

Received: 2004.10.08
Accepted: 2004.12.09
Published: 2004.12.27

Apoptoza: Przepuszczalność błony mitochondrialnej i rola pełniona przez białka z rodziny Bcl-2

Apoptosis: Mitochondrial membrane permeabilization and the role played by Bcl-2 family proteins

Zofia Rupniewska¹, Agnieszka Bojarska-Junak²

¹ Klinika Hematoonkologii Akademii Medycznej w Lublinie

² Zakład Immunologii Klinicznej Akademii Medycznej w Lublinie

Streszczenie

Obecnie wiadomo, że mitochondria odgrywają główną rolę w procesie apoptozy. Przepuszczalność błon mitochondrialnych, a także wypływ czynników apoptogennych, które są zamknięte w mitochondrium są odpowiedzialne za kataboliczny obraz śmierci komórki. W pracy streszczono poglądy na temat mechanizmów wpływających na wyciek białek mitochondrialnych podczas apoptozy i rolę jaką w tych zjawiskach pełnią białka z rodziny Bcl-2.

Słowa kluczowe:

apoptoza • przepuszczalność błon mitochondrialnych • białka z rodziny Bcl-2

Summary

The crucial role of mitochondria in the initiation of apoptosis is well established. The metabolic consequences of mitochondrial membrane permeabilization as well as the leakage of apoptogenic factors normally confined to mitochondria determines the catabolic features of cell death. Here we attempt to summarize the current view of the mechanisms that lead to the efflux of many proteins from mitochondria during apoptosis and the role played by Bcl-2 family proteins in these events.

Key words:

apoptosis • mitochondrial membranes permeabilization • Bcl-2 family

Full-text PDF:

http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/6744.pdf

Word count:

4624

Tables:

–

Figures:

3

References:

82

Adres autorki:

prof. Zofia M. Rupniewska, Zakład Immunologii Klinicznej AM, ul. Jaczewskiego 8, 20-950 Lublin,
e-mail: agnieszkajunak@poczta.onet.pl

WSTĘP

Apoptoza lub programowana śmierć komórki jest uporządkowanym, czynnym procesem przebiegającym z aktywacją pewnych genów, w wyniku którego komórka popelnia samobójstwo. Proces ten jest niezbędny podczas rozwoju embrionalnego, a u osobników dorosłych odgrywa istotną rolę w zachowaniu homeostazy, a także w eliminacji komórek starych, zmutowanych i autoreaktywnych. Każdego dnia osoby dorosłe wytwarzają i tracą 50–70 bilionów komórek, co odpowiada prawie 1 milionowi komórek na sekundę. W warunkach prawidłowych procesy wytwarzania i utraty są ściśle ze sobą związane, tak że ostatecznie liczba komórek jest stała, a występujący niekiedy ich wzrost ma charakter przejściowy i wiąże się z odpowiedzią na bodźce środowiskowe. Nadmierna odporność komórek na apoptozę odgrywa rolę w rozwoju nowotworów lub autoimmunizacji, natomiast zbyt rozległa śmierć komórek wskutek apoptozy lub martwicy może być przyczyną ostrej niewydolności narządów lub rozwoju niektórych przewlekłych chorób degeneracyjnych. Zwykle procesy apoptozy i nekrotycznej śmierci komórki są rozgraniczane, nie mniej jednak częściowo mogą się zazębiać. Zarówno w apoptozie, jak i w martwicy wspólnym objawem jest wzrost przepuszczalności błony mitochondrialnej [22,25,35,71]. Obecnie wyróżnia się trzy fazy śmierci komórki związane z przepuszczalnością błony mitochondrialnej: fazę początkową (initiation), fazę rozstrzygającą (decision) i fazę rozkładu (degradation). W fazie początkowej w komórkach gromadzą się cząsteczki efektorowe, które bezpośrednio zwiększają przepuszczalność błony mitochondrialnej. Charakter cząsteczek efektorowych zależy od bodźców indukujących śmierć komórki, co wskazuje na różnorodność mechanizmów wywołujących przepuszczalność błony mitochondrialnej. W fazie drugiej, jak się wydaje, mniej mechanizmów wpływa na przepuszczalność błony mitochondrialnej, chociaż to one przypieczętowują ostateczny los komórki. W fazie rozkładu dochodzi do wypływu cząsteczek apoptogennych, które w warunkach prawidłowych są zamknięte w mitochondrium, co wywołuje zmiany kataboliczne i ostateczny rozkład komórki.

BŁONY MITOCHONDRIALNE W PRAWDŁOWYCH KOMÓRKACH

Mitochondria są organellami złożonymi z dwu wyspecjalizowanych błon: gładkiej błony zewnętrznej, która otacza silnie pofałdowaną błonę wewnętrzną. Błona wewnętrzna rozgranicza dwa przedziały (kompartymenty): dużą wewnętrzną przestrzeń zwaną macierzą mitochondrialną (matrix) i bardzo wąską przestrzeń międzybłonową.

Macierz mitochondrialna zawiera zagęszczoną mieszaninę wielu enzymów łącznie z enzymami cyklu kwasu cytrynowego. Podczas utleniania acetylo-CoA enzymy macierzy mitochondrialnej wytwarzają duże ilości zredukowanego dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH) i zredukowanego dinukleotydu flawoadeninowego (FADH_2), które służą jako cząsteczki nośnikowe dla „wysokoenergetycznych” elektronów przetrzuconych do wewnętrznej błony mitochondrialnej.

Wewnętrzna błona mitochondrialna jest kilkakrotnie większa od zewnętrznej dzięki pofałdowaniu w grzebienie (cristae), które sterczą do wnętrza mitochondrium. Wchodzące

w skład błony wewnętrznej białka w zasadzie spełniają trzy rodzaje czynności:

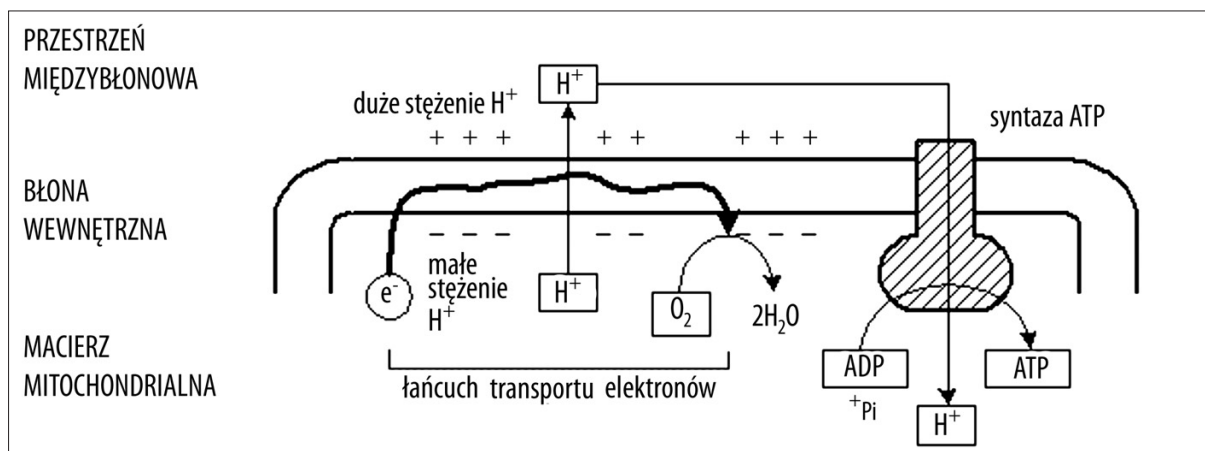
1. Tworzą łańcuch oddechowy, zwany także łańcuchem transportu elektronów, który jest odpowiedzialny za procesy utleniania.
2. Syntetyzują adenosynotryfosforan (ATP) z udziałem łańcucha przenośników elektronów i syntazy ATP.
3. Tworzą system transportowy dla wybranych metabolitów, umożliwiając ich przechodzenie z macierzy i do macierzy.

Ad 1

W następstwie transportu elektronów i fosforylacji oksydacyjnej zachodzi utlenianie NADH i FADH_2 oraz zatrzymywanie uwalnianej energii w cząsteczce ATP. Elektrony są transportowane z NADH i FADH_2 do tlenu przez łańcuch transportu elektronów w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Za każdym razem, gdy zachodzi przeniesienie elektronu, przenośnik przyjmujący ma większe powinowactwo do elektronów od przenośnika oddającego. Dzięki temu przepływ elektronów z NADH (najmniejsze powinowactwo do elektronów) do tlenu (największe powinowactwo do elektronów) jest jednokierunkowy. Potencjał staje się coraz bardziej dodatni od początku do końca łańcucha. Energia uwalniana podczas transportu elektronów zostaje wykorzystana do pompowania jonów H^+ z macierzy mitochondrialnej poprzez wewnętrzną błonę mitochondrialną do przestrzeni międzybłonowej. Przepompowywanie jonów H^+ generuje duże stężenie tych jonów w przestrzeni międzybłonowej i tworzy potencjał elektryczny wewnętrznej błony mitochondrialnej, który ma wartość dodatnią po jej stronie zwróconej do przestrzeni międzybłonowej, a spada po stronie przylegającej do macierzy (ryc. 1). W ten sposób powstaje elektrochemiczny gradient protonowy (H^+) ($\Delta\Psi$) [27].

