

Panu Profesorowi Lechowi Wojtczakowi z uznaniem i sympatią

BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT

*Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa*

REGULACJA PROCESU APOPTOZY — UDZIAŁ BŁONOWYCH BIAŁEK Z RODZINY BCL-2

CHARAKTERYSTYKA PROCESU APOPTOZY

Apoptoza, programowana śmierć komórek, jest jednym z genetycznie uwarunkowanych mechanizmów fizjologicznych odpowiedzialnym za homeostazę organizmów. W drodze apoptozy następuje eliminacja uszkodzonych lub „zbędnych” komórek podczas rozwoju, podczas indukowanej działaniem hormonów atrofii tkanek, a także w różnych stanach patologicznych, takich jak na przykład AIDS czy też choroby neurodegeneracyjne. Z upośledzeniem apoptozy wiąże się zaś przede wszystkim rozwój i oporność na chemioterapię wielu nowotworów, często oporność komórek na infekcje wirusowe oraz liczne zaburzenia autoimmunologiczne (THOMPSON 1995, REED 1995, REED i współaut. 1996).

Komórki ulegające apoptozie charakteryzuje szereg typowych zmian morfologicznych — obkurczanie na skutek utraty wody, kondensacja jądra komórkowego, fragmentacja DNA i rozpad na tak zwane ciała apoptotyczne zawierające morfologicznie niezmienione organella komórkowe oraz fragmenty DNA. Takie zmiany morfologiczne są rezultatem poważnych zmian biochemicznych — aktywacji lub supresji ekspresji wielu genów, w tym genów kodujących liczne nukleazy i proteazy. Rycina 1 przedstawia hipotetyczną sekwencję zdarzeń zachodzących w komórce ulegającej apoptozie.

Regulacja apoptozy wydaje się być równie złożona, jak regulacja proliferacji komórek i również w jej regulacji występują „wewnętrzne punkty kontrolne” (check points). Czy za punkty te można traktować pojawianie się określonych białek, czy też umożliwienie działania już istniejącym białkom w wyniku zmian wewnątrzkomórkowego środowiska (np. zmiana pH) pozostaje jeszcze w sferze domysłów. W ostatnich latach molekularnemu podłożu zja-

wiska apoptozy poświęcono wiele artykułów przeglądowych (HALE i współaut. 1996; VAUX i STRASSER 1996, YUAN 1996, KING i CIDŁOWSKI 1995), w tym także w polskim piśmiennictwie naukowym (SIKORA 1994, 1995, RADZISZEWSKA 1995, ROŻYŃKOWA 1994, 1996, SŁOWIŃSKI i współaut. 1996).

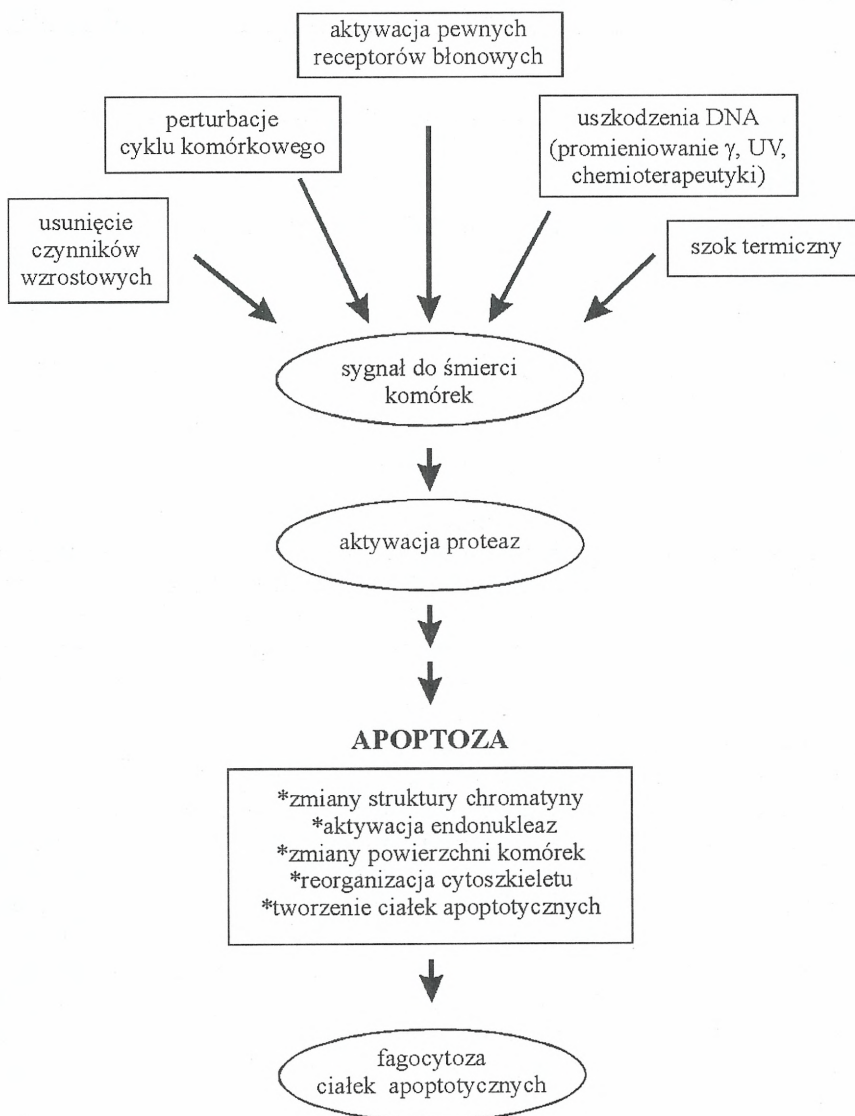
Uruchomienie apoptozy następuje jako odpowiedź komórki na bardzo różne fizjologiczne i farmakologiczne bodźce. Należą do nich między innymi niedobór czynników wzrostowych, niedobór licznych hormonów, szok temperaturowy, stres oksydacyjny a także liczne czynniki uszkodzające DNA, w tym promieniowanie jonizujące i leki przeciwnowotworowe. Należy jednak zaznaczyć, że czynniki indukujące apoptozę komórek określonego rodzaju mogą być nieefektywne w odniesieniu do innych komórek.

Wspominane już induktory apoptozy mogą działać:

- na powierzchnię komórek i wywoływać aktywację błonowych receptorów lub zmiany funkcjonowania niektórych układów transportujących;
- w cytosolu i organellach wewnątrzkomórkowych i powodować na przykład zmiany gradientu jonów, poziomu wolnych rodników tlenowych, ultrastruktury organelli, czy też zakłócać biosyntezę białek;
- w jądrze, dezorganizując strukturę DNA, zmieniać wzór ekspresji wielu genów;
- na cytoszkielet i zmieniać jego strukturę oraz zaburzać powiązania z białkami kurczliwymi;
- na wewnątrzkomórkowe szlaki przekazywania sygnałów.

Dokładniejsze omówienie tych zagadnień jest przedstawione w kilku artykułach przeglądowych (EVANS 1993, McCONKEY i ORRENUS

INDUKTORY APOPTOZY



Ryc. 1. Hipotetyczna sekwencja zdarzeń w komórce ulegającej apoptozie.

1994, OBEID i HANNUM 1995, THOMPSON 1995, WERTZ i HANLEY 1996).

Pomimo mnogości wewnątrzkomórkowych sygnałów i przekaźników do programowanej śmierci komórki wspólny wydaje się być mechanizm końcowej fazy wykonawczej apoptozy: fragmentacja chromatyny i utworzenie ciałek apoptotycznych poprzedzone aktywacją przede wszystkim swoistych, cysteinyowych proteaz (MARTIN i GREEN 1995, KUMAR 1995, SIKORA 1995a, WHYTE 1996, PATEL i współaut. 1996).

