

EWA SIKORA

Zakład Biochemii Komórki

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

E-mail: esik@nencki.gov.pl

ROLA WAPNIA W APOPTOZIE

CYTOTOKSYCZNOŚĆ WAPNIA

Rola wapnia jako wewnątrzkomórkowego regulatora wielu procesów fizjologicznych jest od dawna dobrze znana. W ciągu ostatnich lat wzrósł również znacząco zasób wiedzy na temat udziału Ca^{2+} w procesach patologicznych. Naruszenie mechanizmów odpowiedzialnych za wewnątrzkomórkową homeostazę Ca^{2+} prowadzi do nieodwracalnych uszkodzeń komórki (NIKOTERA i współaut. 1992). Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia obserwuje się, na przykład, w neurotoksycznym działaniu metali ciężkich, jak ołów i rtęć, a także jako następstwo niedokrwienia (ischemii) (KOMULAINEN i BONDY 1988). Cytotoksycznemu działaniu aminokwasów, jak glutaminian i jego agonista kwas kainowy, na komórki nerwowe również towarzyszy wzrost wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} (GERLACH i współaut. 1996). Reperfuzja następująca po stanie niedokrwienia powoduje uszkodzenia serca, w wyniku wzmożonej produkcji wolnych rodników tlenowych i wzrostu stężenia Ca^{2+} (JOSEPHON i współaut. 1991). Akumulacja wewnątrzkomórkowego wapnia

ma również swój udział w hepatotoksyczności i nefrotoksyczności spowodowanej różnymi czynnikami (NIKOTERA i współaut. 1992, VAMAKAS i współaut. 1990). Rosnąca liczba dowodów wskazuje na udział Ca^{2+} w śmierci komórek układu odpornościowego (NIKOTERA i współaut. 1992, MCCONKEY i ORRENIUS 1996, ANDJELIC i współaut. 1997).

Poziom wapnia w komórce jest regulowany poprzez kanały napięciowo-zależne oraz receptory jonotropowe, transportujące go z zewnątrz oraz system przedziałowości komórkowej (CARAFOLI 1987). Wapń jest akumulowany w mitochondriach, siateczce śródplazmatycznej oraz jądrze. W wyniku naruszenia homeostazy wapniowej następuje wpływ Ca^{2+} z przedziałów komórkowych oraz wzrost jego napływu z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do wnętrza komórki. Konsekwencją cytotoksyczności Ca^{2+} jest w bardzo wielu przypadkach programowana śmierć komórki, czyli apoptoza (MCCONKEY i ORRENIUS, 1996, TRUMP i BERREZECKI 1996).

UDZIAŁ Ca^{2+} W APOPTOZIE

Fizjologicznej śmierci komórki, czyli właśnie apoptozie, poświęcono w ostatnich latach bardzo wiele uwagi. Dane na ten temat zostały zebrane w bardzo wielu artykułach przeglądowych, w tym również opublikowanych w języku polskim (ROŻYŃKOWA 1994, 1996, RADZISZEWSKA 1995, SIKORA 1994, 1995, 1996). Komórka umierająca śmiercią apoptotyczną charakteryzuje się pewnymi cechami morfologicznymi, biochemicznymi i genetycznymi, które odróżniają ją od komórki prawidłowej i nekrotycznej. Chromatyna komórki apoptotycznej ulega marginalizacji i fragmentacji. Komórka

kurczy się na skutek utraty wody i z czasem rozpada na ciała apoptotyczne. Bardzo często do zajścia apoptozy niezbędna jest aktywacja genów i synteza białka *de novo*. Apoptozę mogą wywołać bardzo różnorodne czynniki, u podstaw działania których leżą różne mechanizmy. Oznacza to, że istnieje bardzo wiele dróg, które prowadzą do zmian morfologicznych, charakteryzujących komórkę apoptotyczną (HALE i współaut. 1996, SIKORA 1995). Bardzo wygodnie jest za Kroemerem podzielić proces apoptozy na trzy fazy: fazę początkową, efektorową i degradacji (KROEMER i współaut.

1997). Faza początkowa może przebiegać swoją własną indywidualną ścieżką zdeterminowaną czynnikiem indukującym śmierć komórki. Każda „prywatna” ścieżka fazy początkowej prowadzi do zdarzeń biochemicznych, które według Kromera są już wspólne dla wszystkich induktorów apoptozy i wszystkich apoptotycznych komórek. Tę wspólną fazę Kroemer podzielił na odwracalną fazę efektorową oraz nieodwracalną fazę degradacji, w której zostają zaaktywowane procesy kataboliczne. Taki schemat apoptozy jest bardzo wygodny w opisie, jednakże jak dalej zobaczymy, śmierć fizjologiczna od początku do końca może mieć różny przebieg nie tylko zdeterminowany czynnikiem ją indukującym, typem komórki, ale także jej stanem fizjologicznym. Tak naprawdę trudno jest więc mówić o wspólnych dla wszystkich komórek fazach.