Ad 2

Elektrochemiczny gradient protonowy jest wykorzystywany w procesie fosforylacji oksydacyjnej do napędzania syntezy ATP. Nazwa fosforylacja oksydacyjna pochodzi od syntezy ATP (nazwa *fosforylacja*) w następstwie utleniania NADH i FADH_2 (stąd nazwa *oksydacyjna*) dzięki transportowi elektronów przez łańcuch oddechowy. Sama synteza ATP zachodzi dzięki konserwatywnemu ewolucyjnie enzymowi – syntazie ATP. Syntaza ATP jest umiejscowiona na wewnętrznej błonie mitochondrialnej od strony macierzy [27]. Składa się z dwu głównych części: pęcherzyków submitochondrialnych o aktywności ATP-azy (tzw. $\text{F}_1\text{ATP-aza}$) i czynnika sprzęgającego (tzw. czynnik F_0), stąd jej inna nazwa F_0F_1 ATP-aza. Czynniki F_0 jest kanałem protonowym przecinającym wewnętrzną błonę mitochondrialną. Tak więc protony przez syntazę ATP przedostają się z powrotem do macierzy mitochondrialnej. Syntazę ATP napędza siła protomotoryczna, która jest sumą gradientu pH (tj. gradientu chemicznego jonów H^+) i potencjału błonowego (tj. potencjału ładunków elektrycznych utworzonego w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej). Transport elektronów jest ściśle sprzężony z syntezą ATP. Elektrony nie przepływają przez łańcuch oddechowy do tlenu, jeśli jednocześnie nie zachodzi fosforylacja adenosynodifosforanu (ADP) do ATP. Gdy ADP jest dużo, to odbywa się intensywny transport elektronów i powstaje



Ryc. 1. Mechanizm fosforylacji oksydacyjnej. Gdy elektron o dużej energii przechodzi wzdłuż łańcucha transportu elektronów, część uwalnianej energii zostaje użyta do pompowania H^+ z macierzy mitochondrialnej do przestrzeni międzybłonowej. Powstały w poprzek wewnętrznej błony elektrochemiczny gradient protonowy kieruje H^+ z powrotem do macierzy przez syntazę ATP. Syntaza ATP zużywa energię przepływu H^+ w macierzy do syntezy ATP z ADP i nieorganicznego fosforanu (Pi) [modyfikacja wg 27]

ATP, gdy ADP jest mało, to szybkość transportu elektronów ulega zmniejszeniu. Tak więc przepływ elektronów zachodzi tylko wówczas, kiedy istnieje zapotrzebowanie na syntezę ATP [27]

Ad 3

Błona wewnętrzna jest w zasadzie nieprzepuszczalna. Istnieją w niej jednak systemy transportowe dla wybranych metabolitów o masie cząsteczkowej mniejszej niż 1,5 kDa. Tak na przykład nośnikiem nukleotydów adeninowych jest translokaza ATP i ADP (adenine nucleotide translocator-ANT), która sprzega transport ADP z przeniesieniem ATP. Cząsteczka ADP może dostać się do macierzy mitochondrialnej tylko wtedy, kiedy ATP ją opuszcza i na odwrót (antyport)

Zewnętrzna błona mitochondrialna, w przeciwieństwie do wewnętrznej działa na zasadzie sita molekularnego przepuszczającego większość jonów i drobnocząsteczkowych substancji rozpuszczonych w wodzie o masie cząsteczkowej do 5 kDa. Jest to możliwe dzięki temu, że większość białek błony zewnętrznej tworzy tzw. kanały anionowe zależne od napięcia (voltage dependent anion channel – VDAC), nazywane także poryną mitochondrialną. Gdy odtworzono w planarnych błonach monomer VDAC 30 kDa, przybierał on postać poru wodnego 2,5–3 nm [12,44], który umożliwiał nienaładowanym polimerom (takim jak insulina, dekstran i glikol polietylenowy) o masie cząsteczkowej poniżej 5 kDa przechodzenie przez błony. Jednakże rozmiary kanału są inne dla naładowanych cząsteczek. Kanał ma nawet zdolności różnicujące cząsteczki na podstawie ich trójwymiarowej struktury [55]. Aniony z ładunkiem ujemnym, takie jak ATP są faworyzowane dzięki naładowanej dodatnio sieci wewnątrz kanału. Jedną z charakterystycznych właściwości VDAC jest „bramkowanie” zależne od napięcia (voltage gating). Kanały są otwarte i wykazują dużą przewodność przy niskich napięciach (<30mV) i wracają do małej przewodności („closed states”) przy wysokich napięciach. Otwarty VDAC jest przepuszczalny dla metabolitów anionowych, natomiast w konfiguracji zamkniętej staje się nieprzepuszczalny dla anionów, na

przykład takich jak ATP i fosfokreatyna. Tak więc kanał VDAC działa w sposób odwracalny i jest wybiórczy zarówno dla faworyzowanych anionów, jak i kationów [53,54,70]. Z pewnością cząsteczki dodatnio naładowanego cytochromu c (1,2 kDa) w prawidłowych warunkach nie mogą przenikać przez ten kanał. U ssaków występują trzy izoformy VDAC (VDAC1, VDAC2 i VDAC3), przy czym sugeruje się, że każda z nich pełni nieco odmienną rolę fizjologiczną [56,77,78]. Liczba cząsteczek VDAC1 jest znacznie większa w porównaniu z niewielką liczbą cząsteczek VDAC2. Myszy z niedoborem *vdac 3* są żywotne, myszy z niedoborem *vdac1* wykazują swoistą dla szczerpu śmiertelność embrionalną, natomiast embriony z niedoborem *vdac 2* są niezdatne do życia [1,56,74] Białka z rodziny Bcl-2 (B-cell leukemia) kontrolują przepuszczalność zewnętrznej błony mitochondrialnej, m.in. przez regulację otwierania lub zamykania kanału VDAC o czym będzie mowa dalej. Dzięki tym właściwościom kanału VDAC macierz mitochondrialna zawiera ściśle wyselekcjonowaną grupę małych cząsteczek, natomiast zawartość drobnocząsteczkowych związków w międzybłonowej przestrzeni mitochondrialnej jest zbliżona do cytosolu.

Tylko 13 podjednostek łańcucha oddechowego w błonie wewnętrznej jest kodowanych przez mały (około 16 500 par zasad) genom mitochondrialny, który znajduje się w macierzy. Wszystkie inne białka mitochondrialne (ponad 99%) są kodowane przez genom jądrowy. Translacja tych białek zachodzi w rybosomach cytoplazmatycznych i w końcu wybiórczo są one importowane do poszczególnych składowych mitochondrium, dzięki czemu skład białkowy każdej z błon mitochondrialnych, a także macierzy i przestrzeni międzybłonowej ma unikalny charakter.

APOPTOTYCZNA PRZEPUSZCZALNOŚĆ BŁON MITOCHONDRIALNYCH

Moment, od którego rozpoczyna się już nieodwracalny proces śmierci komórki wyznaczają dwa spletające się ze sobą molekularne zdarzenia, są to: przepuszczalność błony mitochondrialnej i aktywacja kaspaz. Apoptotyczna przepuszczalność błon mitochondrialnych w różnym stopniu dotyczy błony zewnętrznej i wewnętrznej, czemu zwykle,

ale nie zawsze towarzyszy obrzęk macierzy mitochondrialnej. Wydaje się, że przepuszczalność błony wewnętrznej nie jest tak stałą cechą apoptozy, jak przepuszczalność błony zewnętrznej. Apoptotyczna przepuszczalność błony wewnętrznej kończy się jej utratą zdolności do pełnienia bariery, co wiąże się z uwalnianiem białek, które w warunkach prawidłowych są zamknięte w przestrzeni międzybłonowej. Do białek tych należą:

- cytochrom c (który wchodzi w skład kompleksu aktywującego kaspazę 9);
- drugi mitochondrialny aktywator kaspaz (second mitochondrial activator of caspases, inna nazwa direct IAP binding protein with PI – Smac/DIABLO);
- proteaza serynowa Htr A2/Omi (high-temperature requirement serie protease A2) (Smac/DIABLO i Htr A2/Omi blokują rodzinę białek hamujących apoptozę);
- kinaza adenylanowana (adenylate kinase 2);
- czynnik indukcji apoptozy (apoptosis-inducing factor – AIF);
- kilka prokaspaz, jak na przykład prokaspazy 2, 3 i 9;
- a także jeszcze inne czynniki apoptogenne.

