

Received: 2006.05.08  
Accepted: 2006.07.27  
Published: 2006.08.21

## Mitochondrium a śmierć komórki

### Mitochondria and cell death

**Karolina Łabędzka, Alina Grzanka, Magdalena Izdebska**

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK w Toruniu

#### Streszczenie

W komórkach żywych apoptoza jest realizowana za pośrednictwem wielu różnych szlaków. Programowana śmierć komórki może przebiegać z udziałem receptorów błonowych, mitochondrium, granzymu B lub też retikulum endoplazmatycznego. Szlak mitochondrialny jest inicjowany z wnętrza komórki poprzez zmiany potencjału mitochondrialnego, mutacje DNA i inne zaburzenia metabolizmu komórkowego. Niekiedy szlak ten łączy się ze ścieżką receptorową generowaną ze środowiska zewnętrznego. Głównym organellum inicjującym przebieg wewnętrznego szlaku apoptozy jest mitochondrium. Zmiany przepuszczalności błony tego organellum powodują wypływ cytochromu c, który oddziałując z cytoplazmatycznym czynnikiem Apaf-1 i prokaspazą 9, w obecności ATP, uruchamia kaskadę kaspaz wykonawczych. Oprócz cytochromu c z mitochondrium może być uwalniane ponad 40 cząstek regulatorowych lub wykonawczych apoptozy, m.in. Smac/DIABLO, Omi/HTR A2, endonukleaza G, AIF oraz IAP. Czynności regulatorowe spełniają również umiejscowione w cytoplazmie proteiny należące do rodziny Bcl-2, wpływające na przepuszczalność błony mitochondrium oraz białka szoku cieplnego (HSP), regulujące działanie kaspaz. Zjawisko programowanej śmierci jest tematem badawczym wielu naukowców, gdyż nie do końca poznano wszystkie mechanizmy i zależności zaangażowane w jego przebieg.

**Słowa kluczowe:** apoptoza • mitochondrium • rodzina białek Bcl-2 • białka IAP • białka szoku cieplnego (HSPs)

#### Summary

In living cells, apoptosis is effected through many different pathways. Programmed cell death (PCD) may proceed with the involvement of membrane receptors, mitochondria, granzyme B, or the endoplasmic reticulum. The mitochondrial pathway is initiated from within the cell as a consequence of changes in reductive potential. It may also be caused by DNA mutation or various disturbances in the cell's metabolism. In some cases, the intrinsic pathway is connected with the extrinsic one, generated by the cell's environment. The central organelle which initiates the intrinsic pathway is the mitochondrion. Changes in the permeability of the mitochondrial outer membrane cause an outflow of cytochrom c, which interacts with cytoplasmic factor Apaf-1 and procaspase 9, in the presence of ATP, and thus triggers the caspase cascade. Apart from cytochrom c, more than 40 regular or executor particles involved in apoptosis might be released from the mitochondrion. These include Smac/DIABLO, Omi/HTR A2, endonuclease G, AIF, and IAP. Moreover, regulatory functions are performed by Bcl-2 family proteins present in the cytoplasm that affect mitochondrial membrane permeability and by heat shock proteins (HSPs), both of these regulating caspase function. The phenomenon of programmed cell death is the main subject of research for many groups of scientists. There are still many aspects which need to be elucidated.

**Key words:** apoptosis • mitochondrion • Bcl-2 protein family • IAP proteins • heat shock proteins (HSPs)

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_60/9597.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9597.pdf)**Word count:** 3225**Tables:** 1**Figures:** 2**References:** 61**Adres autorki:** mgr Magdalena Izdebska, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK w Toruniu, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz; e-mail: mizdebska@cm.umk.pl