Chociaż udział wapnia w apoptozie jest bezsporny, to jednak jego rola w tym procesie jest ciągle kontrowersyjna. Wydaje się, że wapń jest związany ze wszystkimi fazami apoptozy: jako przekaźnik II-rzędowy w fazie początkowej, jako jon indukujący mitochondrialny megakanal podczas fazy efektorowej oraz jako aktywator transglutaminaz, proteaz i endonukleaz aktywnych w ostatniej fazie apoptozy czyli degradacji.

ROLA Ca^{2+} W POCZĄTKOWEJ FAZIE APOPTOZY — PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU DO APOPTOZY

Poprzez apoptozę są usuwane z organizmu komórki zbędne (potrzebne przejściowo w okresie rozwojowym), zmutowane i uszkodzone. Wiele komórek w dorosłym organizmie podlega ciągłym podziałom. Są to komórki macierzyste, na przykład krwiotwórcze i nabłonkowe. W celu utrzymania homeostazy organizmu część tych komórek musi być usuwana. Regulacja ilości komórek odbywa się zatem na poziomie kontroli ich podziałów i śmierci programowanej (SIKORA 1996). W organizmie odbywa się to poprzez gospodarkę hormonalną oraz dostępność czynników wzrostowych i substancji odżywczych dla komórek (THOMPSON 1995). *In vitro* apoptozę można wywoływać różnymi czynnikami od biologicznych, poprzez chemiczne, kończąc na fizycznych. Wydaje się, że mobilizacja wewnątrzkomórkowego wapnia w komórkach apoptotycznych może zachodzić przynajmniej na dwa różne sposoby. Jeden z nich „receptorowy” jest dobrze znany i opisany i polega na mobilizacji Ca^{2+} jako wtórnego przekaźnika pod wpływem czynników zewnętrznych oddziałujących na receptory komórkowe (BARAŃSKA

1997). Receptory błonowe z kolei przekazują sygnał na białka G, które pobudzają fosfolipazy C i D. Fosfolipaza C katalizuje hydrolizę 4,5-dwufosforanu inozytolu do trifosforanu inozytolu i diacyloglicerolu. Trifosforan inozytolu uwalnia Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej i powoduje napływ jonów wapniowych ze środowiska zewnętrznego poprzez otwarcie kanałów wapniowych. Taki sam przebieg przekazywania sygnału z błony jądrowej i uwalnianie przekaźnika II-rzędu, jakim jest wapń, występuje w komórkach pobudzonych zarówno do proliferacji, jak i apoptozy. I tak, pobudzenie receptora TCR (T cell receptor) w dojrzałych limfocytach uruchamia wyżej opisany szlak przekazywania sygnału, ale prowadzący w efekcie do ich proliferacji. Natomiast pobudzenie TCR w niedojrzałych limfocytach, czyli tymocytach prowadzi do ich śmierci poprzez apoptozę (McCONKEY i współaut. 1991). Przykładów na związek Ca^{2+} z apoptozą mamy bardzo wiele. Pobudzenie błonowego receptora dla antygeny powoduje śmierć programowaną limfocytów B, której również towarzyszy uwalnianie Ca^{2+} (TSUBATA i współaut. 1993). Bardzo wcześnie wykazano, że indukcja tymocytów do apoptozy hormonem glukokortykoidowym jest związana z napływem wapnia do komórek (KAISER i EDELMAN 1997). Natomiast w komórkach linii limfoidalnej po zadziałaniu glukokortykoidu obserwowano opróżnienie z wapnia magazynów siateczki śródplazmatycznej (LAM i współaut. 1993). Nasze własne obserwacje wskazują, że w ludzkich komórkach limfoidalnych, tak zwanych Jurkat, po indukcji apoptozy światłem UV następuje opróżnienie z Ca^{2+} zarówno magazynów mitochondrialnych, jak i siateczki śródplazmatycznej (PIWOCKA i współaut. 1997). Uważa się, że przyczynę śmierci apoptotycznej piramidalnych neuronów hipokampa, następującą podczas niedokrwienia mózgu lub spowodowaną długotrwałymi drgawkami, stanowi uwalnianie glutaminianu, który pobudza receptory glutaminianowe i powoduje wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} . Postuluje się nawet występowanie w umierających neuronach zjawiska aktywacji przez Ca^{2+} procesu transkrypcji tak zwanych „genów śmierci komórkowej”. Bennet i Huxlin sugerują, że śmierć przez apoptozę większości umierających neuronów odbywa się właśnie na skutek utraty przez te komórki zdolności do regulacji poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia, co określili mianem hipotezy „śmierci wapniowej” (ang. calmodulin hypothesis) (BENNET i HUXLIN 1996).