Wpływ z mitochondriów cząsteczek promujących śmierć jest konieczny do wystąpienia szybkiej aktywacji kaskady apoptotycznej.

Na temat mechanizmów odpowiedzialnych za apoptotyczną przepuszczalność błony wewnętrznej istnieją dwie główne teorie. Według jednej zewnętrzna błona mitochondrialna ulega nieswoistemu przerwaniu. Teoria druga zakłada powstawanie w zewnętrznej błonie mitochondrialnej kanałów, które umożliwiają wypływ cytochromu c [18,45]. Istotnie, w niektórych modelach doświadczalnych w mikroskopie elektronowym wykryto ogniskowe pęknięcia błony wewnętrznej z wkliniowywaniem się błony wewnętrznej [38,71]. Na powstawanie kanałów w zewnętrznej błonie mitochondrialnej istotny wpływ wywiera rodzina białek Bcl-2.

W porównaniu z apoptotyczną przepuszczalnością błony wewnętrznej, apoptotyczna przepuszczalność błony zewnętrznej nie prowadzi do tak masowego wycieku białek z macierzy. Przepuszczalność błony wewnętrznej rozwija się stopniowo, przy czym wzrasta dla cząsteczek rozpuszczonych o masie około 1,5 kDa, co wiąże się z rozproszeniem (dissipation) gradientu protonów, który jest odpowiedzialny za potencjał transbłonowy mitochondrium ($\Delta\psi_m$). Wpływ małych rozpuszczonych cząsteczek, takich jak wapń i glutation lub dopływ wody i sacharozę prowadzą do różnego stopnia obrzęku macierzy [5].

WPŁYW PROAPOPTOTYCZNYCH BIAŁEK Z RODZINY BCL-2 NA PRZEPUSZCZALNOŚĆ BŁON MITOCHONDRIALNYCH

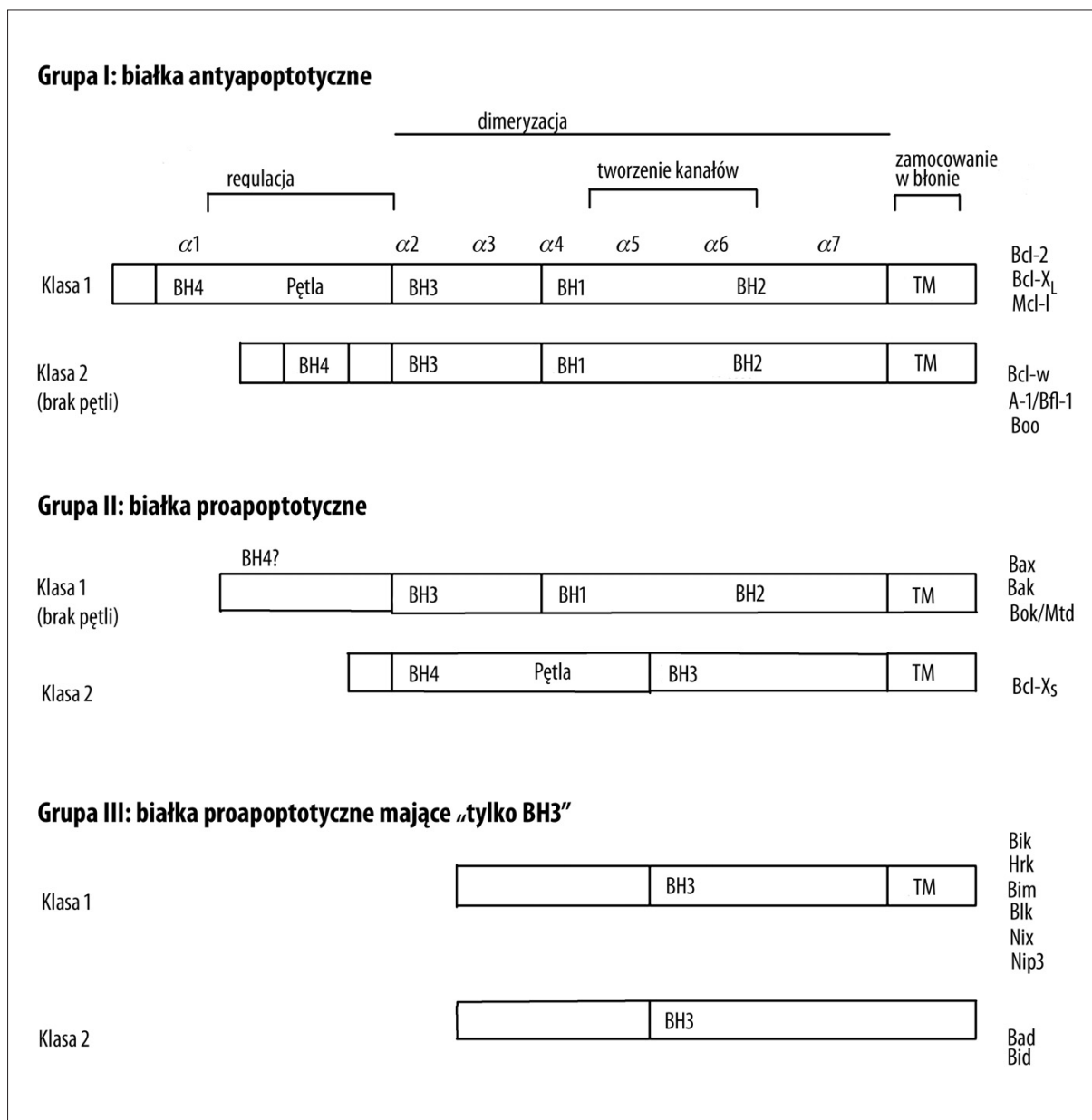
Białka Bcl-2 stanowią grupę produktów onkogenów komórkowych, które w przeciwieństwie do produktów innych onkogenów nie wpływają na proliferację komórkową, ale regulują proces śmierci komórki. Najwcześniejszym odkrytym członkiem tej grupy, od którego zresztą pochodzi nazwa całej grupy jest antyapoptotyczne białko Bcl-2. Białka z rodziny Bcl-2 mają wspólny, co najmniej jeden z czterech regionów nazywanych domenami homologii z Bcl-2 (Bcl-2 homology domains-BH): BH1, BH2, BH3 i BH4. Domeny te mniej więcej odpowiadają helisom α , które warunkują

ich strukturę i funkcję. Wszystkie cztery domeny występują tylko w białkach antyapoptotycznych. Natomiast niektóre z białek proapoptotycznych, takich jak Bad i Bid mają tylko domenę BH3. Większość białek z rodziny Bcl-2 ma przy C-końcu transbłonową sekwencję sygnałno-zakotwiczącą (signal-anchor sequence), która ułatwia zamocowanie białka na błonach wewnątrzkomórkowych, takich jak zewnętrzna błona mitochondrialna, błony siateczki endoplazmatycznej lub zewnętrzna otoczka jądra [31,69].

Ze względu na funkcję i strukturę, białka z rodziny Bcl-2 podzielono na trzy grupy [26,69] (ryc.2).

1. Do grupy I należą białka antyapoptotyczne, takie jak Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1 i inne. Białka te w zasadzie mają wszystkie cztery domeny BH (od BH1 do BH4), chociaż u niektórych członków istnienie domeny BH4 nie jest pewne. Ponadto mają one transbłonową sekwencję zakotwiczącą.
2. Do grupy II należą białka proapoptotyczne, jak na przykład Bax, Bak i inne (tzw. „multidomain” proapoptotic proteins). Białka te mają sekwencje homologiczne z BH1, BH2 i BH3, ale poza jednym wyjątkiem (białko Bcl-x_S) są pozbawione domeny BH4. Zawierają także transbłonową sekwencję sygnałno-zakotwiczącą.
3. Do grupy III należą białka proapoptotyczne mające „tylko domenę BH3”. (tzw. „BH3-only” proteins). Ze względu na posiadanie lub brak transbłonowej sekwencji sygnałno-zakotwiczącej białka grupy III dzielą się jeszcze na dwie klasy. Do klasy 1 należą białka mające tę sekwencję, jak na przykład Bik, Bim, Blk, do klasy 2 należą dwa białka Bad i Bid pozbawione tej sekwencji.