## 1. WSTĘP

Warunkiem istnienia i funkcjonowania organizmów wielokomórkowych jest utrzymywanie precyzyjnej kontroli liczby komórek aktywnych biologicznie. Jest to zapewnione dzięki zachowaniu równowagi między czterema procesami: podziałem, różnicowaniem, dojrzewaniem i śmiercią komórek [4]. Ostatni z wymienionych procesów może zachodzić za pośrednictwem apoptozy bądź nekrozy. Nekroza (martwica) komórek inicjowana jest głównie czynnikami zewnętrznymi, których natężenie i czas działania przekracza granice odporności komórek. Martwicę mogą powodować wysoka i niska temperatura, działanie toksyn bakteryjnych, a także silne promieniowanie  $\gamma$  i UV. Czynniki te uszkadzają komórkę w sposób mechaniczny, powodując zachwianie równowagi osmotycznej, czego konsekwencją jest bierny transport jonów do wnętrza komórki, zahamowanie syntezy ATP oraz napływ wody i obrzęk organelli. Cała komórka ulega rozpadowi, a wydostanie się jej zawartości do przestrzeni pozakomórkowej powoduje najczęściej proces zapalny. Apoptoza, nazywana inaczej programowaną śmiercią, jest ściśle regulowana i kontrolowana przez swoiste procesy biochemiczne, wymagające ekspresji wielu różnych genów [21,27,49]. Podczas procesu apoptozy dochodzi do kondensacji chromatyny i jej umiejscowienia tuż pod błoną jądrową. Następnym etapem jest obkurczanie całego jądra komórkowego i jego fragmentacja. Kondensacji ulega również cytoplazma, a morfologicznym wyrazem zaburzeń symetrii błony komórkowej jest tworzenie charakterystycznych pęcherzyków (blebbing), z których powstają ciała apoptotyczne. Struktury te są fragmentami komórki otoczonej błoną komórkową, zawierającymi resztki chromatyny i cytoplazmy oraz organella komórkowe. Ostatnim etapem programowanej śmierci jest fagocytoza ciałek apoptotycznych przez makrofagi lub komórki sąsiadujące [49].

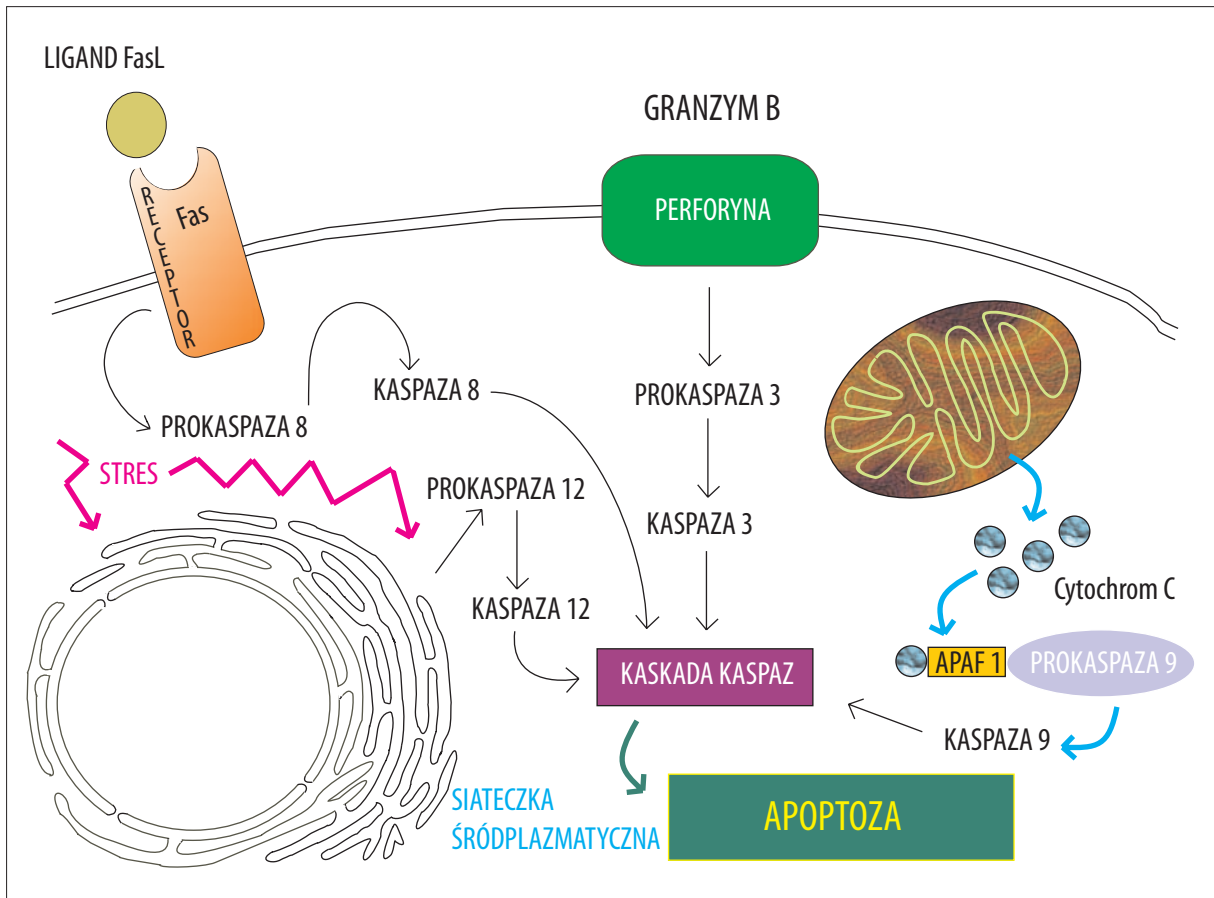
Apoptoza może przebiegać z udziałem trzech różnych ścieżek. Najbardziej znany podział uwzględnia szlak zewnętrzny (extrinsic), inaczej zwany receptorowym, wewnętrzny (intrinsic) – mitochondrialny oraz angażujący perforyny i granzym B, tzw. pseudoreceptorowy [7,8,31]. W 2000 roku pojawiły się doniesienia na temat czwartej ścieżki inicjacji i przebiegu apoptozy z przeważającym udziałem siateczki wewnątrzplazmatycznej, jako centrum regulacji śmierci komórkowej [33,56] (ryc. 1). Niezależnie od tego w jaki sposób jest inicjowany proces apoptozy, zawsze uczestniczą w nim enzymy z grupy kaspaz. Ze względu na etap apoptozy, w którym biorą udział dzielimy je na kaspazy indukujące (np. 8 i 9) oraz wykonawcze, inaczej zwane efektorowymi (np. 3, 6 i 7) [23,46]. Są one syntetyzowane i magazynowane w postaci nieaktywnych zymogenów, a do ich aktywacji dochodzi dopiero w chwili ini-