O podatności komórek na apoptozę decyduje, oprócz wpływu czynników zewnętrznych, współgranie białek kodowanych przez wiele poznanych już dzisiaj genów, które są zdolne do hamowania, jak i promowania procesu apoptozy. Szczególną funkcję w regulacji apoptozy pełni białko BCL-2 i coraz liczniej poznawane jego homologi (KORSMEYER 1995, REED 1994, 1995, HOCKENBERY 1995, REED i współaut. 1996). Omówieniu tych właśnie białek i prawdopodobnych mechanizmów ich działania traktuje niniejsze opracowanie.

GEN *bcl-2*, JEGO HOMOLOGI, TRANSKRYPTY I BIAŁKOWY PRODUKT

Gen *bcl-2* (B-cell-lymphoma/leukemia 2) wykryto w połowie lat osiemdziesiątych badając translokacje chromosomalne (t 14;18) (TSUJIMOTO i współaut. 1985). Koduje on białko BCL-2, będące jednym z podstawowych endo-

gennych regulatorów apoptozy w komórkach ssaków. Jest ono strukturalnym i funkcjonalnym homologiem białka kodowanego przez gen *ced-9* nicienia *Caenorhabditis elegans* (HENGARTNER i HORVITZ 1994).

Podobną antyapoptotyczną aktywność przejawia też białko BCL-2. Jak dotąd potwierdzono hamujące apoptozę działanie BCL-2 na zainicjowaną działaniem wielu chemioterapeutyków, promieniowaniem γ i UV, produktami protoonkogeny *c-myc* i genu supresorowego *p53*, niedoborem wielu czynników wzrostowych, działaniem czynnika transformującego β (TGF- β), a także azydku czy ceramidu. BCL-2

nie jest natomiast zdolne do zahamowania apoptozy zachodzącej z udziałem dopełniacza, tak zwanej negatywnej selekcji limfocytów T, a także apoptozy wywołanej działaniem nadtlenu wodoru czy amyloidu (REED 1994, VAUX i STRASSER 1996). Lista ta jest z pewnością niekompletna, gdyż obecnie lawinowo pojawiają się opisy wrażliwych i niewrażliwych na obecność BCL-2 dróg prowadzących do śmierci komórek.

GEN *bcl-2*, REGULACJA JEGO EKSPRESJI, TRANSKRYPT

W wyniku translokacji występującej w komórkach chłoniaka limfocytów B gen *bcl-2* zostaje przeniesiony z chromosomu 18 na chromosom 14, w pobliżu genu kodującego ciężki łańcuch immunoglobuliny (*Ig*). Dostaje się on wówczas pod kontrolę silnego wzmacniacza transkrypcji genu *Ig*. Wynikające stąd uaktywnienie transkrypcji genu *bcl-2* sprawia, że w komórkach chłoniaka zwiększa się w ten sposób ilość białka hamującego ich obumieranie (TSUJIMOTO i współaut. 1985). Dlatego też gen *bcl-2* traktuje się jako protoonkogen, którego główną funkcją jest zahamowanie programowanej śmierci komórek, a nie promowanie proliferacji (jak jest to typowe dla innych protoonkogenów). Dokładniejsze omówienie mechanizmów translokacji (t 14;18) i biologicznych konsekwencji podwyższonej ekspresji genu *bcl-2* w rozwoju chłoniaków limfocytów B znaleźć można w artykule przeglądowym (KOCKI i ROŻYNKOVA 1991).

Gen *bcl-2* człowieka składa się z trzech eksonów rozdzielonych dwoma intronami, zawiera 2 miejsca promotorowe, miejsce negatywnej regulacji NRE. Znana też jest sekwencja nukleotydowa cDNA genu *bcl-2* z komórek białaczkowych SUP-B2 (TSUJIMOTO i CROCE 1986, YOUNG

i KORSMEYER 1993, CLEARY i współaut. 1986). Ostatnio w promotorze genu *bcl-2* limfocytów B wykryto miejsce pozytywnej regulacji jego ekspresji, zawierające sekwencję CRE (c-AMP regulatory element) (WILSON i współaut. 1996). Miejsce to wydaje się być istotne zarówno dla podstawowej ekspresji genu *bcl-2*, jak i indukowanej po aktywacji kinazy C, czego nie stwierdza się po aktywacji kinazy A. Sugeruje się, że ufosforylowane przez kinazę C białko CREB reguluje transkrypcję genu *bcl-2* w limfocytach B, nie wiadomo, czy wykazuje ono podobne działanie w innych komórkach.

Ekspresję genu *bcl-2* hamuje białko supresorowe *p53*, co wykazano w badaniach *in vivo* i *in vitro* (MIYASHITA i współaut. 1994a, HALDAR i współaut. 1994). Obecne w genie *bcl-2* wspomniane wcześniej miejsce negatywnej regulacji NRE jest identyczne z locus odpowiedzialnym za hamowanie ekspresji *bcl-2* przez białko *p53* (MIYASHITA i współaut. 1994b).

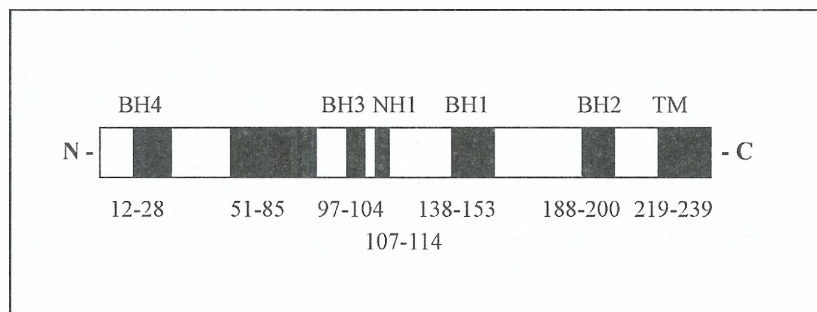
Transkryptem genu *bcl-2* jest kilka mRNA zbudowanych z 4,2–7,2 kpz (SETO i współaut. 1988). W wyniku alternatywnego składania transkryptu w komórkach powstaje kilka izoform białka BCL-2, o c.c. od 23 do 31 kDa.

BIAŁKO BCL-2, JEGO BUDOWA I WEWNĄTRZKOMÓRKOWE WYSTĘPOWANIE

W komórkach ludzkich najczęściej występującą izoformą BCL-2 jest 239 AA białko o c.c. ~26 kDa. W obrębie jego cząsteczki wyróżnia się co najmniej 7 rejonów (domen) ryc. 2 o istotnym znaczeniu funkcjonalnym (YIN i współ-

aut. 1994, HUNTER i współaut. 1996, UHLMANN i współaut. 1996).

Badania mutantów BCL-2 pozbawionych określonych fragmentów cząsteczki pozwoliły na ustalenie ich funkcji. Domeny BH1 i BH2 są



Ryc. 2. Schemat budowy białka BCL-2 (wg UHLMANN i współaut. 1996, zmodyf.).

BH1, BH2, BH3, BH4 oznaczają regiony o wysokiej konserwatywności, TM — sekwencję AA odpowiedzialną za wiązanie BCL-2 z błonami.

niezbędne dla antyapoptotycznego działania BCL-2 i tworzenia przez nie heterodimerów z białkami pokrewnymi (YIN i współaut. 1994, REED 1994, HANADA i współaut. 1995), o czym piszę w rozdziale: *Interakcje białek z rodziny BCL-2*. Mutant BCL-2 pozbawiony N-końcowego fragmentu BH4, który nie uczestniczy w wiązaniu z innymi białkami, przejawia proapoptotyczne, a nie anty-apoptotyczne działanie (HUNTER i współaut. 1996). O funkcjonalnym znaczeniu domen BH3 i NH1 niewiele jeszcze wiadomo. Zmutowane białko BCL-2 pozbawione aminokwasów 51–85 (nonconserved region; ryc. 2) zachowuje zdolność hamowania apoptozy wywoływanej w komórkach BRK (embrionalna nerka szczura) przez białka c-myc i p53, a ponadto uzyskuje nową cechę — ułatwia proliferację tych komórek (UHLMANN i współaut. 1996). C-końcowa sekwencja TM, na którą składa się 19 hydrofobowych aminokwasów jest niezbędna do wbudowania białka BCL-2 do błon wewnętrznych błony mitochondrialnej, siateczki śródplazmatycznej oraz mikrosomów (KRAJEWSKI i współaut. 1993, JANIĄK i współaut. 1994, ZHU i współaut. 1996). Wbudowanie następuje w taki sposób, iż większa część cząsteczki BCL-2 zostaje skierowana do cytoplazmy. Usunięcie transbłonowego fragmentu TM, niezbędnego do zakotwiczenia BCL-2 w błonach, nie wywiera jednak wpływu (BORNER i współaut. 1994) lub jedynie niewielki (HUNTER i współaut.