Należy jednak zaznaczyć, że w świetle niedawnych badań podział ten budzi kontrowersje. Mianowicie, niektóre białka z rodziny Bcl-2 zależnie od rodzaju komórek i czynników stymulujących mogą wykazywać przeciwne do znanych wcześniej cechy fenotypowe. I tak, zwiększona ekspresja Bcl-2 lub Bcl-x_L w niektórych rodzajach komórek raczej ułatwia niż zapobiega apoptozie, podczas gdy Bax i Bak wykazują działanie antyapoptotyczne [21,67]. Mechanizm prowadzący do zmiany funkcji tych białek nie jest jeszcze do końca wyjaśniony. Pewne światło rzucają badania Lin i wsp. [40], którzy oceniali skutki przyłączenia do błony mitochondrialnej jądrowego receptora Nur77 przez białko Bcl-2. Nur77 (nazywany także TR3 lub NGFI-B) należy do nadrodziny jądrowych receptorów steroidów/tyreoidów/retinoidów i odgrywa rolę w regulacji wzrostu i apoptozy. Wykazano, że podczas apoptozy Nur77 zostaje przemieszczony z jądra na mitochondrium, co indukuje uwalnianie cytochromu c [39]. Mitochondrialną lokalizację Nur77 obserwowano także w przebiegu apoptozy różnych rodzajów komórek nowotworowych. Wymienieni już Lin i wsp. [40] wykazali, że dla mitochondrialnej lokalizacji Nur77 i indukcji apoptozy konieczne jest związanie Nur77 z Bcl-2. W procesie tym istotną rolę odgrywa region pętli położony między domenami BH4 i BH3 Bcl-2. Reakcja ta powoduje zmianę konformacji Bcl-2, która prowadzi do ekspozycji domeny BH3 i zmiany funkcji Bcl-2 z czynności antyapoptotycznej na działanie proapoptotyczne. Jednakże powyższe odkrycia nie wpłynęły jeszcze na zmianę klasyfikacji białek z rodziny Bcl-2.



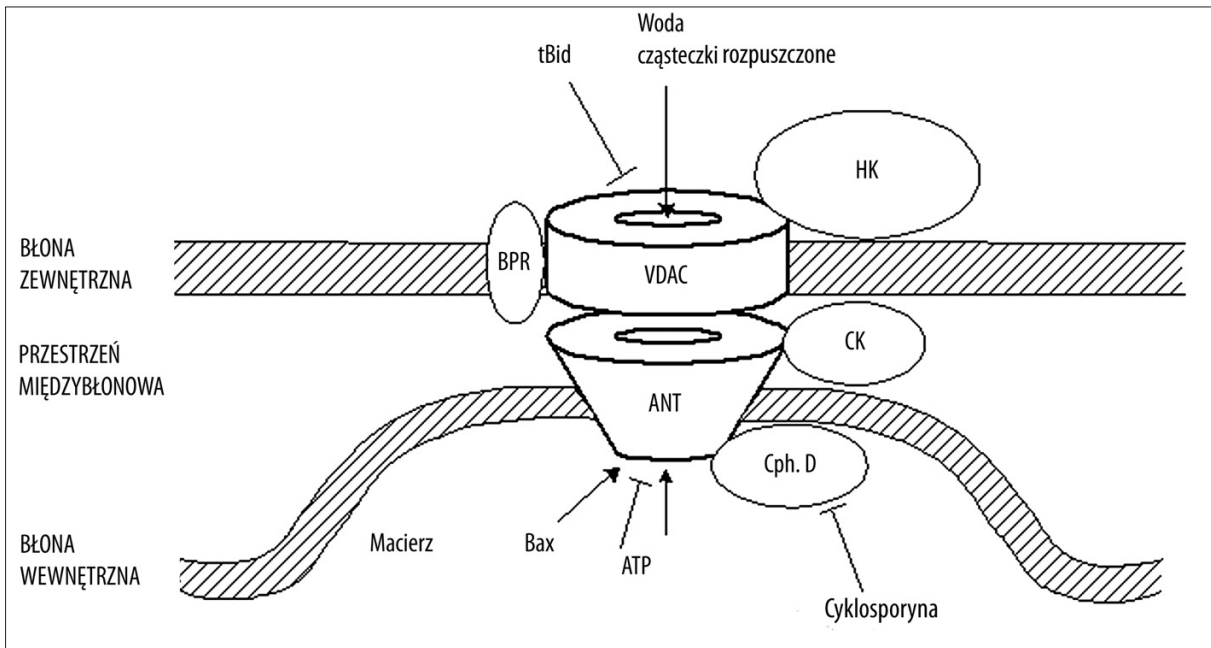
Ryc. 2. Schemat budowy białek z rodziny Bcl-2. Domeny BH1 do BH4 są ewolucyjnie stabilne. Domena BH4 białka takiego jak A-1/Bfl jest w bardzo małym stopniu homologiczna z domeną BH4 białka Bcl-2. Być może Bax i Bak mają także domenę wykazującą odległe podobieństwo do domeny BH4 Bcl-2. Na górze ryciny zaznaczono niektóre właściwości czynnościowe poszczególnych regionów Bcl-2. Regiony między helisami $\alpha 1$ a $\alpha 2$ odpowiadają pętli, która jak się wydaje pełni czynności regulacyjne. Dwa białka z grupy III Bad i Bid nie mają transbłonowej sekwencji zamocowującej [modyfikacja wg 31,69]

PROAPOPTOTYCZNE BIAŁKA GRUPY II

Rola domen BH1 i BH2

Z domenami BH1 i BH2 wiąże się zdolność białek zarówno anty-, jak i proapoptotycznych z rodziny Bcl-2 do tworzenia porów/kanałów w błonach mitochondrialnych i ich regulacyjny wpływ na uwalnianie cytochromu c z mitochondriów. Istnieją podobieństwa strukturalne między domenami BH1 i BH2 białek z rodziny Bcl-2, a domenami tworzącymi pory toksyn bakteryjnych, takich jak kolicyna A1 i E1 oraz toksyna błonnicza [47]. Wykazano, że podobnie jak toksyny bakteryjne proapoptotyczne białko Bax

może wsuwać się w planarną syntetyczną warstwę lipidową i nawet tworzyć kanały przewodzące jony [2,59]. Jednakże w żywotnych komórkach Bax występuje albo w cytosolu jako monomer, albo luźno przylega do zewnętrznej błony mitochondrialnej, a jego hydrofobowa kieszeń złożona z domen BH1, BH2 i BH3 jest zajęta przez helisę C-końcową [68]. (Jest interesującym, że inne wielodomenowe proapoptotyczne białko Bak, w przeciwieństwie do Bax, nawet w komórkach nieekspozowanych na bodźce apoptotyczne stanowi integralną część błony mitochondrialnej, tak że jego C-końcowa sekwencja zakotwicza się nie jest w stanie zająć jego kieszeni [23,75].) Monomer Bax nie jest zdolny ani do tworzenia kanałów w błonach lipido-



Ryc. 3. Prawdopodobne komponenty mitochondrialnego poru przejściowej przepuszczalności (permeability transition pore – PTP) w konfiguracji otwartej. Otwarcie poru umożliwia przepływ anionów z ładunkiem ujemnym (m.in. ATP). W warunkach apoptotycznej przepuszczalności błon mitochondrialnych do macierzy przedostaje się woda i cząsteczki rozpuszczone, co powoduje obrzęk macierzy i pęknięcie zewnętrznej błony mitochondrialnej. Sugeruje się, że Bax poprzez związanie się z ANT może wywoływać otwarcie się PTP, natomiast tBid powoduje zamknięcie VDAC [modyfikacja wg 18]; ANT – translokaza ATP i ADP (adenine nucleotide translocator), VDAC – kanał anionowy zależny od napięcia (voltage dependent anion channel), nazywany także porą mitochondrialną, BPR – obwodowy receptor benzodiazepiny (benzodiazepine peripheral receptor), HK – heksokinaza, CK – kinaza kreatynowa (creatine kinase), Cph.D – cyklofilina D, tBid i Bax – białka proapoptotyczne z rodziny Bcl-2

wych, ani do uwalniania cytochromu c z izolowanych mitochondriów. Dopiero po wystąpieniu sygnałów indukujących przepuszczalność błony mitochondrialnej zarówno cytosolowy Bax, jak i Bax znajdujący się przy błonie mitochondrialnej ulega homoooligomeryzacji i jako multimetr zostaje wprowadzony w zewnętrzną błonę mitochondrialną. Przypuszcza się że oligomery Bax największych rozmiarów mogą tworzyć, podobnie jak w sztucznych błonach, kanały wystarczająco duże do uwalniania cytochromu c [3]. Oligomeryzacja Bax wywołuje inne proapoptotyczne białko Bid, mające „tylko domenę BH3”, które wcześniej musi zostać rozszczepione przez kaspazę 8/10 do postaci „skróconej” („truncated Bid” – t-Bid). Po interakcji z t-Bid, Bax zostaje całkowicie wprowadzony w błonę mitochondrialną, gdzie przyjmuje konformację apoptotyczną, występuje ekspozycja końca aminowego i tworzą się tetramery, co wywołuje przepuszczalność błony mitochondrialnej [3,20]. Białka antyapoptotyczne, takie jak Bcl-2 i Bcl-x_L, które przeważają na błonach mitochondrialnych mogą hamować działanie Bid na Bax, natomiast proapoptotyczne białka Bad i Bik hamują działanie Bcl-2 lub Bcl-x_L.