cji procesu programowanej śmierci. Aktywność kaspaz wykonawczych jest wskaźnikiem apoptozy w komórkach i podlega regulacji za pośrednictwem różnych czynników pro- i antyapoptotycznych [23,25,46].

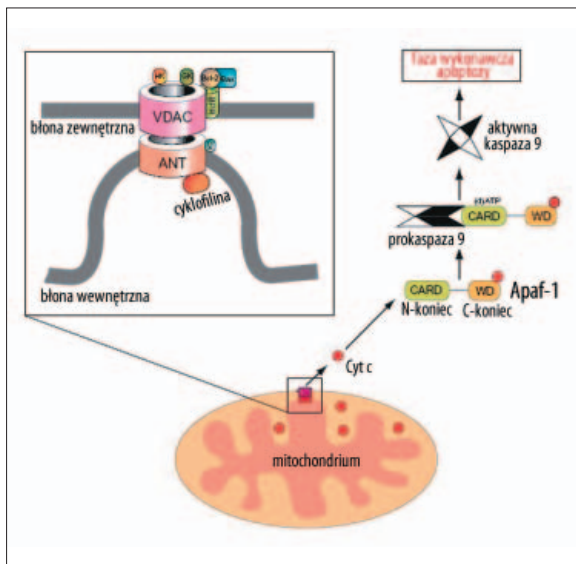
## 2. WEWNĘTRZNY SZLAK APOPTOZY

Szlak wewnętrzny programowanej śmierci komórek przebiega za pośrednictwem mitochondrium. Organella ta pełni główną rolę w prawidłowym przebiegu apoptozy wielu typów komórek. Do aktywacji tego szlaku dochodzi w wyniku wzrostu stężenia jonów  $Ca^{2+}$  w cytoplazmie, podwyższenia poziomu reaktywnych form tlenu (ROS – reactive oxygen species), a także w wyniku stresu oksydacyjnego, zaburzeń transportu elektrolitów oraz uszkodzeń DNA [12,36]. W odpowiedzi komórki na stresogenne warunki bierze udział białko p53, będące czynnikiem transkrypcyjnym wielu innych genów zaangażowanych w szlak wewnętrzny. Z tego powodu ścieżka mitochondrialna bywa nazywana zależną od p53 [14,59]. Wymienione wyżej czynniki indukują śmierć, w wyniku której dochodzi do wielu zmian w obrębie mitochondrium oraz całej komórki. Istotną rolę w inicjowaniu tego typu apoptozy odgrywają megakanaly mitochondrialne, określane również jako PTP (permeability transition pore), zlokalizowane w miejscu zetknięcia obu błon mitochondrialnych. Głównym elementem struktury megakanalu jest translokaza nukleotydów adeninowych, ANT (adenine nucleotide translocator), umiejscowiona w błonie wewnętrznej. W błonie zewnętrznej mitochondrium obecna jest poryna VDAC (voltage dependent anion channel) oraz obwodowy receptor benzodiazepiny BRP (benzodiazepine peripheral receptor), które z ANT tworzą kompleks kanału. Oprócz białek ANT, VDAC i BRP w skład kompleksu megakanalu mogą wchodzić enzymy o funkcjach regulatorowych. Do białek oddziałujących z poryną należą kinazy kreatynowe (CK), heksokinazy (HK) oraz kinazy glicerolowe (GK). Od strony cytosolowej z kanałem mogą wiązać się także białka z rodziny Bcl-2 np. Bcl-2 lub Bax, natomiast po stronie macierzy mitochondrialnej może przyłączyć się np. cyklofilina D [20,24] (ryc. 2).