1996) na antyapoptotyczne działanie BCL-2. Przemawia to za tym, że powiązanie BCL-2 z błonami nie jest bezwzględnie konieczne dla jego aktywności.

Poznane dotychczas potranslacyjne modyfikacje BCL-2 wynikają przede wszystkim z jego fosforylacji. W większości komórek białko BCL-2 jest nieufosforylowane (ALNEMRI i współaut. 1992). Może ono jednak ulegać fosforylacji pod wpływem takich czynników indukujących apoptozę jak na przykład inhibitor fosfataz, kwas okadajowy (HALDAR i współaut. 1994), czy chemioterapeutyk — Taxol (HALDAR i współaut. 1995, 1996, BLAGOSKLONNY i współaut. 1996). Fosforylacji ulega reszta serynowa obecna w sekwencji aminokwasowej RXXST(P), znajdującej się w centrum cząsteczki BCL-2 (AA 164–166) (HALDAR i współaut. 1994, GUAN i współaut. 1996). Zaznacza się wówczas spadek aktywności antyapoptotycznej BCL-2. Tak więc wydaje się, że tylko nieufosforylowane BCL-2 hamuje apoptozę, zaś jego fosforylacja stanowi pozytywny sygnał indukujący apoptozę.

Dane o kinazach i fosfatazach uczestniczących w fosforylacji i defosforylacji BCL-2 są nieliczne. Sugerowany jest udział w fosforylacji BCL-2 serynowo-treoninowej kinazy Raf-1 (BLAGOSKLONNY i współaut. 1996, WANG i współaut. 1994, CHEN i FALLER 1996). Wykrycie kompleksu BCL-2 z białkiem R-ras, aktywatorem kinazy Raf, potwierdza tę sugestię (FERNANDEZ-SARABIA i BISCHOFF 1994).

HOMOLOGI *bcl-2* I ICH BIAŁKOWE PRODUKTY

Do rodziny genów homologicznych z genem *bcl-2* zalicza się kilkanaście genów, wykrytych w komórkach ludzkich (patrz tab. 1), oraz w komórkach gryzoni, ptaków a także w niektórych wirusach (REED 1996, WHITE 1996). Dostępne dziś informacje o białkach kodowanych przez poszczególne geny są różne. Nie powinno to jednak dziwić zważywszy, że większość z nich wykryto w latach 1995–1996.

W komórkach ludzkich aż sześć genów z rodziny *bcl-2* koduje białka działające antyapoptycznie, pięć innych genów koduje białka, które promują apoptozę (tab. 1). Podobnie jak BCL-2 białka te występują w powiązaniu z błonami, jedynie białko BAD, w którym nie występuje transbłonowy region TM, jest białkiem cytoplazmatycznym. Są one w znacznym stopniu homologiczne z białkiem BCL-2 (z wyjątkiem białka BIK, tab. 1), zwłaszcza w regionach BH1 i BH2 o wysokiej konserwatywności (porównaj ryc. 2).

Spośród genów, których produkty przeciw-
działają apoptozie szczególne zainteresowanie

wzbudza gen *bcl-x*. W wyniku alternatywnej obróbki jego transkryptu powstają bowiem dwa różniące się długością mRNA (mRNA Bcl-x_L i mRNA Bcl-x_S) kodujące białka o przeciwstawnym działaniu (BOISE i współaut. 1993, MUCHMORE i współaut. 1996, MINN i współaut. 1996). Białko BCL-x_L (233 AA) znajdujące w komórkach długo żyjących, na przykład neuronach, przeciwdziała apoptozie. Białko krótsze, BCL-x_S (170 AA) promuje śmierć komórek. Podobnie jak gen *bcl-x*, gen *brag* koduje transkrypty o różnej długości. Komórki prawidłowe mózgu cechuje obecność mRNA *brag 1* o długości 4,5 kbp, natomiast w komórkach gliomy występuje transkrypt krótszy, o długości 1,8 kbp, ponadto ma miejsce jego zwielokrotnienie. Nadekspresja innych genów kodujących białka hamujące apoptozę występuje w wielu nowotworach (patrz rozdział *Białka z rodziny BCL-2 w nowotworzeniu*). Wydaje się to przemawiać za rearanżacją genu *brag* podczas nowotworzenia (DAS i współaut. 1996).

Tabela 1. Homologi *bcl-2* o działaniu anty- i proapoptycznym w komórkach ludzkich

Gen/chromosom	Białko. % homologii z BCL-2	Funkcja	Piśmiennictwo
<i>bcl-2</i> /18	239 AA; kompleksy z BCL-2, BAX, BCL-xL, MCL-1	hamowanie apoptozy	TSUJIMOTO i CROCE 1986 WHITE 1996, REED 1996
<i>bcl-xL</i> /20	233 AA; kompleksy z BCL-2, BAD, BAX, MCL-1, BCL-xs, 42%	—	BOISE i współaut. 1993
<i>bcl-w</i> /14	200 AA; kompleksy ? 46%	—	GIBSON i współaut. 1996
<i>mcl-1</i> /1	350 AA; kompleksy z BCL-2, homologia?	—	KOZOPAS i współaut. 1993, REYNOLDS i współaut. 1994
<i>brag</i> /?	286 AA; kompleksy? 56%	—	DAS i współaut. 1996
<i>bfl-1</i> /?	175 AA; kompleksy? homologia?	—	CHOI i współaut. 1995. D'SA-EPPER i współaut. 1996.
<i>bax</i> /?	191 AA, kompleksy z BCL-2, BCL-xL; 21%	promocja apoptozy	OLTVAI i współaut. 1993
<i>bad</i> /?	204 AA, kompleksy z BCL-xL, brak regionu TM, homologia?	—	YANG i współaut. 1995
<i>bak-1</i> /6 <i>bak-2</i> /20 <i>bak-3</i> /3	około 216 AA, kompleksy z BCL-xL; 25–28%	—	CHITTENDEN i współaut. 1995a, KIEFER i współaut. 1995
<i>bik</i> /?	160 AA, kompleksy z BCL-xL; brak homologii z BCL-2	—	BOYD i współaut. 1995
<i>bcl-xs</i> /20	170 AA, kompleksy z BCL-xL, homologia	—	BOISE i współaut. 1993, MINN i współaut. 1996

Pośród homologów BCL-2, które promują apoptozę, szczególnie ważne wydają się być białka BAX, BAK i BIK. Wykazano bowiem, że występująca w obrębie ich cząsteczek domena BH3 (np. w białku BAX AA 59-101) jest niezbędna i wystarczająca dla ich proapoptycznej aktywności (BOYD i współaut. 1995, ZHA i współaut. 1996, CHITTENDEN i współaut. 1995b) oraz zdolności do tworzenia homo- i heterodimerów (ZHA i współaut. 1996). Tę sekwencję aminokwasową (domenę BH3) w BAX nazwano nawet domeną samobójczą (suicide domain) (HUNTER i PARSLow 1996). Wbudowanie jej do białka sprawia, że powstała chimera przestaje hamować apoptozę. Należy zauważyć, że w białku BIK krótszym od innych homologów BCL-2, jest obecna domena BH3, nie ma zaś domen BH1 i BH2, typowych dla białek z tej rodziny (ryc. 3).

Domena BH3 występuje także w BCL-2 i BCLxL i MCL-1, białkach hamujących apoptozę. Jej znaczenie w funkcjonowaniu tych białek jest bardzo istotne, gdyż mutacje w obrębie BH3 znoszą antyapoptyczne działanie białka BCL-2 (CHITTENDEN i współaut. 1995b).