Poza bezpośrednią zdolnością do tworzenia kanałów przez oligomery Bax, białka takie jak Bax lub Bak mogą jeszcze wchodzić w interakcję z niektórymi białkami błon mitochondrialnych. Zdaniem Schimizu i wsp. [61,62,63] Bax i Bak otwierają kanał VDAC w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, podczas gdy antyapoptotyczne białko Bcl-x_L stymuluje zamknięcie VDAC. (Istnieją jednak przeciwne dane, wskazujące, że Bcl-x_L raczej otwiera VDAC, co pozwala na utrzymanie wymiany ADP↔ATP i zachowanie

żywności komórki) [70]. Co więcej, sugeruje się, że Bax tworzy z VDAC kanał hydrofobowy, przez który zostaje uwolniony cytochrom c [61,62,63]. Badania z użyciem liposomów i planarnych błon fosfolipidowych wykazały, że Bax zapoczątkowuje powstawanie nowych kanałów zawierających VDAC, większych od tych, które są tworzone przez sam VDAC. Schimizu i wsp. [61] sugerują, że chociaż kanały tworzone przez sam Bax lub sam VDAC są nieprzepuszczalne dla cytochromu c, to jednak istnieje prawdopodobieństwo, że nowe większe pory pozwolą na wpływ cytochromu c. W przeciwieństwie do tych sugestii Rostovtseva i wsp. [52] nie zauważyli żadnej elektrofizjologicznie wykrywalnej reakcji między kanałami VDAC wyizolowanymi z ssaczych mitochondriów, a monomerycznymi lub oligomerycznymi postaciami Bax. W związku z czym sądzą oni, że Bax nie wywołuje uwalniania cytochromu c przez działanie na VDAC.

Niewątpliwie, mechanizm odpowiedzialny za przepuszczalność zewnętrznej błony mitochondrialnej jest znacznie bardziej złożony i obejmuje poza kanałem VDAC jeszcze inne białka i wiele czynników, które tworzyłyby przejście dla cytochromu c [81]. Proponowany jest udział ceramidów w formowaniu tego szlaku przepuszczalności [65]. Mazo i wsp. [46] sugerują, że Bax może przez wiązanie się z ANT, która jest umiejscowiona w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, wywoływać otwarcie megakanałów mitochondrialnych zwanych porami przejściowej przepuszczalności (permeability transition pore complex – PTP). Kompleks PTP jest nieselektywnym kanałem o dużym stopniu przewodności, który powstaje przez połączenia

białek zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondrialnej w miejscach ich styku [13]. Chociaż dokładny skład kompleksu PTP nie został do końca poznany, to dotychczasowe dane wskazują, że podstawową strukturę tworzą: ANT znajdująca się w błonie wewnętrznej, VDAC umiejscowiony w błonie zewnętrznej, obwodowy receptor benzodiazepiny (benzodiazepine peripheral receptor-BPR), cyklofilina D i białka macierzy rozpuszczalne w wodzie [18] (ryc. 3). Przy całkowitej otwartej konformacji PTP przepuszczane są rozpuszczone cząsteczki powyżej 1,5 kDa. Jednakże niektórzy autorzy kwestionują interakcję między ANT a Bax [63].

Rola domeny BH3

Dla czynności wszystkich białek proapoptotycznych konieczna i wystarczająca jest domena BH3, dzięki której białka te mogą tworzyć heterodimery z białkami antyapoptotycznymi z rodziny Bcl-2 [31] i hamować ich czynność. Domena BH3 jest krótkim peptydem złożonym z około 15–20 aminokwasów. Po raz pierwszy została opisana w proapoptotycznym białku Bak z grupy II, jako odcinek złożony z 16 reszt aminokwasowych, który jest konieczny do utworzenia heterodimeru z antyapoptotycznymi białkami z rodziny Bcl-2 [11,57]. Heterodimeryzacja zachodzi poprzez wprowadzenie domeny BH3 w hydrofobową kieszeń złożoną z domen BH1, BH2 i BH3 antyapoptotycznego białka Bcl-x_L, czemu towarzyszą interakcje hydrofobowe i elektrostatyczne [57]. Mutacje zakłócające te interakcje znoszą zarówno zdolność do tworzenia heterodimerów, jak i zdolność do promowania śmierci. Na uwagę zasługuje hierarchiczność interakcji między członkami rodziny Bcl-2. Tak na przykład Bad z grupy III tworzy bardzo mocne heterodimery i może wypierać Bax z kompleksów z Bcl-x_L. Powinowactwo z jakim wiąże się białka mające domenę BH3 z Bcl-x_L odpowiada tej hierarchiczności [30,57].

Streszczając: proapoptotyczne białka grupy II mające domeny od BH1 do BH3 z jednej strony mogą dzięki domenom BH1 i BH2 wpływać na integralność błon mitochondrialnych i ewentualnie wywoływać uwalnianie cytochromu c, a z drugiej poprzez domenę BH3 wchodzić w interakcje z białkami antyapoptotycznymi i zaburzać ich czynność. Komórki z niedoborem pary proapoptotycznych białek Bax i Bak są całkowicie odporne na wszystkie testowane bodźce, działające na mitochondrialny szlak apoptozy [41,76].

Należy jeszcze dodać, że Bak (ale nie Bax) może tworzyć kompleks z białkiem VDAC 2, co zapobiega jego aktywności proapoptotycznej i hamuje mitochondrialny szlak apoptozy. Natomiast białka z grupy III mające „tylko BH3”, takie jak tBid, Bim lub Bad wypierają VDAC2 z połączenia z Bak, co umożliwia homooligomeryzację Bak i apoptozę. Zdaniem Chenga i wsp. [9] ta fizyczna interakcja między VDAC2 a Bak wskazuje na związki między fizjologią mitochondrium, a szlakiem apoptozy.

PROAPOPTOTYCZNE BIAŁKA GRUPY III

Białka grupy III mają „tylko domenę BH3”, która jest uważana za wielopotencjalny ligand śmierci, za czym przemawia to, że liczne proapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2 poza tą domeną nie wykazują prawie żadnych innych ho-

mologii. Białka tej grupy działają w górnej części szlaku apoptotycznego. Odpowiadają na wybrane sygnały śmierci i następnie aktywują wielodomenowe efekторы śmierci Bax i Bak, które stanowią bramę do wewnętrznego mitochondrialnego szlaku apoptozy. Pierwszym odkrytym białkiem z grupy białek mających „tylko BH3” było białko Bad [79]. Ze względu na brak C-końcowej transbłonowej sekwencji zakotwiczonej Bad zwykle znajduje się w cytosolu, ale może zostać związany z błoną wewnątrzkomórkową po utworzeniu kompleksu z Bcl-2 lub z Bcl-x_L. Sam Bad nie jest zdolny do działania proapoptotycznego, jeśli nie utworzy heterodimeru z białkiem antyapoptotycznym [30]. Jest interesującym, że Bad, który wypiera Bax z kompleksów z białkami antyapoptotycznymi – jak się wydaje – może również wypierać inne białko z grupy III – Bid. Istnieją dane wskazujące, że domeny BH3 krótkich peptydów „Bad-podobne” („Bad-like”) zajmując antyapoptotyczną kieszeń działają jako domeny „uczulające” („sensitizing” domains) i mogą wypierać „Bid-podobne” domeny „aktywujące” („activating” domains), które wywołują oligomeryzację i aktywację Bax, Bak. Małe cząsteczki lub mimetyki peptydów, które naśladują domeny BH3 stanowią prototyp ingerencji terapeutycznej w proces apoptozy [15]. Lokalizacja Bad w strukturach subkomórkowych jest regulowana przez kinazy i fosfatazy. Tylko białko Bad, które nie uległo fosforylacji jest zdolne do interakcji z Bcl-2 lub z Bcl-x_L i przeciwdziałaniu ich antyapoptotycznej czynności na zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Bad jest fosforylowany albo przez kinazę serynowo-treoninową Akt/PKB/RAC (fosforylacji ulega Ser 136) [16], albo przez zakotwiczoną w mitochondrium kinazę A zależną od cAMP (fosforylacji ulega Ser 112) [19]. Związana z błoną zewnętrzną kinaza białkowa Raf-1 także stymuluje fosforylację i inaktywację Bad. Ufosforylowany Bad nie tworzy heterodimerów z Bcl-x_L i zostaje ponownie przemieszczony do cytosolu, gdzie ulega sekwestracji przez wiążące serynę białko 14-3-3. Natomiast kalcyneuryna – fosfataza reagująca na wapń defosforyluje Bad i przywraca mu zdolność do wiązania antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2, a także wywołuje przepuszczalność błony mitochondrialnej [73].