Drugi mechanizm udziału Ca^{2+} w indukcji apoptozy, tak zwany „wolnorodnikowy” polegałby na pośrednictwie wolnych rodników tlenowych, generowanych w wyniku zadziałania czynnika proapoptycznego. Stres oksydacyjny w tym przypadku stanowi przyczynę uwalniania Ca^{2+} , spowodowaną uszkodzeniem systemu transportu wapniowego w przedziałach wewnątrzkomórkowych (McCONKEY i ORRENIUS 1996).

Bezpośrednich dowodów na udział wapnia w apoptozie dostarczają doświadczenia z zastosowaniem jonoforów wapniowych jako induktorów śmierci programowanej oraz z drugiej strony chelatorów i związków buforujących wapń, jako inhibitorów apoptozy indukowanej różnymi czynnikami. Liczne przykłady opisu tego typu doświadczeń może Czytelnik odnaleźć w pracy przeglądowej (McCONKEY i ORRENIUS 1996). Nie zawsze jednak można jednoznacznie określić, który z wyżej wymienionych dwóch mechanizmów, to znaczy „receptorowy” czy „wolnorodnikowy”, jest zaangażowany w uwalnianie Ca^{2+} , gdyż produkcja wolnych rodników występuje również przy pobudzeniu receptorów. Należy również zaznaczyć, że bezpośredni związek pomiędzy apoptozą a mobilizacją wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} występuje nie we wszystkich komórkach indukowanych do apoptozy. Na przykład BEAVER i WARING (1994) nie znaleźli korelacji pomiędzy działaniem tak zwanej gliotoksyny, aktywatora białek G, oraz tapsigarginy — inhibitora ATPazy wapniowej z siateczki śródplazmatycznej, indukujących wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} , a apoptozą. Wydaje się, że indywidualna droga przekazywania sygnału do apoptozy nie koniecznie musi prowadzić poprzez wapń. W wyniku pobudzenia receptorów błonowych zaktywowanych czynnikami proapoptycznymi może dojść do aktywacji innych niż Ca^{2+} wtórnych przekaźników, takich jak ceramid czy cAMP (PENA i współaut. 1997). Indukcja apoptozy może też przebiegać poprzez zakwaszenie komórki w wyniku aktywacji antyportera Na/H (FAMULSKI 1997) lub za pośrednictwem wspomnianych wolnych rodników tlenowych, których rola w apoptozie jest ciągle kontrowersyjna, podobnie jak wapnia, choć udział ich w tym procesie jest niepodważalny (JACOBSON 1997).

ROLA Ca^{2+} W EFEKTOROWEJ FAZIE APOPTOZY; TWORZENIE MITOCHONDRIALNYCH MEGAKANALÓW

Efektorowa faza apoptozy jest, według Kroemera, wspólna dla wszystkich komórek

apoptotycznych i niezależna od czynnika indukującego apoptozę. Mianowicie wykazał on, podobnie jak inni, że komórki indukowane do apoptozy wykazują dosyć wczesny (rozpoczynający się od kiludziesięciu minut do kilku godzin) spadek włączania do mitochondriów barwników, świadczący o spadku mitochondrialnego potencjału transmembranowego (PETIT i współaut. 1996, SUSIN i współaut. 1996, KROEMER i współaut. 1997). Mitochondrialny potencjał transmembranowy powstaje na skutek asymetrycznego rozkładu protonów i innych jonów po dwóch stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej, tworząc chemiczny potencjał (pH) oraz gradient elektryczny, które są wynikiem funkcjonowania mitochondriów. Spadek potencjału mitochondrialnego świadczy o zaburzeniu funkcji tych organelli. Spadkowi potencjału mitochondrialnego w komórkach apoptotycznych towarzyszy, według Kroemera, powstanie megakanalów. Budowa megakanalów nie jest ostatecznie jeszcze wyjaśniona, ale wiadomo, że do ich powstania niezbędny jest między innymi napływ do mitochondriów Ca^{2+} . Powstanie megakanalów stanowi przyczynę gwałtownego wzrostu przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej dla jonów i cząsteczek ≤ 1500 Da takich jak protony, wapń, glutation (LENARTOWICZ i WUDARCZYK, 1997). Kroemer postuluje, że w komórkach indukowanych do apoptozy na skutek powstania megakanalów dochodzi do uwolnienia z mitochondriów białka AIF (ang. apoptosis inducing factor). Białko to miałoby indukować morfologiczne zmiany w cytoplazmie i jądrze charakterystyczne dla apoptozy, to znaczy obkurczanie komórki, fragmentację chromatyny i tworzenie ciałek apoptotycznych (KROEMER i współaut. 1997). Znane są jednak inne prace, w których autorzy postulują udział mitochondriów w apoptozie na zupełnie innej zasadzie, mianowicie spadku ich funkcji oddechowej i niedoboru ATP (RICHTER i współaut. 1996). Ponadto uważa się, że nie zawsze apoptozie towarzyszy spadek potencjału transmembranowego, lub może on zachodzić, ale w późnej fazie apoptozy, już po zadziałaniu endonukleaz degradujących DNA (COSSARIZZA i współaut. 1994).