Występowanie homologów BCL-2 o działaniu antyapoptycznym wydaje się być tkanko-

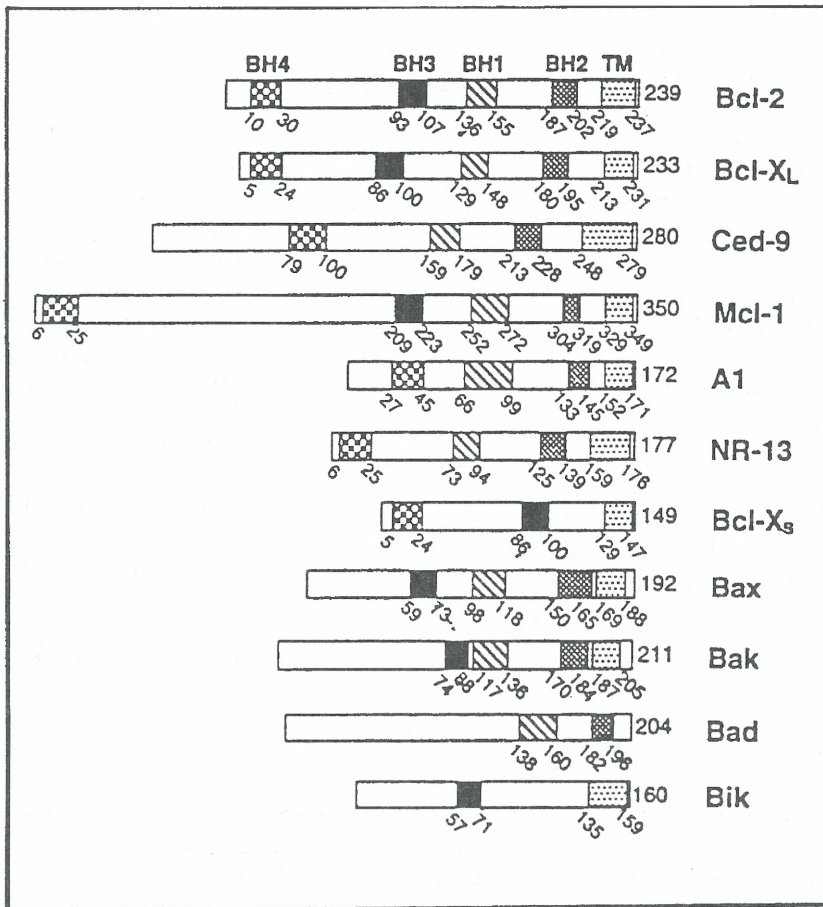
wo specyficzne. Ekspresję *bcl-2* wykrywa się w komórkach macierzystych szpiku, w długo żyjących różnych komórkach oraz w takich komórkach postmitotycznych, jak na przykład neurony (HOCKENBERY i współaut. 1991, VEIS i współaut. 1993). Wysoka ekspresja genu *bcl-xL* charakteryzuje grasicę i komórki centralnego układu nerwowego (BOISE i współaut. 1993), *bfl-1* — komórki krwiotwórcze (CHOI i współaut. 1996), *mcl-1* — komórki mieloblastyczne (REYNOLDS i współaut. 1994), *brag-1* zaś komórki mózgu i gliomy (DAS i współaut. 1996). Natomiast homologi *bcl-2* promujące śmierć komórek — *bax* i *bak*, występują w wielu tkankach — płucach, nerkach, grasicy, śledzionie i szpiku kostnym (HOCKENBERY 1995, OLTVAI i współaut. 1993).

Obecność BCL-2 i jego homologów jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju organizmu. Jego brak wywołuje szereg zaburzeń, szczególnie w grasicy, śledzionie i w nerkach, niejednokrotnie prowadzących do pojawienia się nowotworów (KORSMEYER i współaut. 1995). Wydaje się, że u zwierząt pozbawionych genu *bcl-2* (myszy knock-out) jego funkcję mogą przejmować białka homologiczne (WHITE 1996).

INTERAKCJE BIAŁEK Z RODZINY BCL-2

Zróznicowane tkankowo występowanie homologów *bcl-2* stwarza różne możliwości inter-

akcji kodowanych przez nie białek. Interakcja białek jest ogólnym mechanizmem biologicz-



Ryc. 3. Porównanie usytuowania domen BH1-BH4 i TM w niektórych ludzkich (BCL-XL, MCL-1, BCL-XS, BAX, BAD, BIK), mysich (A1) i ptasich (NR-13) homologach BCL-2.

CED-9 oznacza homolog BCL-2 z *Caenorhabditis elegans* (wg ZHA i współaut. 1996, zmodyf.)

nym regulującym w komórkach ich aktywność. Spektakularnymi jej przykładami są interakcje białek MYC-MAX (RYAN i BIRNIE 1996) i genów kodujących białka supresorowe Rb i p53 (przeгляд GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1995). Podobny sposób regulacji aktywności wydaje się dotyczyć też białek z rodziny BCL-2. Już w 1993 roku wykazano, że BCL-2 i BAX tworzą homodimery (OLTVAI i współaut. 1993). Wysznięto wówczas hipotezę, że podatność komórek na uruchomienie apoptozy pod wpływem odpowiedniego bodźca zależy od stosunku białek o właściwościach anty-(BCL-2) do proapoptotycznych (BAX), a nie od bezwzględnej ilości każdego z nich. Można założyć dwie możliwości funkcjonowania białek składowych tych kompleksów. Według jednej z nich BAX (jako mono- lub homodimer) działa jako białko efektorowe, którego aktywność promująca apoptozę neutralizuje dołączenie BCL-2. Nie można jednak wykluczyć sytuacji odwrotnej, w której BCL-2 jest białkiem aktywnym a zadaniem nieaktywnego BAX jest uniemożliwienie tworzenia homodimerów BCL-2 promujących przeżywanie komórek.

Wiadomo już, że zdolność tworzenia kompleksów charakteryzuje prawie wszystkie homologi BCL-2, wiele z nich znanych z badań *in*

vitro wykryto też w różnych komórkach (np. BCL-2/BCL-2, BCL-2/BAX, BAX/BAX, BAX/BCL-XL, SEDLAK i współaut. 1995). Czy wszystkie z nich mają znaczenie fizjologiczne jeszcze nie wiadomo.

W kompleksowaniu homologów BCL-2 uczestniczą przede wszystkim domeny BH1 i BH2, w niektórych białkach być może także domena BH3. Kompleksy te są labilne i tak na przykład białko BAX i BAD współzawodniczą o wiązanie z BCL-XL i BAD wypiera BAX z tego kompleksu (BAD nie kompleksuje z BAX; YANG i współaut. 1995). Należy zdawać sobie sprawę, że różne komórki mogą zawierać określone kompleksy homologów BCL-2 ze względu na komórkowo specyficzne występowanie takich białek, zwłaszcza białek hamujących apoptozę.

Intrygujące jest pytanie, jak działają białka nie mające sekwencji BH1 i BH2, takie jak na przykład BCL-XS. Białko to antagonizuje działanie BCL-XL, które hamuje apoptozę. BCL-XS nie tworzy jednak kompleksów ani z BCL-XL ani z innymi białkami z rodziny BCL-2, nie „przeszkadza” też w tworzeniu kompleksu BCL-XL z BAX (MINN i współaut. 1996). Przypuszcza się więc, że BCL-XS promuje apoptozę w nie poznany dotąd, inny niż pozostałe homologi BCL-2 sposób.

Wydaje się zatem, że zaproponowana przez Oltvaia hipoteza regulacji podatności komórek na apoptozę poprzez zmiany stosunków anty- i proapoptotycznych białek przetrwała próbę czasu. Nie rozstrzygnięte jest, jak dotąd, które białko —

hamujące czy promujące apoptozę jest właściwym efekтором. Najnowsze dane o występowaniu „domeny samobójczej” w niektórych białkach promujących apoptozę przemawiają za ich aktywną, efektorową rolą w regulacji apoptozy.