W wyniku działania czynników inicjujących apoptozę oraz korelacji elementów megakanalu następuje jego otwarcie. W stanie dużego przewodnictwa struktura ta ma średnicę 2–3 nm i mogą przez nią przenikać cząstki o masie do 1,5 kDa. Dotychczas nie wiadomo dokładnie jak dochodzi do permeabilizacji błony mitochondrialnej. Istnieje kilka modeli tego procesu i nie ma zgodności czy przeważa jeden mechanizm czy wszystkie razem przyczyniają się do ustalenia progu przepuszczalności błony mitochondrium. Jeden z modeli zakłada przerwanie ciągłości zewnętrznej błony mitochondrium. Wcześniej dochodzi do hiperpola-



Ryc. 1. Schemat głównych szlaków apoptotycznych



Ryc. 2. Schemat szlaku mitochondrialnego apoptozy z uwzględnieniem modelu megakanalu mitochondrialnego (skrótly wyjaśniono w tekście)

ryzacji wewnętrznej błony, co w konsekwencji powoduje zwiększenie objętości matriks (tzw. puchnięcie). Powodem hiperpolaryzacji jest zamknięcie VDAC, pod wpływem białka Bax. Inni naukowcy twierdzą, że Bax oddziałuje w tym

kompleksie z ANT i wskutek tego dochodzi do otwierania PTP. Jeszcze inna koncepcja zakłada, że białka z rodziny Bcl-2, a konkretnie Bax w postaci oligomerycznej tworzą pory, umożliwiające wypływ czynników apoptotycznych [26]. Jednym z czynników uwalnianych z mitochondrium przez megakanaly jest cytochrom c (Apaf-2). Związek ten po wypłynięciu do cytoplazmy, przy nakładach energii, łączy się z białkowym czynnikiem Apaf-1 oraz prokaspazą 9. W wyniku połączenia tego trójelementowego kompleksu powstaje struktura zwana „kołem śmierci” lub częściej apoptosomem. Głównym zadaniem tego kompleksu jest aktywacja kaspaz wykonawczych [7,8,43]. Białko Apaf-1 ma na N-końcu domenę CARD (caspase recruitment domain), dzięki której możliwe jest przyłączenie prokaspazy 9. Natomiast na C-końcu umiejscowiona jest domena wielokrotnych powtórzeń WD (WD-40), umożliwiająca wiązanie cytochromu c oraz przyłączenie dATP/ATP. Białko Apaf-1 pod nieobecność cytochromu c tworzy postać globularną. N-końcowa domena CARD umiejscawia się przestrzennie pomiędzy domenami WD-40, gdzie allosterycznie hamuje aktywność Apaf-1. Cytochrom c charakteryzuje się większym powinowactwem do regionów powtórzeń WD-40 białka Apaf-1 niż domena CARD, więc wypiera ją z tego miejsca i uwalnia do cytoplazmy. Białko Apaf-1 przyjmuje wówczas strukturę litery Y. Reakcja wiązania cytochromu c jest jednak odwracalna, a długie ramię tworzonej litery Y pozostaje niestabilne do chwili, w której komórka poniesie nakład energetyczny. Dzieje się tak w chwili związania i hydrolizy cząsteczki ATP bądź dATP

do tzw. kaset Walkera (regionów wiążących nukleotydy), co ostatecznie stabilizuje strukturę kompleksu Apaf-1-cytochrom c. Następnie dochodzi do oligomeryzacji siedmiu cząstek Apaf-1 i powstaje struktura heptamerycznego koła. Do regionów CARD Apaf-1 dołączone zostają kolejno cząstki prokaspazy 9 ułożone względem siebie nierównoległe [1,2,5,44,45].