Nieoczekiwanie wykryto, że Bad odgrywa rolę w integracji szlaku metabolizmu glukozy i szlaku apoptozy [14]. Na powierzchni mitochondriów komórek wątrobowych znajduje się wielocząsteczkowy kompleks, w skład którego oprócz Bad wchodzi: glukokinaza (heksokinaza IV), kinaza białkowa A (protein kinase A – PKA) katalityczna jednostka fosfatazy białkowej 1α (protein phosphatase 1α, PP1α) oraz białko zakotwiczone kinazę A z rodziny białek zespołu Wiskotta-Aldricha (A-kinase anchoring protein – WAVE-1). Bad jest konieczny do utworzenia kompleksu. Myszy *Bad*-null są pozbawione tego kompleksu, wskutek czego dochodzi do znacznego obniżenia aktywności mitochondrialnej glukokinazy i oddychania mitochondrialnego w odpowiedzi na glukozę. Zubożenie w glukozę prowadzi do defosforylacji Bad i śmierci komórki zależnej od Bad. Natomiast fosforylacja Bad ułatwia regulację aktywności glukokinazy. Myszy z niedoborem Bad, lub myszy z nieufosforylowanym mutantem Bad (3SA) mają cu-krzycowy fenotyp.

Białko Bid z grupy III podobnie jak Bad, nie ma w C-końcu transbłonowej sekwencji zakotwiczonej, wsku-

tek czego występuje głównie w cytosolu. Białko to stanowi istotny element łączący zewnętrzny–receptorowy szlak apoptozy, ze szlakiem wewnętrznym – mitochondrialnym. Cytosolowy Bid jest rozszczepiany przez kaspazę 8/10, szczytową kaspazę w kaskadzie kaspaz, która ulega aktywacji po związaniu z odpowiednim ligandem jednego z receptorów śmierci z rodziny czynnika martwicy nowotworu (tumor necrosis factor family). Białko p22 Bid jest rozszczepiane po reszcie kwasu asparaginowego (Asp 59) [66], tak że pozostaje tylko fragment C-końcowy (p15.5 kDa). W następstwie skrócenia Bid, zostaje wyeksponowana glicyna w pętli, która ulega mirystylacji przy N-końcu (N-myristoylated), co ukierunkowuje kompleks p7/myr-p15Bid na mitochondrium. Niezmieniona domena BH3 Bid wywołuje oligomeryzację Bak lub Bax [19,76]. Hepatocyty myszy z niedoborem Bid są odporne na apoptozę indukowaną przez przeciwciała skierowane przeciw CD95, co wskazuje na wpływ receptorowego szlaku sygnalizacyjnego CD95/kaspaza 8 na szlak mitochondrialny przynajmniej w niektórych tkankach [80]. Peptyd t-Bid zostaje przemieszczony z cytosolu na błonę mitochondrialną. Główną rolę w przyciągnięciu t-Bid na błonę mitochondrialną odgrywa swoisty dla mitochondrium lipid – kardiolipina [42,43]. Kardiolipina występuje głównie w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, a także w miejscach styku między błonami wewnętrzną i zewnętrzną (17–20%) [4,64]. W zewnętrznej błonie mitochondrialnej stężenie kardiolipiny jest znacznie mniejsze (0,3–4%) [4,17,64]. Dzięki interakcji z t-Bid, Bax tworzy oligomery i ostatecznie indukuje przepuszczalność błony mitochondrialnej [20,75]. Zdaniem Newmeyera i wsp. [37] obecność kardiolipiny w mitochondrium jest konieczna do wystąpienia przepuszczalności mediowanej przez t-Bid/Bax. Oba te białka nie są zdolne do wywołania przepuszczalności na przykład błon siateczki endoplazmatycznej, które są pozbawione kardiolipiny. Wydaje się, że t-Bid/Bax powodują w liposomach zawierających kardiolipinę tworzenie kanałów [37], które odpowiadają apoptotycznej przepuszczalności błony mitochondrialnej.

Niektóre badania wskazują, że sam t-Bid (przy braku innych białek) może wywoływać przeciekanie planarnych błon lipidowych i liposomów [36,58,82], oraz że powoduje perforację błon mitochondrialnych w miejscach styku między błoną wewnętrzną i zewnętrzną [43]. Co więcej Grinberg i wsp. [24] wykazali, że sam t-Bid tworzy kompleksy homooligomerów (45 kDa) w mitochondriach żywych komórek wskutek czego może dochodzić do uwalniania cytochromu c, bez udziału Bax. Jedną z teorii zakłada, że tBid wywołuje przemodelowanie struktury wewnętrznej błony mitochondrialnej [60,72]. Podczas tego procesu pojedyncze grzebienie ulegają fuzji i zostają otwarte połączenia między grzebieniami a przestrzenią międzybłonową, co mobilizuje zapasy cytochromu c. Należy wyjaśnić, że w przestrzeni międzybłonowej znajduje się zaledwie 15–20% całkowitego cytochromu c, a główny jego zapas jest zgromadzony w wewnętrznej błonie mitochondrialnej w tzw. grzebieniach rurkowatych (tubular cristae), oddzielonych od przestrzeni międzybłonowej przez połączenia grzebieniowe (cristae junction). Interesujące jest to, że reorganizacji wewnętrznej błony mitochondrialnej nie towarzyszy obrzęk mitochondrium, ale proces ten wiąże się z przejściowym otwarciem PTP. Rostovtseva i wsp. [52] podali, że t-Bid wywołuje zamknięcie kanału VDAC, co

upośledza wymianę metabolitów między mitochondrium a cytosolem z następującą utratą ciągłości zewnętrznej błony mitochondrialnej.

Zamzami i Kroemer [81] w rozwoju przepuszczalności błony mitochondrialnej wyróżniają dwa etapy:

- w etapie pierwszym Bax po interakcji z t-Bid zostaje wprowadzony w błonę mitochondrialną i wywołuje jej przepuszczalność;
- w etapie drugim zachodzą fizyczne i czynnościowe interakcje między proapoptotycznymi białkami Bax/Bid a białkami tworzącymi kompleks PTP, które prowadzą do apoptotycznej przepuszczalności błony mitochondrialnej.

Ponadto Bid ma jeszcze zdolność do tworzenia heterodimerów z Bcl-2 i z Bcl-x_L i na tej drodze zaburza ich antyapoptotyczne właściwości. Tak więc Bid w wieloraki sposób uczestniczy w mitochondrialnym szlaku apoptozy.

Oprócz Bad i Bid inne proapoptotyczne białka z grupy III mają w swoim C-końcu transbłonową sekwencję zakotwiczącą, dzięki której mogą być zamocowywane w błonach wewnątrzkomórkowych, niezależnie od tworzenia kompleksów z Bcl-2 i innymi białkami antyapoptotycznymi. Jedno z białek z tej grupy – Bik ma zdolność tworzenia kompleksów z antyapoptotycznymi białkami wirusów, takimi jak białko BIB 19K adenowirusa i białko BHRF wirusa Epsteina-Barr. Wydaje się, że Bik jest właśnie celem działania tych wirusowych białek w czasie zakażenia [7]. Dwa inne białka mające „tylko BH3” i transbłonową sekwencję zakotwiczącą Bim i Hrk występują głównie w komórkach limfoidalnych [29,49]. W warunkach prawidłowych Bim ulega sekwestracji w mikrotubulach dzięki interakcji z łańcuchem lekkim motorycznego białka dyneiny, jednakże po sygnale apoptotycznym ulega translokacji w błony mitochondrialne [51]. Należy jeszcze wspomnieć o interakcji między Bim a Mcl-1. Mcl-1 należy do stosunkowo rzadkich cytosolowych krótko żyjących białek antyapoptotycznych aktywnych we wczesnym okresie mitochondrialnego szlaku apoptotycznego i przeciwdziała wpływom Bim na Bax, Bak, chociaż nie działa na Bad [50]. Degradacja Mcl-1 jest konieczna do zapoczątkowania uwalniania cytochromu c podczas genotoksycznego uszkodzenia komórek HeLa [48].