Od dawna poszukiwano związku pomiędzy rolą wapnia w apoptozie a białkiem Bcl-2. Białko Bcl-2 należy do rodziny białek, które mogą zarówno hamować (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl1, A1 i inne), jak i aktywować (Bax, Bcl-xs, Bad, Bak, Bik i inne) apoptozę (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1997, RUPNIEWSKA i współaut.

1997). Bcl-2 zlokalizowano w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, siateczce śródplazmatycznej oraz błonie jądrowej. Wydaje się, że mitochondrialna lokalizacja Bcl-2 ma najistotniejsze znaczenie dla tego białka jako inhibitora apoptozy. Sądzi się mianowicie, że Bcl-2 stabilizuje znacząco potencjał transmembranowy, a jego wzmożona ekspresja w błonie mitochondrialnej zapobiega apoptozie indukowanej różnymi czynnikami. Hamując powstanie megakanałów, Bcl-2 przyczynia się do zatrzymania w mitochondriach Ca^{2+} oraz AIF. Nie wiadomo jednakże, jaki miałyby być mechanizm oddziaływania Bcl-2 z megakanałami. Wydaje się prawdopodobne twierdzenie, że Bcl-2 utrzymuje potencjał transmembranowy w równowadze, co z kolei przyczynia się do utrzymania mitochondrialnej homeostazy wapniowej (KROEMER i współaut. 1997). Udział Bcl-2 w hamowaniu apoptozy niekoniecznie musi być bezpośrednio związany z rolą Ca^{2+} i spadkiem potencjału mitochondrialnego. Mianowicie uważa się, że Bcl-2 zapobiega uwalnianiu z mitochondriów cytochromu c, do którego nie jest konieczne powstawanie megakanałów. Cytochrom c z kolei miałby aktywować proteazy czynne w procesie apoptozy (KLUCK i współaut. 1997, YANG i współaut. 1997).

ROLA Ca^{2+} W DEGRADACYJNEJ FAZIE APOPTOZY:
AKTYWACJA ENZYMÓW KATABOLICZNYCH
(ENDONUKLEAZ, PROTEAZ I TRANSGLUTAMINAZ)

Komórka umierająca śmiercią fizjologiczną rozpada się na ciała apoptotyczne, które dzięki wyeksponowanej na zewnętrznej błonie komórkowej fosfatydyloserynie są rozpoznawane i fagocytowane przez makrofagi lub sąsiadujące komórki (SAVILL i współaut. 1993). Ciała apoptotyczne zawierają zmienione funkcjonalnie, choć nie zawsze morfologicznie, mitochondria oraz fragmenty DNA. Tak dobrze scharakteryzowany morfologicznie końcowy etap apoptozy wydaje się wciąż bardzo mało poznany od strony biochemicznej. Wiemy, że w degradacji apoptotycznej komórki biorą udział endonukleazy, proteazy i transglutaminazy. Stosunkowo najlepiej do tej pory zostały opisane proteazy, a chociaż internukleosomalna fragmentacja DNA stanowi już klasyczny znacznik apoptozy, do tej pory nie udało się jednoznacznie zidentyfikować enzymu odpowiedzialnego za fragmentację DNA zachodzącą podczas śmierci fizjologicznej.

