D., GRANT S., KOLESNIK R. N., 1996. Ceramide and the induction of apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 2, 1-6.
- KERR J. F., WYLLIE A. H., CURRIE A. R., 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.
- KOKILEVA L., 1994. Multi-step chromatin degradation in apoptosis. DNA breakdown in apoptosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105, 339-343.
- KOLCH W., HEIDCKER G., KOCHS G., HUMMEL R., VAHIDL H., MISCHAK H., FINKENZELLER G., MARME D., RAPP U. R., 1993. Protein kinase Ca activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 346, 249-252.
- KOSEKI C., HERZLINGER D., al-AWQUATI Q., 1992. Apoptosis in metanephric development. *J. Cell Biol.* 119, 1327-1333.
- LAMB J. A., ALLEN P. G., TUAN B. Y., JANNEY P. A., 1993. Modulation of gelsolin function. Activation at low pH overrides Ca^{2+} requirement. *J. Biol. Chem.* 268, 8999-9004.
- LEAKE R., 1996. The cell cycle and regulation of cancer cell growth. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 784, 252-262.
- LI J., EASTMAN A., 1995. Apoptosis in an interleukin-2-dependent cytotoxic T lymphocyte cell line is associated with intracellular acidification. *J. Biol. Chem.* 270, 3203-3211.
- LOTHEM J., SACHS L., 1996. Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes. *Leukemia* 10, 925-931.
- LYNCH D. H., RAMSDELL F., ALDERSON M. R., 1995. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol. Today* 16, 569-574.
- MADSHUS I. H., 1988. Regulation of intracellular pH in eukariotic cells. *Biochem. J.* 250, 1-8.
- MCCONKEY D. J., ORRENIUS S., 1996. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *J. Leukocyte Biol.* 59, 775-783.
- MCDONNELL T. J., MEYN R. E., ROBERTSON L. E., 1995. Implications of apoptotic death regulation in cancer therapy. *Semin. Cancer Biol.* 6, 53-60.
- MEISENHOLDER G. W., MARTIN S. J., GREEN D. R., NORDBERG J., BABIOR B. M., GOTTLIEB R. A., 1996. Events in apoptosis. Acidification is downstream of protease activation and bcl-2 protection. *J. Biol. Chem.* 271, 16260-16262.
- MEREDITH JR J. E., FAZELI B., SCHWARTZ M. A., 1993. The Extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Biol. Cell* 4, 953-961.
- MOOLENAAR W. H., TSIEN R. Y., van der SAAG P. T., de LAAT S. W., 1983. Na^+/H^+ exchange and cytoplasmic pH in the action of growth factors in human fibroblasts. *Nature* 304, 645-648.
- MORANA S., LI J., SPRINGER E. W., EASTMAN A., 1994. The inhibition of etoposide-induced apoptosis by zinc is associated with modulation of intracellular pH. *Int. J. Oncol.* 5, 153-158.
- MORANA S. J., WOLF C. M., LI J., REYNOLDS J. E., BROWN M. K., EASTMAN A., 1996. The involvement of protein phosphatases in the activation of ICE/CED-3 protease, intracellular acidification, DNA digestion, and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271, 18263-18271.
- OBEID L. M., HANNUN Y., 1995. Ceramide: A stress signal and mediator of growth suppression and apoptosis. *J. Cell. Biochem.* 58, 191-198.
- O'CONNOR T. M., WYTTENBACH C. R., 1974. Cell death in the embryonic chick spinal cord. *J. Cell. Biol.* 60, 448-459.
- OSBORNE B. A., 1995. Induction of genes during apoptosis: examples from the immune system. *Semin. Cancer Biol.* 6, 27-33.
- OSTAD M., SHU W. -P., KONG L., LIU B. C. -S., 1996. Ha-ras oncogene abrogates a pH-dependent endonuclease activity of apoptosis in normal rat kidney. *Cancer Lett.* 98, 175-182.
- OYAIZU N., PAHWA S., 1995. Role of apoptosis in HIV disease pathogenesis. *J. Clin. Immunol.* 15, 217-231.
- PATEL T., GORES G. J., KAUFMANN S. H., 1996. The role of proteases during apoptosis. *FASEB J.* 10, 587-597.
- PEREZ-SALA D., COLLADO-ESCOBAR D., FAUSTINO MOLLINEDO., 1995. Intracellular alkalinization suppresses lovastatin-induced apoptosis in HL-60 cells through the inactivation of a pH-dependent endonuclease. *J. Biol. Chem.* 270, 6235-6242.
- RAFF M. C., BARRES B. A., BURNE J. F., COLES H. S., Ishizaki Y., Yacobson M. D., 1993. Programmed cell death and the control of cell survival: Lessons from the nervous system. *Science* 262, 695-700.
- RAJOTTE D., HADDAD P., HAMAN A., CRAGOE E. J. Jr., HOANG T., 1992. Role of protein kinase C and the Na^+/H^+ antiporter in suppression of apoptosis by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *J. Biol. Chem.* 267, 9980-9987.
- REBOLLO A., GOMEZ J., MARTINEZ DE ARAGON A., LASTRES P., SILVA A., PEREZ-SALA D., 1995. Apoptosis induced by IL-2

- withdrawal is associated with an intracellular acidification. *Exp. Cell Res.* 218, 581–585.