Utrata któregoś z białek budujących apoptosom przez mutacje, epigenetyczne wyłączenie kodującego go genu, modyfikacje postranskrypcyjne lub posttranslacyjne, a także zaburzenia w dynamice syntezy i rozkładu tych elementów uniemożliwiają śmierć komórek. Wówczas unikają one apoptozy nawet wtedy, gdy niosą defekty i są zagrożeniem dla całego organizmu. Brak białka efektorowego Apaf-1 był obserwowany m.in. w chorobach nowotworowych, takich jak czerniak [4,11,13,17,32,47,48,51,61], białaczka [16], chłoniak czy też rak jąder [3].

Przyczyną zmniejszenia stężenia lub całkowitej utraty białka Apaf-1 w komórkach nowotworowych jest najprawdopodobniej metylacja wysp CpG regionu promotowego, wskutek której nie dochodzi do transkrypcji genu apaf-1 [17,47,48]. Zastosowanie inhibitorów metylacji np. 5aza'2deoksycytydyny, powoduje przywrócenie wrażliwości na indukcję apoptozy promieniowaniem UV [16].

Powstały apoptosom wpływa na aktywację kaspazy 9, którą określa się kaspazą inicjującą szlak mitochondrialny. Aktywna kaspaza 9 może aktywować kaspazy wykonawcze, które uruchamiają cały łańcuch kolejnych kaspaz prowadzących do proteolizy białek, zmian morfologicznych w komórce i ostatecznie do śmierci komórki (ryc. 2).

### 3. BIAŁKA MITOCHONDRIALNE UCZESTNICZĄCE W PROCESIE APOPTOZY

Poza cytochromem c z mitochondrium podczas inicjacji apoptozy uwalnianych jest ponad 40 białek. Część z nich nie jest dokładnie zbadana i nie znamy ich roli w regulacji apoptozy [52]. AIF (apoptosis inducing factor) jest flawoproteiną proapoptotyczną i w prawidłowej komórce jest umiejscowiona w mitochondrium. W odpowiedzi na inicjację apoptozy czynnik ten jest przenoszony do jądra komórkowego. Translokacja AIF następuje najczęściej w odpowiedzi na zniszczenie DNA i aktywację polimerazy PARP (poly(ADP-ribose) polimerase 1) [60]. Nadekspresja czynnika AIF sprzyja procesom kondensacji chromatyny obwodowej w jądrze, fragmentacji DNA na odcinki długości 50 kb, translokacji fosfatydyloseryny w błonie komórkowej, jak również spadkowi potencjału błonowego mitochondrium [14,52].

Endonukleaza G jest również czynnikiem mitochondrialnym. Enzym ten odpowiada prawdopodobnie za naprawę i replikację własnego DNA tego organellum [37]. Podczas apoptozy endonukleaza G jest uwalniana z mitochondriów i przenoszona do jądra komórkowego, gdzie uczestniczy w trawieniu DNA. Według niektórych badaczy endonukleaza G trawi DNA jądrowe w odcinkach międzynukleosomalnych, dając charakterystyczny dla apoptozy obraz drabinki podczas elektroforezy [57]. Van Loo i wsp. [53] wykazała jednak zdolność endonukleazy G do trawienia DNA na większe fragmenty. Zatem można przypuszczać, że razem

z egzonukleazami i DNA-zami enzym ten prowadzi do powstawania krótkich fragmentów DNA [52].

### 4. REGULATORY SZLAKU MITOCHONDRIALNEGO APOPTOZY

#### Białka rodziny Bcl-2

Oprócz białek enzymatycznych, które biorą udział w degradacji składników budulcowych komórki w proces apoptozy są zaangażowane również liczne regulatory. Należą do nich zarówno inhibitory, jak i czynniki promujące przebieg śmierci komórki. Wpływają one najczęściej na przepuszczalność błon mitochondrialnych, działają hamująco na enzymy wykonawcze (kaspazy) lub oddziałują z białkami szoku cieplnego (chaperonami). Najliczniejszymi oraz najlepiej poznanymi regulatorami apoptozy są białka z rodziny Bcl-2.