POSTULOWANE MECHANIZMY DZIAŁANIA BCL-2

W cząsteczce BCL-2 i jego homologów nie występują elementy strukturalne, które mogłyby sugerować biochemiczne mechanizmy działania tych białek. Liczne hipotezy wiążą biochemiczne działanie BCL-2 przede wszystkim z jego lokalizacją wewnątrzkomórkową. Powiązanie BCL-2 i prawie wszystkich jego homologów (z wyjątkiem proapoptotycznego BAD) z błonami — zewnętrzną błoną mitochondrialną, błoną jądrową i siateczką śródplazmatyczną sugeruje udział tych białek w regulacji funkcjonowania mitochondriów, przeciwdziałania stresowi oksydacyjnemu oraz w regulacji wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia.

Zagadnienie istotności mitochondriów — i parametrów, które kontrolują — w apoptozie nie jest w pełni wyjaśnione, chociaż wiadomo, że szereg biochemicznych procesów zachodzących w komórce apoptotycznej wymaga energii. Nie wiadomo jednak, czy obserwowany niski poziom ATP w komórkach umierających na drodze apoptozy jest przyczyną ich śmierci. Wysłunięto ostatnio hipotezę, że spadek wewnątrzkomórkowego poziomu ATP poniżej krytycznego dla każdej komórki poziomu — ale wystarczającego do przebiegu hydrolizy makrocząsteczek, kondensacji chromosomów czy też tworzenia pęcherzyków apoptotycznych — prowadzi do apoptozy (RICHTER i współaut. 1996). Spadek poziomu ATP w umierających komórkach, być może, wiąże się z obniżeniem potencjału błonowego mitochondriów, indukowanym czynnikami wywołującymi hypoksję i apoptozę. Przedstawiono ostatnio dowody, że BCL-2 i BCL-xL przeciwdziałają takiemu uszkodzeniu mitochondriów (SHIMIZU i współaut. 1996b).

Sugerowano też udział BCL-2 jako antyoksydanta w regulacji poziomu wolnych rodników (KANE i współaut. 1993, HOCKENBERY i współaut. 1993, HOCKENBERY 1995), mediatorów apoptozy wielu komórek (KORSMEYER 1995, KORSMEYER i współaut. 1995, JACOBSON 1996, SLATER i współaut. 1995). Jednakże w świetle obserwacji, że BCL-2 hamuje apoptozę zachodzącą w warunkach nie sprzyjających tworzeniu wolnych rodników (SHIMIZU i współaut. 1996a, JACOBSON 1996) hipoteza ta została podważona, pomimo że nadekspresja BCL-2 przeciwdziałała uszkodzeniu błon wywołanemu pero-

ksydacją błonowych lipidów (HOCKENBERY i współaut. 1993). Może ona także powodować hiperpolaryzację zewnętrznych błon komórek z równoległym obniżeniem wrażliwości komórek na działanie ouabainy, inhibitora Na^+/K^+ — ATP-azy (GILBERT i współaut. 1996).

Udział jonów wapnia w transdukcji niektórych sygnałów prowadzących do apoptozy oraz w kluczowych etapach apoptozy, takich jak na przykład reorganizacja chromatyny, indukcja ekspresji określonych genów, degradacja DNA przez nukleazy jest niepodważalny (NICOTERA i współaut. 1994). Dane o wpływie BCL-2 na fluktuacje poziomu Ca^{2+} w komórkach apoptotycznych są jednak niespójne. Jedne z nich wskazują, że BCL-2 hamuje wpływ Ca^{2+} zmagazynowanego w siateczce śródplazmatycznej (LAM i współaut. 1994, DIESTELHORST i współaut. 1996) lub też reguluje poziom Ca^{2+} w jądrze komórkowym (MARIN i współaut. 1996). Jednakże wyniki eksperymentów z tapsigarginą, inhibitorem uwalniania Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej wskazują, że BCL-2 nie uczestniczy w regulacji homeostazy wapniowej podczas apoptozy (DIESTELHORST i McCORMICK 1996); przynajmniej w komórkach mysiej limfocyty. Rozstrzygnięcie tego zagadnienia niewątpliwie wymaga dalszych badań.

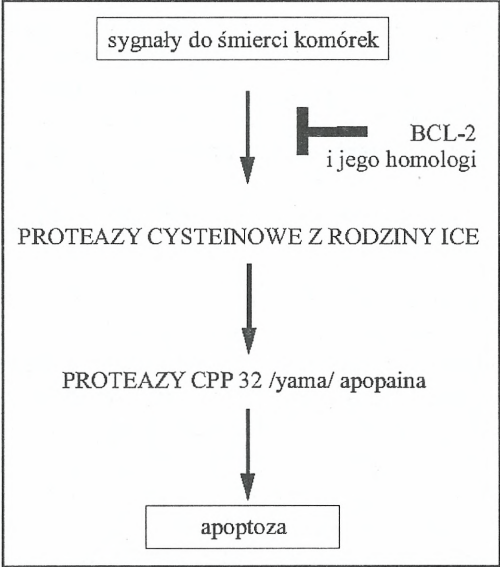
Obecnie panuje przekonanie, że głównym mechanizmem działania BCL-2 jest ich wpływ na aktywację proteaz, głównych egzekutorów apoptozy (KUMAR 1995, PATEL i współaut. 1996, WHYTE 1996, MARTIN i GREEN 1995, SIKORA 1995a). Proteazy te należą do rodziny proteaz cysteinowych ICE (interleukin-1- β -converting enzyme) i odznaczają się znacznym stopniem homologii, jak też z proteazą kodowaną przez gen *ced-3* *Caenorhabditis elegans* (PATEL i współaut. 1996). W tabeli 2 zestawiono wykryte dotychczas proteazy z rodziny ICE i rozszczepiane przez nie substraty. Należy zauważyć, że poszczególne proteazy mogą mieć więcej niż jeden substrat, a określony substrat może być rozszczepiony przez kilka proteaz. Postuluje się sekwencyjność działania tych proteaz (SHIMIZU i współaut. 1996a, VAUX i STRASSER 1996) (ryc. 4). Postulowany schemat zakłada, że proteazy ICE aktywują proteazy z podrodziny CPP32/yama rozszczepiając ich nieaktywne

Tabela 2. Proteazy z rodziny ICE i ich substraty (z danych WHYTE'A 1996, VAUXA i STRASERA 1996, PATELA i współaut. 1996

PROTEAZY	SUBSTRATY
ICE	pro-ICE i pokrewne pro-proteazy
Ich-1/Nedd 2	pro-interleukina-1β
CPP32/yama/apopain	proteaza CPP22
Mch2	poli(ADP-rybozo)polimeraza (PARP)
Mch3/ICE-LAP3	kinaza białkowa aktywowana przez DNA
ICErel III/TY	laminy A, B1/B2, C
	kinaza białkowa Cδ
	aktyna
	jądrowe nukleoproteiny
	Gas-2, składnik mikrofilamentów
	syntetyczne substraty

proenzymy. Te zaś z kolei działają na określone substraty o kluczowym dla apoptozy znaczeniu, w tym na tak zwany „substrat śmierci”, poli(ADP-rybozo)-polimerazę (PARP) (WHITE 1996, SIKORA 1995). Dokładniejsze omówienie znaczenia hydrolizy poszczególnych substratów w procesie apoptozy wykracza jednak poza ramy tego artykułu.

W 1996 roku udowodniono nie tylko fakt hierarchiczności działania tych proteaz lecz także wykazano, że zarówno BCL-2 jak i BCL-xL hamują przede wszystkim aktywację proteaz ICE (ryc. 4), wywoływaną przez główny sygnał do śmierci komórek (SHIMIZU i współaut. 1995, 1996a, CHINNAIYAN i współaut. 1996). Nie wia-



Ryc. 4. Postulowany udział BCL-2 i jego homologów w hamowaniu aktywności proteaz podczas apoptozy (wg SHIMIZU i współaut. 1996, zmodyf.).

domo jeszcze, jaki jest mechanizm tego hamowania, nie jest też wykluczona możliwość działania BCL-2 i w innych etapach kaskady proteaz (VAUX i STRASSER 1996, KUMAR 1995), (ryc 4). Za jeden z nich można, być może, uznać przeciwdziałanie przez BCL-2 i jego homolog MCL-1 spadkowi wartości wewnątrzkomórkowego pH, typowego dla komórek apoptotycznych (MEISENHOLDER i współaut. 1996, REYNOLDS i współaut. 1996).