Na rodzinę białek Bcl-2 oddziałują także kaspazy 1 i 3, które rozkładają odpowiednio Bcl-x_L i Bcl-2 (oba białka zwyczajowo uważane za antyapoptotyczne) [34]. Ponadto kinaza białkowa aktywowana stresem (stress-activated protein kinase – SAPK), zwana także kinazą fosforylującą N-końiec białka JUN (c-Jun amino-terminal kinase – JNK) w odpowiedzi na czynniki genotoksyczne zostaje przemieszczona do mitochondrium i fosforyluje Bcl-x_L, co przyspieszalnie prowadzi do jego aktywacji [32]. Z innych białek, które podczas apoptozy ulegają przemieszczeniu do mitochondrium należy wymienić p53, izoformę δ kinazy białkowej c (PKC δ) i histon H1.2 [6]. Białko p53 ma zdolność do angażowania białek z rodziny Bcl-2 w regulację uwalniania cytochromu c [10]. Nieoczekiwanie wykazano, że histon H1.2 uczestniczy w mitochondrialnym szlaku apoptozy [33]. Histon H1.2 jest uwalniany do cytosolu w sposób zależny od p53 po przerwaniu podwójnej nici DNA. Histon ten przemieszcza się do mitochon-

drium, i pomimo że nie zawiera oczywistej domeny BH3 następuje oligomeryzacja Bak i uwalnianie cytochromu c. Powyższe obserwacje sugerują, że histon H1.2 działa jako pośredni czynnik sygnalizacyjny, który przekazuje odczytane w chromatynie zmiany do maszynarii apoptotycznej mitochondrium. Wszystkie te przykłady wskazują jak róż-

ne cząsteczki przenoszące sygnały (p53, histon H1.2, fosfatazy, kinazy, kaspazy) mogą wpływać na przemieszczanie białek z rodziny Bcl-2 w strukturach subkomórkowych i na ich czynność oraz jak złożone mechanizmy wpływają na przepuszczalność błon mitochondrialnych i pośrednio na apoptozę.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Anfous K., Armstrong D.D., Craigen W.J.: Altered mitochondrial sensitivity for ADP and maintenance of creatine-stimulated respiration in oxidative striated muscles from VADC 1-deficient mice. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 1954–1960
- [2] Antonsson B., Conti F., Ciavatta A., Montessuit S., Levis S., Martinou I., Bernasconi L., Bernard A., Mermod J.-J., Mazzei G., Maundrell K., Gamble F., Sadoul R., Martinou J.-C.: Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*, 1997; 277: 370–372
- [3] Antonsson B., Montessuit S., Lauper S., Eskes R., Martinou J.-C.: Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J.*, 2000; 345: 271–278
- [4] Ardail D., Privat J.-P., Egret-Charlier M., Levrat C., Lerme F., Louisot P.: Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J. Biol. Chem.*, 1990; 265: 18797–18802
- [5] Bernardi P., Scorrano L., Colonna R., Petronilli V., Di Lisa F.: Mitochondria and cell death – Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur. J. Biochem.*, 1999; 264: 687–701
- [6] Brenner C., Kroemer G.: Apoptosis. Mitochondria – the death signal integrators. *Science*, 2000; 289: 1150–1151
- [7] 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.: 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*, 1995; 11: 1921–1928
- [8] Chen G., Cizeau J., Velde Ch.V., Park J.H., Bozek G., Bolton J., Ski L., Dubik D., Greenberg A.: Nix and Nip 3 form a subfamily pro-apoptotic mitochondrial proteins. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 7–10
- [9] Cheng E.H.-Y., Sheiko T.V., Fisher J.K., Craigen W.J., Korsmeyer S.J.: VDACC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science*, 2003; 301: 513–517
- [10] Chipuk J.E., Kuwana T., Bouchier-Hayes L., Droin N.M., Newmeyer D.D., Schuler M., Green D.R.: Direct activation of BAX by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, 2004; 303: 1010–1014
- [11] Chittenden T., Flemington C., Houghton A.B., Ebb R.G., Gallo G.J., Elangovan B., Chiannadurai G., Lutz R.J.: A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J.*, 1995; 14: 5589–5596
- [12] Colombini M.: Anion channel in the mitochondrial outer membrane. *Curr. Top. Membr.*, 1994; 42: 73–101
- [13] Crompton M.: The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.*, 1999; 341: 233–249
- [14] Danial N.N., Gramm C.F., Scorrano L., Zhang C.-Y., Krauss S., Ranger A.M., Datta S.R., Greenberg M.E., Licklider L.J., Lowell B.B., Gygl S.P., Korsmeyer S.J.: BAD and glukokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature*, 2003; 424: 952–956
- [15] Danial N.N., Korsmeyer S.J.: Cell death: critical control points. *Cell*, 2004; 116: 205–219
- [16] Datta S.R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., Greenberg M.E.: Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 1997; 91: 231–241
- [17] De Kroon A.I.P.M., Dolis D., Mayer A., Lill R., De Kruijf B.: Phospholipid composition of highly purified mitochondrial outer membranes of rat liver and *Neurospora crassa*. Is cardiolipin present in the mitochondrial outer membrane? *Biochim. Biophys. Acta*, 1997; 1325: 108–116
- [18] Desagher S., Martinou J.-C.: Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.*, 2000; 10: 369–377
- [19] Desagher S., Osen-Sand A., Nichols A., Eskes R., Montessuit S., Lauper S., Maundrell K., Antonsson B., Martinou J.-C.: Bid – induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J. Cell Biol.*, 1999; 144: 891–901
- [20] Eskes R., Desagher S., Antonsson B., Martinou J.-C.: Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell Biol.*, 2000; 20: 929–935
- [21] Fannjiang Y., Kim C.H., Hagan R.L., Zou S., Lindsten T., Thompson C.B., Mito T., Traystman R.J., Larsen T., Griffin D.E.: BAK alters neuronal excitability and can switch from anti- to pro-death function during postnatal development. *Dev. Cell*, 2003; 4: 575–585
- [22] Green D.R., Reed J.C.: Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998; 281: 1309–1312
- [23] Griffiths G.J., Dubrez L., Morgan C.P., Jones N.A., Whitehouse J., Corfe B.M., Dive C., Hickman J.A.: Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak *in vivo* precede the onset of apoptosis. *J. Cell Biol.*, 1999; 144: 903–914
- [24] Grinberg M., Sarig R., Zaltsman Y., Frumkin D., Grammatikakis N., Reuveny E., Gross A.: tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 12237–12245
- [25] Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J.: Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, 1999; 13: 1899–1911
- [26] Grzelakowska-Sztabert B.: Apoptoza i nowotwory. *Post. Biol. Kom.*, 2000; 27(Suppl.15): 9–43
- [27] Hames B.D., Hooper N.M.: Transport elektronów i fosforylacja oksydacyjna. W: *Biochemia (Krótkie Wykłady)*. Wyd: PWN, Warszawa, 2002; 394–407
- [28] Harada H., Becknell B., Wilm M., Mann M., Huang L.J., Taylor S.S., Scott J.D., Korsmeyer S.J.: Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol. Cell*, 1999; 3: 413–422
- [29] Inohara N., Ding L., Chen S., Nunez G.: Harakiri a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-xL. *EMBO J.*, 1997; 16: 1686–1694
- [30] Kelekar A., Chang B.S., Harlan J.E., Fesik S.W., Thompson C.B.: Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-xL. *Mol. Cell Biol.*, 1997; 17: 7040–7046
- [31] Kelekar A., Thompson C.B.: Bcl-2 family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol.*, 1998; 8: 324–330
- [32] Kharbanda S., Saxena S., Yoshida K., Pandey P., Kaneki M., Wang Q., Cheng K., Chen Y.N., Cambell A., Sudha T., Yuan Z.M., Narula J., Weichselbaum R., Nalin C., Kufe D.: Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-xL in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* 2000, 275,322-327 Erratum in: *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 19433
- [33] Konishi A., Shimizu S., Hirota J., Takao T., Fan Y., Matsuoka Y., Zhang L., Yoneda Y., Fujii Y., Skoultchi A.I., Tsujimoto Y.: Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strands breaks. *Cell*, 2003; 114: 673–688
- [34] Krisch D.G., Doseff A., Chau B.N., Lim D.S., de Souza-Pinto N.C., Hansford R., Kastan M.B., Lazebnik Y.A., Hardwick J.M.: Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 21155–21161
- [35] Kroemer G., Dallaporta B., Resche-Rigon M.: The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.*, 1998; 60: 619–642
- [36] Kudla G., Montessuit S., Eskes R., Berrier C., Martinou J.-C., Ghazi A., Antonsson B.: The destabilization of lipids membranes induced by the C-terminal fragment of caspase-8-cleaved bid is inhibited by the N-terminal fragment. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 22713–22718
- [37] Kuwana T., Mackey M.R., Perkins G.A., Ellisman M.H., Latterich M., Schneider R., Green D.R., Newmeyer D.D.: Bid, Bad and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, 2002; 111: 1–12
- [38] Kwong J., Choi H.L., Huang Y., Chan F.L.: Ultrastructural and biochemical observations on the early changes in apoptotic epithelial cells of the rat prostate induced by castration. *Cell Tissue Res.*, 1999; 298: 123–136