Nazwa rodziny białek pochodzi od linii komórkowej, z której po raz pierwszy wyizolowano te czynniki (B cell leukemia/lymphoma-2). Bcl-2 wpływają na transport regulatorów apoptozy z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium, m.in. cytochromu c, AIF, białka Smac/DIABLO oraz Omi/Htr 2. Białka rodziny Bcl-2 charakteryzują się obecnością w ich strukturze domeny BH. Wśród homologicznych domen BH wyróżniamy 4 typy: BH1, BH2, BH3, BH4. Na podstawie rodzaju i ilości tych domen w cząsteczkach, białka Bcl-2 zalicza się do jednej z trzech grup. Pierwszą z nich stanowią antyapoptotyczne białka, do których należą: Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 oraz A1/Bfl-1. Oprócz domeny BH1 zawierają one także domenę transbłonową. Niektóre białka rodziny Bcl-2 mają również C-terminalny, hydrofobowy region, który umożliwia zakotwiczenie się ich w błonach wewnątrzkomórkowych. Druga grupa, do której zaliczamy Bak, Bok/Mtd, Bax oraz Bcl-XS działa proapoptotycznie i nie zawiera domen BH4. Trzecia grupa białek promujących apoptozę, to białka mające domeny BH3. Należą do niej Bid, Bim/Bod, Bad, MAP-1, Bmf, Bik/Nbk, Blk, Noxa, Puma/Bbc3 albo Hrk/DP5 [6,26,41]. Bcl-2 i Bcl-XL są najczęściej badanymi białkami antyapoptotycznymi całej rodziny zawierającej domeny BH. Ich działanie polega na tworzeniu heterodimerów z białkami proapoptotycznymi, poprzez wiązanie domen BH3, co zapobiega homooligomeryzacji i uniemożliwia prawidłowy przebieg apoptozy [2].

Istnieje możliwość interakcji między Bcl-2, Bcl-XL a Apaf-1. Takie połączenie zapobiega składaniu apoptosomu, a to z kolei hamuje aktywację kaspazy 9. W badaniach przeprowadzonych *in vitro* oraz na liniach komórkowych brak dowodów na bezpośrednią interakcję między Bcl-2 a Apaf-1. Możliwe, że do współdziałania tych dwóch białek są wymagane dodatkowe czynniki. Chau i wsp. [9] w 2000 r. opisali białko Aven, którego dużą ekspresję zaobserwowano m.in. w sercu, mięśniach szkieletowych i wątrobie. Proteina ta łączy się z Apaf-1, Bcl-2 lub Bcl-XL hamując oddziaływanie Apaf-1 z pozostałymi elementami koła śmierci.

#### Białka IAP

Białka IAP tworzą najbardziej znaną grupę inhibitorów apoptozy. Wszystkie one zawierają od jednej do trzech domen BIR (baculovirus IAP repeat-BIR), które są 70-aminokwasowymi motywami wiążącymi cynk i charaktery-



zują inhibitory śmierci komórkowej. Niektóre IAP oprócz wiążącej cynk domeny BIR mają także domenę RING (really interesting new gene). W komórkach ssaków wykryto 8 różnych białek IAP [25]. Jak dotąd stwierdzono, że ssaczce białka IAP hamują działanie kaspazy 3, 7 i 9. Mogą one działać na zasadzie dwóch mechanizmów – wiążąc się z kaspazami bezpośrednio i hamując ich aktywność lub też pośrednicząc w proteasomalnej degradacji tych enzymów. Białka XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2, NAIP za pośrednictwem swoich domen BIR, a także regionów linkerowych występujących między tymi domenami, łączą się z kaspazami i blokują ich działanie [25].

Livina, cIAP-2, c-IAP-1, XIAP, ILP-2 mają zaś w swojej strukturze C-terminalny motyw palca cynkowego RING. Jest to sekwencja charakterystyczna dla ligaz ubikwitynowych. Suzuki i wsp. [50] wykazali, że białko XIAP kieruje na drogę proteasomalnej degradacji wykonawczą kaspazę 3. Białka IAP mogą jednak pośredniczyć nie tylko w degradacji aktywnych kaspaz, lecz także nieaktywnych proenzymów przeprowadzając ich monoubikwitynację [25].

Innym białkiem działającym także antyapoptotycznie jest proteina K7, która łączy aktywną kaspazę 3 z Bcl-2 i w rezultacie hamuje działanie kaspazy efektorowej [25,55].