Ten krótki przegląd nie wyczerpuje wszystkich mechanizmów działania białek z rodziny BCL-2, których zrozumienie jest konieczne dla farmakologicznego kontrolowania ich nie zawsze pożądaných efektów.

BIĄŁKA Z RODZINY BCL-2 W NOWOTWORZENIU

Niewątpliwy udział BCL-2 w regulacji apoptozy sprawia, że komórki z nadekspresją tego białka mogą stawać się niewrażliwe na sygnały normalnie prowadzące do ich śmierci, w tym na działanie wielu leków przeciwnowotworowych (REED 1994, REED i współaut. 1996, THOMPSON 1995, DARZYNKIEWICZ 1995). Ten rodzaj oporności wydaje się polegać na blokowaniu przez BCL-2 i jego analogi o działaniu antyapoptotycznym przetwarzania sygnału, generowanego przez leki, w sygnał prowadzący do śmierci komórki (REED 1995). Zahamowanie apoptozy sprawia, że nawet uszkodzone w czasie terapii komórki mogą żyć dłużej, zyskując w ten sposób czas na wykształcenie biochemicznych mechanizmów klasycznej oporności.

Podwyższenie ekspresji *bcl-2* wykryto w bardzo wielu ludzkich nowotworach (np. 90% — rak jelita grubego, 60% — rak żołądka, ~30% — neuroblastoma; REED i współaut. 1996). Są też doniesienia o obniżonym poziomie w niektórych nowotworach promującego apoptozę białka BAX (rak piersi; REED 1995). Szczególną rolę w regulacji ekspresji tych genów pełni białko supresorowe p53. Hamuje ono ekspresję *bcl-2* (patrz rozdział *Gen bcl-2, regulacja jego ekspresji, transkrypt*), aktywuje zaś ekspresję *bax* (MIYASHITA i REED 1995, FISHER 1994). Ta tak złożona regulacja ekspresji genów, których produkty w przeciwny sposób działają na przebieg apoptozy powoduje, że różne komórki mogą mieć różne ilości tych białek, a tym samym

inne efektywnie działające kompleksy. Czynione są już próby wykorzystania informacji o poziomie białek z rodziny BCL-2 oraz białka p53 w prognozowaniu odpowiedzi komórek nowotworowych na chemioterapię (HEROD i współaut. 1996, CHRESTA i współaut. 1996). Trudno jednak powiedzieć, czy znajdują one kliniczne zastosowanie. Zaczynają się także ukazywać

doniesienia o współdziałaniu białek z rodziny BCL-2 (BFL-1; D'SA EIPPER i współaut. 1996 i NR-13; GILLET i współaut. 1995) i niektórych wirusów w transformacji nowotworowej komórek. Zagadnienie udziału BCL-2 i jego homologów w powstawaniu nowotworów jest, jak wiadać, bardzo złożone i w niniejszym opracowaniu jedynie zasygnalizowane.

UWAGI KOŃCOWE

Białka z rodziny BCL-2 nie są jedynymi komórkowymi regulatorami apoptozy, moim zdaniem jednak zajmują wśród nich pozycję wyjątkową. Wynika ona z szerokiego spektrum ich działania, a zwłaszcza wpływu na działanie licznych proteaz, głównych egzekutorów apoptozy w niemalże wszystkich przebadanych układach. Co więcej, wiadomo, że

także niektóre wirusy syntetyzują białka o działaniu analogicznym do BCL-2 (np. białko E1B19 kDa adenowirusa), jak również białkowe inhibitory proteaz ICE (białko CrmA, tzw. serpina). Białka te działają antyapoptotycznie na zainfekowane komórki, zwiększają szanse ich przeżycia i stwarzają dogodne warunki dla rozwoju wirusa.

REGULATION OF APOPTOSIS — INVOLVEMENT OF MEMBRANE PROTEINS FROM BCL-2 FAMILY

Summary

Apoptosis, programmed cell death, is considered to be a main cellular mechanism responsible for maintaining tissue homeostasis. Proteins encoded by many genes participate in its regulation. In the article a detailed description of proteins encoded by *bcl-2* gene and its homologues is given, with special emphasis put on their interactions.

Postulated mechanisms of action of BCL-2 and related proteins are discussed, especially the one suggesting involvement of BCL-2 in inhibition of proteolytic cascade in apoptotic cell. The role of BCL-2 and its homologues in tumorigenesis and chemoresistance is also mentioned.

LITERATURA

- ALNEMRI E. S., ROBERTSON N. M., FERNANDES T. F., CROCE C. M., LITWACK G., 1992. *Overexpressed full-length human Bcl-2 extends survival of baculovirus-infected SF9 insect cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7295–7299.
- BLAGOSKLONNY M. V., SCHULTE T., NGUYEN P., TREPEL J., NECKERS L. M., 1996. *Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway*. Cancer Res. 56, 1851–1854.
- BOISE L. H., GONZALEZ-GARCIA M., POSTEMA C. E., DING L., LINDSTEN T., TURKA L. A., MAO X., NUNEZ G., THOMPSON C. B., 1993. *bcl-x, a bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death*. Cell 74, 597–608.
- BORNER C., MARTINOU I., MATTMANN C., IRMLER M., SCHAEERER E., MARTINOU J.-C., TSCHOPP J., 1994. *The protein bcl-2a does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis*. J. Cell Biol. 126, 1059–1068.
- BOYD J. M., GALLO G. J., ELANGOVAN B., HOUGHTON A. B., MALSTROM S., AVERY B. J., EBB R. G., SUBRAMANIAN T., CHITTENDEN T., LUTZ R. J., CHINNADURAI G., 1995. *Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins*. Oncogene 11, 1921–1928.
- CHEN C.-Y., FALLER D. V., 1996. *Phosphorylation of Bcl-2 protein and association with p21^{Ras} in Ras-induced apoptosis*. J. Biol. Chem. 271, 2376–2379.
- CHINNAIYAN A. M., ORTH K., O'ROURKE K., DUAN H., POIRIER G. G., DIXIT V. M., 1996. *Molecular ordering of the cell death pathway. Bcl-2 and Bcl-xL function upstream of the CED-3-like apoptotic proteases*. J. Biol. Chem. 271, 4573–4576.
- CHITTENDEN T., HARRINGTON E. A., O'CONNOR R., FLEMINGTON C., LUTZ R. J., EVAN G. I., GUILD B. C., 1995a. *Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak*. Nature 374, 733–736.
- CHITTENDEN T., FLEMINGTON C., HOUGHTON A. B., EBB R. G., GALLO G. J., ELANGOVAN B., CHINNADURAI G., LUTZ R. J., 1995b. *A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions*. EMBO J. 14, 5589–5596.
- CHOI S. S., PARK I.-C., YUN J. W., SUNG Y. C., HONG S.-I., SHIN H.-S., 1995. *A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow*. Oncogene 11, 1693–1698.
- CHRESTA C. M., MASTERS J. R. W., HICKMAN J. A., 1996. *Hypersensitivity in human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax:Bcl-2 ratio*. Cancer Res. 56, 1834–1841.
- CLEARY M. L., SMITH S. D., SKLAR J., 1986. *Cloning and structural analysis of cDNA for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t (14;18) translocation*. Cell 47, 19–28.
- DARZYŃKIEWICZ Z., 1995. *Apoptosis in antitumor strategies: modulation of cell cycle or differentiation*. J. Cell. Biochem. 58, 151–159.
- DAS R., REDDY E. P., CHATTERJEE D., ANDREWS D. W., 1996. *Identification of a novel Bcl-2 related gene, BRAG-1, in human glioma*. Oncogene 12, 947–951.