- [39] Li H., Kolluri S.K., Gu J., Dawson M.J., Cao X., Hobbs P.D., Lin B., Chen G., Lu J., Lin F.: Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science*, 2000; 289: 1159–1164
- [40] Lin B., Kolluri S.K., Lin F., Liu W., Han Y.-H., Cao X., Dawson M.J., Reed J.C., Zhang X.-k.: Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell*, 2004; 116: 527–540
- [41] Lindsten T., Ross A.J., King A., Zong W.X., Rathmell J.C., Shiels H.A., Ulrich E., Waymire K.G., Mahar P., Frauwirth K.: The combined functions of pro-apoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol. Cell*, 2000; 6: 1389–1399
- [42] Lutter M., Fang M., Luo X., Nishijima M., Xie X.S., Wang X.: Cardiolipin provides specificity for targeting tBid to mitochondria. *Nat. Cell Biol.*, 2000; 2: 754–756
- [43] Lutter M., Perkins G.A., Wang X.: The pro-apoptotic Bcl-2 family member tBid localizes to mitochondrial contact sites. *BMC Cell Biol.*, 2001; 2: 22
- [44] Mannella C.A., Guo X.-W., Cognon B.: Diameter of the mitochondrial outer membrane channel: Evidence from electron microscopy of frozen-hydrated membrane crystals. *FEBS Lett.*, 1989; 253: 231–234
- [45] Martinou J.-C., Green D.R.: Breaking the mitochondrial barrier. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2001; 2: 63–67
- [46] Marzo J., Brenner C., Zamzami N., Jürgensmeier J.M., Sasin S.A., Vieira H.L., Prevost M.C., Xie Z., Matsuyama S., Reed J.C., Kroemer G.: Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*, 1998; 281: 2027–2031
- [47] Muchmore S.W., Sattler M., Liang H., Meadows R.P., Harlan J.E., Yoon H.S., Nettlesheim D., Chang B.S., Thompson C.B., Wong S.L., Ng S.L., Fesik S.W.: X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*, 1996; 381: 335–341
- [48] Nijhawan D., Fang M., Traer E., Zhong Q., Gao W., Du F., Wang X.: Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev.*, 2003; 17: 1475–1486
- [49] O'Connor L., Strasser A., O'Reilly L.A., Hausmann G., Adams J.M., Cory S., Huang D.C.: Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.*, 1998; 17: 384–395
- [50] Opferman J.T., Letai A., Beard C., Sorcinelli M.D., Ong C.C., Korsmeyer S.J.: Development and maintenance of B and T lymphocytes requires anti-apoptotic MCL-1. *Nature*, 2003; 426: 671–676
- [51] Puthalakath H., Huang D.C., O'Reilly L.A., King S.M., Strasser A.: The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with dynein motor complex. *Mol. Cell*, 1999; 3: 287–296
- [52] Rostovtseva T.K., Antonsson B., Suzuki M., Youle R.J., Colombini M., Bezrukov S.M.: Bid, but not Bax, regulates VDAC channels. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 13575–13583
- [53] Rostovtseva T., Colombini M.: ATP flux is controlled by a voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 28006–28008
- [54] Rostovtseva T., Colombini M.: VDAC channels mediate and gate the flow of ATP: implications for the regulation of mitochondrial function. *Biophys. J.*, 1997; 72: 1954–1962
- [55] Rostovtseva T.K., Komarov A., Bezrukov S.M., Colombini M.: VDAC channels differentiate between natural metabolites and synthetic molecules. *J. Membr. Biol.*, 2002; 187: 147–156
- [56] Sampson M.J., Decker W.K., Beaudet A.L., Ruitenbeek W., Armstrong D., Hicks M.J., Craigen W.J.: Immotile sperm and infertility in mice lacking mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 39206–39212
- [57] Sattler M., Liang H., Nettlesheim D., Meadows R.P., Harlan J.E., Eberstadt M., Yoon H.S., Shuker S.B., Chang B.S., Minn A.J., Thompson C.B., Fesik S.W.: Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, 1997; 275: 983–986
- [58] Schendel S.L., Azimov R., Pawlowski K., Godzik A., Kagan B.L., Reed J.C.: Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 21932–21936
- [59] Schlesinger P.H., Gross A., Yin X.M., Yamamoto K., Saito M., Waksman G., Korsmeyer S.J.: Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 11357–11362
- [60] Scorrano L., Ashija M., Buttler K., Weiler S., Oakes S.A., Mannella C.A., Korsmeyer S.J.: A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev. Cell*, 2002; 2: 55–67
- [61] Shimizu S., Ide T., Yanagida T., Tsujimoto Y.: Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 12321–12325
- [62] Shimizu S., Konishi A., Kodama T., Tsujimoto Y.: BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 3100–3105
- [63] Shimizu S., Narita M., Tsujimoto Y.: Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, 1999; 399: 483–487
- [64] Simbeni R., Pon L., Zinser E., Paltauf F., Daum G.: Mitochondrial membrane contact sites of yeast. Characterization of lipid components and possible involvement in intramitochondrial translocation of phospholipids. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266: 10047–10049
- [65] Siskind L.J., Colombini M.: The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 38640–38644
- [66] Stoka V., Turk B., Schendel L.S., Kim H.T., Crimant T., Snipas J.S., Ellerby M.L., Bredezen D., Freeze H., Abrahamson M., Brömme D., Krajewski S., Reed C.J., Yin M.X., Turk V., Salvesen S.G.: Lysosomal protease pathways to apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 3149–3157
- [67] Subramanian T., Chinnadurai G.: Pro-apoptotic activity of transiently expressed BCL-2 occurs independent of BAX and BAK. *J. Cell. Biochem.*, 2003; 89: 1102–1114
- [68] Suzuki M., Youle R.J., Tjandra N.: Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*, 2000; 103: 645–654
- [69] Tsujimoto Y., Shimizu S.: Bcl-2 family: Life-or-death switch. *FEBS Letters*, 2000; 466: 6–10
- [70] Vander Heiden M.G., Li X.X., Gottlieb E., Hill R.B., Thompson C.B., Colombini M.: Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 19414–19419
- [71] Vander Heiden M.G., Thompson C.B.: Bcl-2 proteins: Inhibitors of apoptosis or regulators of mitochondrial homeostasis? *Nature Cell Biol.*, 1999; 1: E209–E216
- [72] Von Ahnen O., Renken C., Perkins G., Kluck R.M., Bossy-Wetzel E., Newmeyer D.D.: Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax- mediated cytochrome c release. *J. Cell Biol.*, 2000; 150: 1027–1036
- [73] Wang H.G., Pathan N., Ethell I.M., Krajewski S., Yamaguchi Y., Shibasaki F., Mc Keon F., Bobo T., Franke T.F., Reed J.C.: Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of Bad. *Science*, 1999; 284: 339–343
- [74] Weeber E.J., Levy M., Sampson M.J., Anfloas K., Armstrong D.L., Brown S.E., Sweatt J.D., Craigen W.J.: The role of mitochondrial porins and the permeability transition pore in learning and synaptic plasticity. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 18891–18897
- [75] Wei M.C., Lindsten T., Mootha V.K., Weiler S., Gross A., Ashiya M., Thompson C.B., Korsmeyer S.J.: tBID a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.*, 2000; 14: 2061–2071
- [76] Wei M.C., Zong W.X., Cheng E.H., Lindsten T., Panoutsakopoulou V., Ross A.J., Roth K.A., Mac Gregor G.R., Thompson C.B., Korsmeyer S.J.: Pro-apoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 2001; 292: 727–730
- [77] Wu S., Sampson M.J., Decker W.K., Craigen W.J.: Each mammalian mitochondrial outer membrane porin protein is dispensable: effects on cellular respiration. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1452: 68–78
- [78] Xu X., Decker W., Sampson M.J., Craigen W.J.: Mice lacking VDAC isoforms expressed in yeast: channel properties and their roles in mitochondrial outer membrane permeability. *J. Membr. Biol.*, 1999; 170: 89–102
- [79] Yang E., Zha J., Jockel J., Boise L.H., Thompson C.B., Korsmeyer S.J.: Bad a heterodimeric partner for Bcl-xL and Bcl-2 displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, 1995; 80: 285–291
- [80] Yin X.-M., Wang K., Gross A., Zhao Y., Zinkel S., Klocke B., Roth K.A., Korsmeyer S.J.: Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*, 1999; 400: 886–891
- [81] Zamzami N., Kroemer G.: Apoptosis: Mitochondrial membrane permeabilization – the (w)hole story? *Curr. Biol.*, 2003; 13: R71–R73
- [82] Zhai D., Huang X., Han X., Yang F.: Characterization of tBid-induced cytochrome c release from mitochondria and liposomes. *FEBS Lett.*, 2000; 472: 293–296