Endonukleazy zależne od Ca^{2+}

Internukleosomalna fragmentacja DNA na odcinki wielkości nukleosomu (180–200 par zasad) i jego wielokrotności do niedawna stanowiła ostateczny dowód na występowanie komórek apoptotycznych w badanym materiale. Dzisiaj wiemy, że apoptoza może zachodzić także bez internukleosomalnej fragmentacji DNA. Obserwuje się natomiast czasami degradację DNA, jak w przypadku komórek nowotworowych prostaty traktowanych etopozydem, na fragmenty o wielkości 50–300 kilo par zasad (OBERHAMMER i współaut. 1992). Jednakże niezależnie od wielkości fragmentów DNA, jego degradacja stanowi nieodwracalny etap śmierci komórki (BORTNER i współaut. 1995). Znamy kilka endonukleaz, o których wiadomo, że są aktywne w komórkach stymulowanych do apoptozy. Jest to DNAza I (PEITSCH i współaut. 1993), DNAza II (BARRY i EASTMAN 1993) oraz tak zwana NUC18 wyizolowana z jąder apoptotycznych tymocytów (MONTAGUE i współaut. 1994). Zarówno DNAza I, jak i NUC18 wymagają do swojej aktywności obecności Ca^{2+} i Mg^{2+} . Co ciekawe, że NUC18 wykazuje dużą homologię do cyklofilin, małych białek wiążących lek immunosupresyjny, cyklosporynę A. Niedawno odkrywcy tej nukleazy wykazali, że również cyklofiliny A, B i C mogą przeprowadzać degradację DNA w komórkach apoptotycznych (MONTAGUE i współaut. 1997). DNAza II natomiast nie jest zależna od Ca^{2+} i Mg^{2+} , a ponadto charakteryzuje się znacznie niższym, bo wynoszącym 5,5 optimum pH. W wielu komórkach znaleziono aktywność innych, tak zwanych kwaśnych endonukleaz, które również nie wymagają do swej aktywacji jonów dwuwartościowych (FAMULSKI 1997). Ostatnio opisano występowanie w szczurzych komórkach hepatomy, nowej nukleazy charakteryzującej się zdolnością do degradacji DNA zarówno na duże (50–300 kilo par zasad), jak też i internukleosomalne fragmenty. Aktywność tego enzymu, związana z fragmentacją na duże odcinki DNA, wymaga obecności tylko jonów magnezu, natomiast na odcinki internukleosomalne zarówno obecności Mg^{2+} jak i Ca^{2+} (PANDEY i współaut. 1997).

Proteazy zależne od Ca^{2+}

Na udział proteaz w apoptozie wskazuje wiele fizjologicznych, biochemicznych i genetycznych danych (PATEL i współaut. 1996). W komórkach apoptotycznych obserwuje się pro-

teolizę wielu białek, takich jak na przykład lamininy, histony, w tym przede wszystkim H1, poli(ADP-rybozylo)polimeraza. Często substratami proteaz są inne enzymy proteolityczne, których specyficzna hydroliza prowadzi do ich aktywacji (PATEL i współaut. 1996). Szczególnie spektakularna wydaje się kaskada proteolitycznej aktywacji licznych proteaz z rodziny tak zwanej ICE/ced3 (WHYTE 1996), które ostatnio otrzymały jednolitą nazwę kaspaz (ang. „caspases” od proteaz cysteinowych katalizujących hydrolizę za kwasem asparaginyowym) (ALNEMRI i współaut. 1996). Nie zawsze są jednak znane naturalne substraty proteaz aktywnych w komórkach apoptotycznych. Często bowiem o udziale proteaz w apoptozie świadczą dane uzyskane na podstawie hamowania apoptozy inhibitorami proteaz. W komórkach umierających śmiercią programowaną, poza obserwowaną aktywacją wspomnianych proteaz z rodziny ICE/ced3, sugeruje się udział proteaz serynowych (FEARNHEAD i współaut. 1995) oraz kalpain. Kalpains należą do neutralnych proteaz zależnych od Ca^{2+} i uważa się, że mogą stanowić bezpośredni związek pomiędzy wzrostem wewnątrzkomórkowego wapnia a apoptozą. Aktywację kalpain, jak do tej pory, obserwowano głównie w limfocytach T stymulowanych do apoptozy różnymi czynnikami (SQUIER i współaut. 1994, SARIN i współaut. 1995). Sądzi się, że substratami tych proteaz mogą być białka cytoszkieletu, takie jak fordryna czy wimentyna. Dokładnie nie wiadomo, jaki jest udział proteolizy tych substratów w apoptozie, ale niewykluczone, że mają one znaczenie w zmianach strukturalnych komórki prowadzących do powstania ciałek apoptotycznych (MC CONKEY i ORRENIUS 1996). Ostatnio wykazano, że inkubacja

jąder komórkowych z Ca^{2+} prowadzi do rapidnej degradacji białek jądrowej matriks, lamin. Postuluje się, że odpowiedzialna za degradację lamin może być hipotetyczna proteaza laminowa (CLAWSON i współaut. 1992, NEAMATI i współaut. 1995).