### **Białko p53**

Jak już wcześniej wspomniano, białko p53 bierze udział w odpowiedzi komórki na stresogenne warunki. Istnieją dowody wskazujące na bezpośrednie proapoptotyczne funkcje białka p53, skutkujące śmiercią komórki na drodze mitochondrialnej. W warunkach stresu komórkowego może wystąpić przemieszczenie białka p53 do mitochondrium, gdzie przyczynia się do permeabilizacji błony zewnętrznej. W efekcie utworzony zostaje kompleks z białkami Bcl-XL i Bcl-2, co z kolei powoduje uwolnienie cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium i aktywację kaspaz [28,29]. Tego typu aktywności nie zaobserwowano w przypadku mutacji genu p53, która jest charakterystyczna dla niektórych nowotworów [29]. Jednak nadekspresja białek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-XL zapobiega mitochondrialnej akumulacji białka p53, co sugeruje istnienie sprzężenia zwrotnego między wymienionymi czynnikami. W zależności od specyfiki środowiska komórki, białko p53 może oddziaływać z wieloma białkami proapoptotycznymi, m.in. z Bax, Puma i Noxa, których szczególną aktywność zaobserwowano podczas apoptozy związanej z tym białkiem [34]. Działanie białka p53 niezależnie, jak i zależnie od transkrypcji wywiera prawdopodobnie efekt synergiczny w procesie apoptotycznej śmierci komórki.

### **Białka szoku cieplnego**

Białka szoku cieplnego (HSP – heat shock protein) mogą w różny sposób wpływać na zewnętrzny, jak i wewnętrzny szlak programowanej śmierci. HSP są molekularnymi chaperonami, czyli cząsteczkami opiekuńczymi. Katalizują procesy rozkładu nieodwracalnie zniszczonych białek, albo ułatwiają poprawne fałdowanie białek o nieprawidłowej konformacji przestrzennej [10,39,40]. Ze względu na masę cząsteczkową dzielimy je na cztery główne rodziny: HSP 60, 70, 90 oraz niskocząsteczkowe sHSP. Najlepiej poznaną grupą są umiejscowione w cytosolu, jądrze ko-

mórkowym, mitochondriach i siateczce wewnątrzplazmatycznej HSP 70, wśród których wyróżniamy HSP 70, HSC 70, mHSP 70 oraz GRP 78. Odpowiadają one nie tylko za fałdowanie natywnych białek i ponowne fałdowanie cząstek o nieprawidłowej strukturze, ale również za transport protein z cytosolu do organelli komórkowych [18]. Białka szoku cieplnego są wytwarzane w komórce konstytutywnie (niektóre HSP 60, 70 i 90), bądź w wyniku indukcji warunkami stresowymi (HSP 70 i 27) [18,39,40]. HSP mogą działać na dwa sposoby: pro- albo antyapoptotycznie. Niejednokrotnie umiejscowienie w komórce determinuje funkcję danego białka. Przykładem może być mitochondrialne HSP60 (zwane inaczej chaperonin), które po uwolnieniu do cytoplazmy promuje aktywację prokaspazy 3, natomiast cytosolowe HSP60 ma funkcję antyapoptotyczną [39].

Białka szoku cieplnego wpływają protekcyjnie na strukturę cytoszkieletu, a konkretnie chronią filamenty aktynowe. Pivovarova i wsp. [40] wskazują na rolę HSP 27 oraz  $\alpha$ -B-kryształiny w reakcji cytoszkieletu na szok termiczny. Wprawdzie te małe HSP nie hamują denaturacji aktyny, ale zapobiegają agregacji już zdenaturowanych cząstek, które mogłyby być zabójcze dla komórek. W ten sposób hamują apoptozę indukowaną podwyższoną temperaturą [39]. Białko HSP 27, należące do grupy małych HSP, odgrywa istotną rolę w zachowywaniu integralności mitochondriów, a tym samym w regulacji wpływu cytochromu c z komórki. Dodatkowo HSP 27 może bezpośrednio wiązać się z cytochromem c i hamować jego zdolność przyłączania prokaspazy 9, a także łączyć się z prokaspazą 3 i blokować jej aktywność. Nadekspresja HSP 27 obserwowana jest również w raku piersi, nerki i pęcherza moczowego. Podwyższony poziom białek szoku cieplnego podaje się jako jedną z przyczyn rozwoju tych nowotworów [22]. Yasuda i wsp. [58] wskazują także na rolę HSP 27 w progresji raka wątroby. Wyniki ich badań wykazały odwrotną korelację między poziomem HSP 27 a rozmiarem guza, inwazją mikronaczynek oraz fazą zaawansowania raka. Prawdopodobnie ważną rolę w progresji zmian nowotworowych odgrywa stan ufosforylowania tego białka [58]. Opisane wyżej wyniki potwierdzone zostały przez Joo i wsp. [22], którzy prowadzili prace nad białkami HSP 70 oraz HSP 27 w tym samym typie raka wątroby. Podwyższony poziom obu białek, określany metodą immunohistochemiczną, korelował z obecnością inwazyjnych naczyń krwionośnych oraz rozmiarem i stopniem progresji guza. Zdaniem autorów podwyższony poziom HSP może promować proliferację komórek guza, a więc powstawanie i progresję raka dzięki hamowaniu apoptozy [22].