- DIESTELHORST C. W., LAM M., MCCORMICK T. S., 1996. *Bcl-2 inhibits hydrogen peroxide-induced ER Ca^{2+} pool depletion*. *Oncogene* 12, 2051-2055.
- DIESTELHORST C. W., MCCORMICK T. S., 1996. *Bcl-2 acts subsequent to and independent of Ca^{2+} fluxes to inhibit apoptosis in thapsigargin- and glucocorticoid-treated mouse lymphoma cells*. *Cell Calcium* 19, 473-483.
- D'SA-EIPPER C., SUBRAMANIAN T., CHINNADURAI G., 1996. *bfl-1, a bcl-2 homologue, suppresses p53 induced apoptosis and exhibits potent cooperative transforming activity*. *Cancer Res.* 56, 3879-3882.
- EVANS V. G., 1993. *Multiple pathways to apoptosis*. *Cell Biol. Int.* 17, 461-476.
- FERNANDEZ-SARABIA M. J., BISCHOFF J. R., 1994. *BCL-2 associates with the ras-related protein R-ras p23*. *Nature* 366, 274-275.
- FISHER D. E., 1994. *Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold*. *Cell* 78, 539-542.
- GIBSON L., HOLMGREEN S. P., HUANG D. C. S., BERNARD O., COPELAND N. G., JENKINS N. A., SUTHERLAND G. R., BAKER E., ADAMS J. M., CORY S., 1996. *bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival*. *Oncogene* 13, 665-675.
- GILBERT M. S., SAAD A.H., RUPNOW B. A., KNOX S. J., 1996. *Association of BCL-2 with membrane hyperpolarization and radioresistance*. *J. Cell. Physiol.* 168, 114-122.
- GILLET G., GUERIN M., TREMBLEAU A., BRUN G., 1995. *A BCL-2-related gene is activated in avian cells transformed by the Rous sarcoma virus*. *EMBO J.* 14, 1372-1381.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1995. *Geny supresorowe - molekularne mechanizmy działania i ich znaczenie w kontroli proliferacji komórek*. *Kosmos* 44, 323-352.
- GUAN R. J., MOSS S. F., ARBER N., KRAJEWSKI S., REED J. C., HOLT P. R., 1996. *30 kDa phosphorylated form of Bcl-2 protein in human colon*. *Oncogene* 12, 2605-2609.
- HALDAR S., JENA N., CROCE C. M., 1994a. *Antiapoptosis potential of bcl-2 oncogene by dephosphorylation*. *Biochem. Cell Biol.* 72, 455-462.
- HALDAR S., NEGRINI M., MONNE M., SABBIONI S., CROCE C. M., 1994b. *Down regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells*. *Cancer Res.* 54, 2095-2097.
- HALDAR S., JENA N., CROCE C.M., 1995. *Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4507-4511.
- HALDAR S., CHINTAPALLI J., CROCE C.M., 1996. *Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells*. *Cancer Res.* 56, 1253-1255.
- HALE A.J., SMITH C. A., SUTHERLAND L. C., STONEMAN V. E. A., LONGTHORNE V. L., CULHANE A. C., WILLIAMS G. T., 1996. *Apoptosis: molecular regulation of cell death*. *Eur. J. Biochem.* 236, 1-26.
- HANADA M., AIME-SEMPE C., SATO T., REED J. C., 1995. *Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax*. *J. Biol. Chem.* 270, 11962-11969.
- HENGARTNER M. O., HORVITZ H. R., 1994. *Programmed cell death in Caenorhabditis elegans*. *Curr. Op. Gen. Develop.* 4, 581-586.
- HEROD J. J. O., ELIOPOULOS A. G., WARWICK J., NIEDOBITEK G., YOUNG L. S., KERR D. J., 1996. *The prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma*. *Cancer Res.* 56, 2178-2184.
- HOCKENBERRY D. M., ZUTTER M., HICKEY W., NAHM M., KORSMEYER S. J., 1991. *BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6961-6965.
- HOCKENBERRY D. M., OLTVAI Z. N., YIN X.-M., MILLIMAN C. L., KORSMEYER S. J., 1993. *Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis*. *Cell* 75, 241-251.
- HOCKENBERRY D. M., 1995. *bcl-2, a novel regulator of cell death*. *BioEssays* 17, 631-638.
- HUNTER J. J., BOND B. L., PARSLow T. G., 1996. *Functional dissection of the human Bcl-2 protein: sequence requirements for inhibition of apoptosis*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 877-883.
- HUNTER J. J., PARSLow T. G., 1996. *A peptide sequence from Bax that converts Bcl-2 into an activator of apoptosis*. *J. Biol. Chem.* 271, 8521-8524.
- JACOBSON M. D., 1996. *Reactive oxygen species and programmed cell death*. *TIBS* 21, 83-86.
- JANIAK F., LEBER B., ANDREWS D. W., 1994. *Assembly of Bcl-2 into microsomal and outer mitochondrial membranes*. *J. Biol. Chem.* 269, 9842-9849.
- KANE D. J., SARAFIAN T. A., ANTON R., HAHN H., BUTLER GRALLA E., SELVERSTONE VALENTINE J., ÖRD T., BREDESEN D. E., 1993. *Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species*. *Science* 262, 1274-1276.
- KIEFER M. C., BRAUER M. J., POWERS V. C., WU J. J., UMANSKY S. R., TOMEL L. D., BARR P. J., 1995. *Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak*. *Nature* 374, 736-739.
- KING K. L., CIDLOWSKI J.A., 1995. *Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death*. *J. Cell. Biochem.* 58, 175-180.
- KOCKI J., ROŻYŃKOWA D., 1991. *Gen bcl-2 w patofizjologii limfocytów B*. *Post. Biol. Kom.* 18, 169-182.
- KORSMEYER S. J., 1995. *Regulators of cell death*. *TIG* 11, 101-105.
- KORSMEYER S. J., YIN Y. M., OLTVAI Z. N., VEIS-NOVACK D. J., LINETTE G. P., 1995. *Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the Bcl-2 gene family*. *Biochem. Biophys. Acta* 1271, 63-68.
- KOZOPAS K. M., YANG T., BUCHAN H. L., ZHOU P., CRAIG R. W., 1993. *MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3516-3520.
- KRAJEWSKI S., TANAKA S., TAKAYAMA S., SCHIBLER M. J., FENTON W., REED J. C., 1993. *Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes*. *Cancer Res.* 53, 4701-4714.
- KUMAR S., 1995. *ICE-like proteases in apoptosis*. *TIBS* 20, 198-202.
- LAM M., DUBYAK G., CHEN L., NU_EZ G., MIESFELD R. L., DISTELHORST C. W., 1994. *Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca^{2+} fluxes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6569-6573.
- MARIN M. C., FERNANDEZ A., BICK R. J., BRISBAY S., BUJA L. M., SNUGGS M., MCCONKEY D. J., von ESCHENBACH A. C., KEATING M. J., McDONNELL T. J., 1996. *Apoptosis suppression by bcl-2 is correlated with the regulation of nuclear and cytosolic Ca^{2+}* . *Oncogene* 12, 2259-2266.
- MARTIN S. J., GREEN D. R., 1995. *Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?* *Cell* 82, 349-352.
- MCCONKEY D. J., ORRENIUS S., 1994. *Signal transduction pathways to apoptosis*. *Trends Cell Biol.* 4, 370-375.
- 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.
- MINN A. J., BOISE L. H., THOMPSON C. B., 1996. *Bcl-xs antagonizes the protective effects of Bcl-xl*. *J. Biol. Chem.* 271, 6306-6312.
- MIYASHITA T., HARIGAI M., HANADA M., REED J. C., 1994a. *Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene*. *Cancer Res.* 54, 3131-3135.
- MIYASHITA T., KRAJEWSKI S., KRAJEWSKA M., WANG H. G., LIN H. K., LIEBERMANN D. A., HOFFMAN B., REED J. C., 1994b.

- Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799-1805.
- MIYASHITA T., REED J. C., 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299.
- MUCHMORE S. W., SATTTLER M., LIANG H., MEADOWS R. P., HARLAN J. E., YOON H. S., NETTESHEIM D., CHANG B. S., THOMPSON C. B., WONG S.-L., NG S.-C., FESIK S. W., 1996. X-ray and NMR structure of human Bcl-x_L, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335-341.FE
- NICOTERA P., ZHIVOTOVSKY B., ORRENIUS S., 1994. Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 16, 279-288.
- OBEID L. M., HANNUN Y. A., 1995. Ceramide: a stress signal and mediator of growth suppression and apoptosis. *J. Cell. Biochem.* 58, 191-198.
- OLTVAI Z. N., MILLMAN C. L., KORSMEYER S. J., 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619.
- PATEL T., GORES G. J., KAUFMAN S. H., 1996. The role of proteases during apoptosis. *FASEB J.* 10, 587-597.
- RADZISZEWSKA E., 1995. Fizjologiczna rola apoptozy. *Post. Biol. Kom.* 22, 247-263.
- REED J. C., 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell. Biol.* 124, 1-6.
- REED J. C., 1995. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr. Op. Oncol.* 7, 541-546.
- REED J. C., MIYASHITA T., TAKAYAMA S., WANG H.-G., SATO T., KRAJEWSKI S., AIME-SEMPE C., BODRUG S., KITADA S., HANADA M., 1996. BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J. Cell. Biochem.* 60, 23-32.
- REYNOLDS J. E., YANG T., QIAN L., JENKINSON J. D., ZHOU P., EASTMAN A., CRAIG R.W., 1994. Mcl-1, a member of the Bcl-2 family, delays apoptosis induced by c-Myc overexpression in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 54, 6348-6352.
- REYNOLDS 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.
- RICHTER C., SCHWEIZER M., COSSARIZZA A., FRANCESCHI C., 1996. Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett.* 378, 107-110.
- ROŻYŃKOWA D., 1994. Genetyczne regulacje apoptozy, programowanej śmierci komórek. *Post. Biol. Komórki* 21, 303-318.
- ROŻYŃKOWA D., 1996. Apoptoza doświadczalna: modele indukcji in vitro i zastosowania. *Post. Biol. Kom.* 23, 421-444.
- RYAN K. M., BIRNIE G. D., 1996. Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem. J.* 314, 713-721.
- SEDLAK T. W., OLTVAI Z. N., YANG E., WANG K., BOISE L. H., THOMPSON C. B., KORSMEYER S. J., 1995. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7834-7838.
- SETO M., JAEGER U., HOCKETT R. D., GRANINGER W., BENNETT S., GOLDMAN P., KORSMEYER S. J., 1988. Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the BCL-2-Ig fusion gene in lymphoma. *EMBO J.* 7, 123-131.
- SHIMIZU S., EGUCHI Y., KOSAKA H., KAMIKE W., MATSUDA H., TSUJIMOTO Y., 1995. Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-x_L. *Nature* 374, 811-813.
- SHIMIZU S., EGUCHI Y., KAMIKE W., MATSUDA H., TSUJIMOTO Y., 1996a. Bcl-2 expression prevents activation of the ICE protease cascade. *Oncogene* 12, 2251-2257.
- SHIMIZU S., EGUCHI Y., KAMIKE W., WAGURI S., UCHIYAMA Y., MATSUDA H., TSUJIMOTO Y., 1996b. Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. *Oncogene* 13, 21-29.
- SIKORA E., 1994. Mechanizmy śmierci programowanej komórki (apoptozy). *Post. Biochem.* 39, 212-220.
- SIKORA E., 1995a. Czy znamy już gen śmierci. *Post. Biochem.* 41, 210-211.
- SIKORA E., 1995b. Apoptoza a onkogeneza. *Kosmos* 44, 353-363.
- SLATER A. F. G., NOBEL C. S. I., ORRENIUS S., 1995. The role of intracellular oxidants in apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1271, 59-62.
- SŁOWIŃSKI J., HARABIN-SŁOWIŃSKA M., KALUŻA J., 1996. Zjawisko apoptozy w układzie nerwowym. *Post. Biol. Kom.* 23, 299-312.
- THOMPSON C. B., 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.
- TSUJIMOTO Y., COSSMAN J., JAFE E., CROCE C. M., 1985. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440-1448.
- TSUJIMOTO Y., CROCE C. M., 1986. Analysis of the structure, transcript and protein products of bcl-2, the gene involved in follicular lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5214-5218.
- UHLMANN E. J., D'SA-EIPPER C., SUBRAMANIAN T., WAGNER A. J., HAY N., CHINNADURAI G., 1996. Deletion of a nonconserved region of Bcl-2 confers a novel gain of function: suppression of apoptosis with concomitant cell proliferation. *Cancer Res.* 56, 2506-2509.
- VAUX D. L., STRASSER A., 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2239-2244.
- VEIS D. J., SORENSON C. M., SHUTTER J. R., KORSMEYER S. J., 1993. Bcl-2 deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75, 229-240.
- WANG H.-G., MIYASHITA T., TAKAYAMA S., SATO T., TORIGOE T., KRAJEWSKI S., TANAKA S., HOVEY L., III, TROPPMAIR J., RAPP U. R., REED J.C., 1994. Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase. *Oncogene* 9, 2751-2756.
- WANG H.-G., TAKAYAMA S., RAPP U. R., REED J. C., 1996. Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7063-7068.
- WERTZ I. E., HANLEY M. R., 1996. Diverse molecular provocation of programmed cell death. *TIBS* 21, 359-364.
- WHYTE M., 1996. ICE/CED-3 proteases in apoptosis. *Trends in Cell Biol.* 6, 245-248.
- WHITE E., 1996. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes & Dev.* 10, 1-15.
- WILSON B. E., MOCHON E., BOXER L. M., 1996. Induction of bcl-2 expression by phosphorylated CREB proteins during B-cell activation and rescue from apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5546-5556.
- YANG E., ZHA J., JOCKEL J., BOISE L. H., THOMPSON C. B., KORSMEYER S.J., 1995. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-x_L and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80, 285-291.
- YIN X.-M., OLTVAI Z. N., KORSMEYER S.J., 1994. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369, 321-323.
- YOUNG R. L., KORSMEYER S. J., 1993. A negative regulatory element in the bcl-2 5'-untranslated region inhibits expression from an upstream promoter. *Mol. Cell Biol.* 13, 3686-3697.
- YUAN J., 1996. Evolutionary conservation of a genetic pathway of programmed cell death. *J. Cell. Biochem.* 60, 4-11.
- ZHA H., AIME-SEMPE C., SATO T., REED J. C., 1996. Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J. Biol. Chem.* 271, 7440-7444.

ZHU W., COWIE A., WASFY G.W., PENN L. Z., LEBER B., ANDREWS D. W., 1996. *Bcl-2 mutants with restricted subcellular*

location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. EMBO J. 15, 4130–4141.

ADDENDUM

Po oddaniu artykułu do druku ukazały się prace wskazujące na istotne znaczenie dla przebiegu apoptozy megakanalu mitochondrialnego (mitochondrial transition pore), na którego stan funkcjonalny wpływają białka z rodziny BCL-2. Podsumowanie tych badań Czytelnik może znaleźć w dwóch opracowaniach przeglądowych:

PETIT P. X., SUSIN S. -A., ZAMZAMI N., MIGNOTTE B., KROEMER G., 1996. *Mitochondria and programmed cell death: back to the future.* FEBS Lett. 396, 7–13.

KROEMER G., ZAMZAMI N., SUSIN S. A., 1997. *Mitochondrial control of apoptosis.* Immunology Today 18, 44–51.

W końcu 1996 r. w literaturze anglojęzycznej wprowadzono termin „caspase” dla oznaczenia proteaz z rodziny ICE/CED-3 (ALNEMRI i współaut.). W nazwie tej litera c oznacza proteazę cysteinową, a „aspase” odnosi się do zdolności tych proteaz do rozszczepiania wiązania sąsiadującego z kwasem aspargininowym. Poszczególne enzymy z tej rodziny będą oznaczone cyframi arabskimi.

ALNEMRI E. S., LIVINGSTON D. J., NICHOLSON D. W., SALVESEN G., THORNBERRY N. A., WONG W. W., YUAN J., 1996. *Human ICE/CED-3 protease nomenclature.* Cell 87, 171.