- REED J. C., 1995. Regulation of apoptosis by *bcl-2* family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr. Opin. Oncol.* 7, 541–546.
- REYLNODS J. E., LI J., CRAIG R. W., EASTMAN A., 1996. *BCL-2* and *MCL-1* expression in chinese hamster ovary cells inhibits intracellular acidification and apoptosis induced by staurosporine. *Exp. Cell Res.* 225, 430–436.
- SANTANA P., PENA L. A., HAIMOWITZ-FRIEDMAN A., MARTIN S., GREEN D., MCLOUGHLIN M., CORDON-CRDO C., SCHUCHMAN E. H., FUKS Z., KOLESNICK R., 1996. Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* 86, 189–199.
- SARDET C., FRANCHI A., POUYSSEUR J., 1989. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na^+/H^+ antiporter. *Cell* 56, 271–280F.
- SARDET C., COUNILLON L., FRANCHI A., POUYSSEUR J., 1990. Growth factors induce phosphorylation of the Na^+/H^+ antiporter, a glycoprotein of 110 kD. *Science* 247, 723–726.
- SARDET C., FAFOURNOUX P., POUYSSEUR J., 1991. Alpha-thrombin, epidermal growth factor, and okadaic acid activate the Na^+/H^+ exchanger, *NHE-1*, by phosphorylating a set of common sites. *J. Biol. Chem.* 266, 19166–19171.
- SAWAI H., OKAZAKI T., YAMAMOTO H., OKANO H., TAKEDA Y., TASHIMA M., SAWADA H., OKUMA M., ISHIKURA H., UMEHARA H., DOMAE N., 1995. Requirement of *AP-1* for ceramide-induced apoptosis in human leukemia *HL-60* cells. *J. Biol. Chem.* 270, 27326–27331.
- SCHWARTZ M. A., RUPP E. E., FRAINGIONI J. V., LECHENE C. P., 1990. Cytoplasmic pH and anchorage-independent growth induced by *v-Ki-ras*, *v-src* or polyoma middle *T*. *Oncogene* 5, 55–61.
- SHWARTZMAN R. A., CIDLOWSKI J. A., 1994. Glucocorticoid-induced apoptosis of tumphoid cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105, 347–354.
- SCHULTE-HERMANN R., BRUSCH W., GRASL-KRAUPP B., MULLAUER L. RUTTKAY-NEDECKY B., 1995. Apoptosis and multistage carcinogenesis in rat liver. *Mutation Res.* 333, 81–87.
- SHIOKAWA D., OHYAMA H., YAMADA T., TAKAHASHI K., TANUMA S., 1994. Identification of an endonuclease responsible for apoptosis in rat thymocytes. *Eur. J. Biochem.* 226, 23–30.
- SHULTZE-OSTHOFF K., BEYAERT R., VANDEVOORDE V., HAEGEMAN G., FIEERS W., 1993. Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TFN. *EMBO J.* 12, 3095–3104.
- SUVARCHALA E., RAO K. S., 1994. Purification and characterization of a deoxyribonuclease acting on native and UV irradiated DNA from young and aging brain. *Moll. Cell. Biochem.* 137, 109–116.
- TARESA E., KEDEI N., THORNAZY V., FESUS L., 1992. An involucrin-like protein in hepatocytes serves as a substrate for tissue transglutaminase during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 267, 25648–25651.
- TORRIGLIA A., CHAUDUN E., CHANY-FOURNIER F., JEANNY J. C., COURTOIS, COUNIS M. F., 1995. Involvement of *DNase II* in nuclear degeneration during lens cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 270, 28579–28585.
- VAIRO G., COCKS B. G., CRAGOE E. J. Jr., HAMILTON J. A., 1992. Selective suppression of growth factor-induced cell cycle gene expression by Na^+/K^+ antiport inhibitors. *J. Biol. Chem.* 267, 19043–19046.
- VAUX D. L., STRASSER A., 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2239–2244.
- VERHELJ M., BOSE R., LIN X. H., YAO B., JARVIS W. D., GRANT S., BIRNER M. J., SZABO E., ZON L. I., KYRIAKIS J. M., HAIMOWITZ-FRIEDMAN A., FUKS Z., KOLESNICK R. N., 1996. Requirement for ceramide-initiated *SAPK/JNK* signaling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380, 75–78.
- WALKER P. R., SIKORSKA M., 1994. Endonuclease activities, chromatin structure, and DNA degradation in apoptosis. *Biochem. Cell Biol.* 72, 615–623.
- WIEGMANN K., SCHUTZE S., MACHLEIDT T., Witte D., KRONKE M., 1994. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 78, 1005–1015.
- WOLVELTANG E. J., JOHNSON K. L., KRAUER K., RALPH S. J., LINNANE A. W., 1994. Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis. *FEBS Lett.* 339, 40–44.
- YASUDA T., NADANO D., AWAZU S., KISHI K., 1992. Human urine deoxyribonuclease II (*DNase II*) isoenzymes: A novel immunoaffinity purification, biochemical multiplicity, genetic heterogeneity and broad distribution among tissues and body fluids. *Biochim. Biophys. Acta* 1119, 185–193.
- YIN H. L., STOSSEL T. P., 1979. Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature* 281, 583–586.
- ZHIVOTOVSKI B., WADE D., NICOTERA P., ORRENIUS S., 1994. Role of nucleases in apoptosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105, 333–338.