Transglutaminazy

Aktywacja transglutaminaz w apoptozie stanowi jedną z pierwszych biochemicznych obserwacji opisanych już w końcu lat 80., kiedy to wiedza na temat fizjologicznej śmierci zaledwie raczkowała (FESUS i współaut. 1987). Obecnie mamy już znacznie więcej danych na ten temat, aczkolwiek rola tych enzymów w apoptozie ciągle nie do końca jest poznana (FESUS i współaut. 1996). Transglutaminazy komórkowe są to enzymy zależne od Ca^{2+} , które katalizują postranslacyjne włączanie amin (w tym poliamin) do białek oraz sieciowanie białek pomostem gamma glutamylolizynowym lub gamma glutamyl-poliaminowym (MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA 1993). Uważa się, że transglutaminazy odgrywają rolę także w adhezji komórek, metastazie komórek nowotworowych oraz utrzymaniu zewnątrzkomórkowego matriks. Postuluje się, że transglutaminazy w komórkach stymulowanych do apoptozy biorą udział w stabilizacji struktury komórki apoptotycznej, aczkolwiek wykazano ostatnio, że w szczyrych tymocytach wystąpiła aktywacja transglutaminaz pod wpływem proapoptotycznego działania anty-CD3, deksametazonu i promieniowania jonizującego, ale nie aktywacji receptora Fas (SZONDY i współaut. 1997). Tak więc z pewnością poza transglutaminazami jeszcze inne czynniki muszą wpływać na kształtowanie struktury komórki apoptotycznej.

UWAGI KOŃCOWE

Apoptoza, podobnie jak podział, czy różnicowanie komórki jest procesem fizjologicznym, wymagającym do swego udziału bardzo często, choć nie zawsze, aktywacji genów, a z pewnością zawsze aktywacji wielu procesów biochemicznych. Nie dziwi więc fakt, że w realizacji programu śmierci apoptotycznej komórki jest zaangażowany wapń. Warto jednak pamiętać, że apoptoza jest procesem o wiele bardziej zróżnicowanym metabolicznie niż chociażby podział komórki. Znanych jest bardzo wiele dróg prowadzących do śmierci fizjologicznej.

Mobilizacja wapnia w komórce apoptotycznej nie zawsze musi być procesem specyficznym. Z drugiej strony, jakiejkolwiek naruszenie homeostazy wapniowej, bardziej lub mniej przypadkowe, stanowi zagrożenie dla prawidłowego funkcjonowania komórki i musi pociągać za sobą jej śmierć, zgodnie z postulatem, że apoptoza jest jednym z mechanizmów obronnych organizmu i służy między innymi usunięciu z niego komórek nieprawidłowych („better die than bad!”).

THE ROLE OF Ca^{2+} IN APOPTOSIS

Summary

Perturbation of intracellular Ca^{2+} homeostasis is observed in programmed cell death (apoptosis). The process of apoptosis can be divided into three phases: i) a death stimulus- and cell physiology-dependent, heterogeneous induction phase, ii) an effector phase in which mitochon-

drial megachannels might be involved, iii) and a degradation phase during which cells acquire biochemical and morphological features of the final stage of apoptosis. The involvement and role of cytosolic Ca^{2+} in all phases of apoptosis are discussed.

LITERATURA

- 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.
- ANDJELIC S., KHANNA A., SUTHANTHIRAN M., NIKOLIC-ZUGIC J., 1997. Intracellular Ca^{2+} elevation and cyclosporin A synergistically induce TGF- β 1-mediated apoptosis in lymphocytes. *J. Immunol.* 158, 2527–2534.
- BARAŃSKA J., 1997. Wapń jako pierwotny i wtórny przekaznik informacji. Udział Ca^{2+} w cyklu komórkowym. *Kosmos* 46, 33–45.
- BARRY M. A., EASTMAN A., 1993. Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 300, 440–450.
- BEAVER J. P., WARING P., 1994. Lack of correlation between early intracellular calcium ion rises and the onset of apoptosis in thymocytes. *Immunol. Cell Biol.* 72, 489–499.
- BENNET M. i HUXLIN K. R., 1996. Neuronal death in the mammalian nervous system: the calmodulin hypothesis. *Gen. Pharmac.* 27, 407–419.
- BORTNER C. D., OLDENBURG N. B. E., CIDLOWSKI J. A., 1995. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 5, 21–26.
- CARAFOLI E., 1987. Intracellular Ca^{2+} homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 395–433.
- CLAWSON G. A., NORBEK L. L., HATEM C. L., RHODES C., AMIRI P., MCKERROW J. H., PATIERNO S. R., FISKUM G., 1992. Ca^{2+} regulated serine protease associated with the nuclear scaffold. *Cell Growth & Diff.* 3, 827–838.
- COSSARIZZA A., KALASHNIKOVA G., GRASSILLI E., CHIAPPELLI F., SALVIOLI S., CAPRI M., BARBIERI D., TROIANO L., MONTI D., FRANCESCHI C. 1994. Mitochondrial modifications during rat thymocyte apoptosis: a study at the single cell level. *Exp. Cell Res.* 214, 323–330.
- FAMULSKI K., 1997. Udział zakwaszenia wewnątrzkomórkowego w procesie apoptozy. *Kosmos* 46, 45–53.
- FEARNHEAD H., RIVETT A., DINSDALE D., COHEN G., 1995. A pre-existing protease is a common effector of thymocyte apoptosis mediated by diverse stimuli. *FEBS Lett.* 357, 242–246.
- FESUS L., THOMAZY V., FALUS A., 1987. Induction and activation of transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett.* 224.
- FESUS L., MADI A., BALAJITHY Z., WEMES Z., SZONDY Z., 1996. Transglutaminase induction by various cell death and apoptotic pathways. *Experientia* 52, 942–949.
- GERLACH M., RIEDERER P., YODIM M. B., 1996. Molecular mechanisms of neurodegeneration. *Advances in Neurology* 69, 177–193.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1997. Regulacja procesu apoptozy — udział błonowych białek z rodziny Bcl-2. *Kosmos* 46, 53–64.
- HALE A., 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.
- JACOBSON M. D., 1997. Reactive oxygen species and programmed cell death. *TIBS* 21, 83–86.
- JOSEPHON R. A., SILVERMAN H. S., LAKATTA E. G., STERN M. D., ZWEIRER J. L., 1991. Study of the mechanisms of hydrogen peroxide and hydroxyl free radical — induced cellular injury and calcium overload in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 266, 2354–2361.
- KAISER N., EDELMAN I. S., 1997. Calcium dependence of glucocorticoid-induced lymphocytolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 638–642.
- KLUCK R. M., BOSSY-WETZEL E., GREEN D. R., NEWMAYER D. D., 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132–1136.
- KOMULAINEN H., BONDY S. C., 1988. Increased free intracellular Ca^{2+} by toxic agents; an index of potential neurotoxicity? *Trends Pharmacol. Sci.* 9, 154–156.
- KROEMER G., ZAMZAMI N., SUSIN S. A., 1997. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* 18, 44–51.
- LAM M., DUBYAK G., DISTELHORST C. W., 1993. Effect of glucocorticoid treatment on intracellular calcium homeostasis in mouse lymphoma cell. *Mol. Endocrinol.* 7, 686–693.
- LENARTOWICZ E., WUDARCZYK J. 1997. Uprzepuszczalnienie błony mitochondrialnej podczas stresu oksydacyjnego. *Kosmos*, 46, 97–105.
- MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA M., 1993. Nowy aspekt metabolizmu poliamin-postranslacyjne, zależne od transglutaminaz, modyfikacje białek przez poliaminy. *Post. Biochem.* 39, 118–126.
- MCCONKEY D. J., FOSDICK L., D'ADAMINO L., JONDAL M., ORRENIUS S., 1991. Co-receptor CD4/CD8 engagement enhances CD3- induced apoptosis in thymocytes. Implication for negative selection. *J. Immunol* 153, 2436–2443.
- MCCONKEY D. J., ORRENIUS S., 1996. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 59, 775–783.
- MONTAGUE J. W. HUGHES F. M. Jr., CIDLOWSKI J. A., 1997. Native recombinant cyclophilins A, B, and C degrade DNA independently of peptidylprolyl cis-trans-isomerase activity. Potential roles of cyclophilins in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 6677–6684.

- NEAMATI N., FERNANDEZ A., WRIGHT S., KIEFER J., MCCONKEY D. J., 1995. *Degradation of lamin B1 precedes oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic thymocytes and isolate thymocytes nuclei*. J. Immunol. 154, 3788–3795.
- NIKOTERA P., BELLOMO G., ORRENIUS S., 1992. *Calcium mediated mechanisms in chemically induced cell death*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32, 449–470.
- OBERHAMMER F., WILSON J. W., DIVE C., MORRIS I. D., HICKMAN J. A., WAKELING A. E., WALKER P. R., SIKORSKA M., 1992. *Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation*. EMBO J. 12, 3679–84.
- PANDEY S., WALKER P. R., SIKORSKA M., 1997. *Identification of a novel 97 kDa endonuclease capable of internucleosomal DNA cleavage*. Biochemistry 36, 711–720.
- PATEL T., GORES G., KAUFMAN S. H., 1996. *The role of proteases during apoptosis*. FASEB J. 10, 587–597.
- PEITSCH M. C., POLZAR B., STEPHAN H., CROMPTON T., MACDONALD H., MANNHERZ H., G., TSCHOP J. 1993. *Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death)*. EMBO J. 12, 371–377.
- PENA L. A., FUKS Z., KOLESNICK R., 1997. *Stress-induced apoptosis and the sphingomyelin pathway*. Biochem. Pharmacol. 53, 615–621.
- PETTIT 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.
- PIWOCKA K., SKIERSKI J., JERKA-DZIADOSZ M., NIEWCZAS B., DUSZYŃSKI J., SIKORA E. 1997. *Kurkumina i światło UV jako czynniki indukujące śmierć ludzkich komórek limfoidalnych linii Jurkat*. Komunikat na XXXIII Zjazd PTBioch, Katowice, str. 110.
- RADZISZEWSKA E., 1995. *Fizjologiczna rola apoptozy*. Post. Biol. Kom. 22, 247–263.
- RICHTER CH., 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. Kom. 21, 303–318.
- ROŻYŃKOWA D., 1996. *Apoptoza doświadczalna: modele indukcji in vitro i zastosowania*. Post. Biol. Kom. 23, 421–444.
- RUPNIEWSKA Z. M., ROŻYŃKOWA D., KUROWSKA M. 1997. *Rodzina genów bcl-2*. Post. Biol. Kom. 24, 33–47.
- SARIN A., NAKAJIMA H., HENKART P. A., 1995. *A protease-dependent TCR-induced death pathway in mature lymphocytes*. J. Immunol. 154, 5806–5812.
- SAVILL J., FADOK V., HENSON P., HASLETT C., 1993. *Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis*. Immunology Today 14, 131–136.
- SIKORA E., 1994. *Mechanizmy śmierci programowanej komórek (apoptozy)*. Post. Biochem. 40, 150–160.
- SIKORA E., 1995. *Apoptoza i onkogeneza*. Kosmos 44, 353–363.
- SIKORA E., 1996. *Cykl komórkowy i apoptoza: śmierć starej komórki*. Post. Biochem. 42, 108–112.
- SQUIER M. K. T., MILLER A. C. K., MALKINSON A. M., COHEN J. J., 1994. *Calpain activation in apoptosis*. J. Cell. Physiol. 159, 229–237.
- SUSIN S. A., ZAMZAMI N., KROEMER G., 1996. *The cell biology of apoptosis: evidences for the implication of mitochondria*. Apoptosis, 231–243.
- SZONDY Z., MOLNAR P., NEMES Z., BOYIDAZIS M., KEDEI N., TOTH R., FESUS L., 1997. *Different expression of tissue transglutaminase during in vivo apoptosis of thymocytes induced via distinct signalling pathways*. FEBS Lett. 404, 307–313.
- THOMPSON C. B., 1995. *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. Science 267, 1456–1462.
- TRUMP B. F., BEREZESKY I. K., 1996. *The role of altered $[Ca^{2+}]$ irregularity in apoptosis, oncosis, and necrosis*. Biochim. Biophys. Acta 1313, 173–178.
- TSUBATA T., WU J., HONJO T., 1993. *B-cell apoptosis induced by antigen receptor cross-linking is blocked by a T-cell signal through CD40*. Nature 363, 615–648.
- VAMVAKS S., SHARMA V. K., SHEU S-S, ANDERS M. W., 1990. *Perturbation of intracellular calcium distribution in kidney cells by nephrotoxic haloalkenyl cysteine S-conjugates*. Mol. Pharmacol. 38, 455–461.
- WHYTE M. 1996. *A link between cell-surface receptors and ICE proteases*. Trends Cell Biol. 6, 418.
- YANG J., LIU X., BHALLA K., KIM C. N., IBRAHIM A. M., CAI J., PENG T-I, JONES D. P. WANG X., 1997. *Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked*. Science 275, 1129–1132.