### **Białko Smac/DIABLO oraz Omi/HtrA 2 jako czynniki proapoptotyczne**

W roku 2000 dwa niezależne zespoły Verhagena i wsp. [54] oraz Du i wsp. [15] zidentyfikowały nieznane wcześniej białko Smac/DIABLO. Pierwsza grupa badaczy wyizolowała z komórek HeLa i oczyściła białko Smac (second mitochondria derived activator of caspase), które okazało się drugim po cytochromie c aktywatorem kaspaz uwalnianym z mitochondrium. W tym samym czasie australijski zespół Du i wsp. [15] opisał białko DIABLO (direct IAP binding protein with low PI) uzyskane z komórek nerczaka płodowego (linia 293T) [15,54]. Dalszym etapem badań nad tymi

białkami było sklonowanie genu Smac/DIABLO, którego ekspresja okazała się powszechna w tkankach ludzkich. Stwierdzono, że ekspresja mRNA Smac/DIABLO występuje na najwyższym poziomie w tkance jąder, a także na nieco niższym w sercu, wątrobie, nerkach, śledzionie, prostaty i jajnikach. Małą zawartość Smac/DIABLO obserwowano w komórkach mózgu, płuc, grasicy oraz w leukocytach krwi obwodowej [54]. Białko Smac/DIABLO zwiększa wrażliwość komórek na apoptozę indukowaną promieniowaniem UV. Molekularny mechanizm działania tego czynnika polega na kompetycyjnym hamowaniu działania inhibitorów kaspaz (np. XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2, surwiwiny) poprzez przyłączenie się do domeny BIR 3. Dodatkowo Smac/DIABLO zmienia strukturę przestrzenną domeny BIR 2 inhibitorów tak, że nie może ona łączyć się i blokować aktywności kaspaz wykonawczych (3 i 7). W ten sposób omawiany czynnik mitochondrialny działa na komórki proapoptotycznie [15,25,30,52].

Ssaczym czynnikiem działającym proapoptotycznie jest białko Omi/HtrA 2 o masie 49 kDa. Białko to jest homologiem bakteryjnej endoproteazy Htr A (high temperature requirement). U bakterii bierze ono udział w reakcji komórek na wysoką temperaturę, stres oksydacyjny i osmotyczny. U ssaków Omi/HtrA 2 podlega regulacji przez czynniki środowiskowe, takie jak szok termiczny czy stres chemiczny. Białko Omi/HtrA 2 podobnie jak Smac/DIABLO jest umiejscowione w przestrzeni międzymbłonowej mitochondrium. W części N-końcowej ma ono sekwencję sygnałową umożliwiającą transport do mitochondrium. Po odcięciu peptydu sygnałowego powstaje krótsze funkcjonalne białko o masie 37 kDa. Podczas apoptozy zachodzącej zarówno ścieżką mitochondrialną, jak i receptorową Omi/HtrA 2 jest uwalniany do cytoplazmy, gdzie za pośrednictwem domeny IBM wpływa na IAP. W odróżnieniu od Smac/DIABLO czynnik Omi/HtrA 2 nie oddziałuje jednak z surwiwiną i ma inny wzór ekspresji w tkankach. Analiza Northern blotting wykazała, że Omi/HtrA 2 jest bardziej powszechnym białkiem organizmu ludzkiego, natomiast występowanie Smac/DIABLO jest ograniczone do wybranych tkanek. Białko Omi/HtrA 2 jest wysoce konserwatywnym czynnikiem, którego homologi są identyfikowane również w komórkach *E. coli*, rzodkiewnika, muszki owocowej, komara widliszka [52].

## 5. POŁĄCZENIE ZEWNĘTRZNEGO I WEWNĘTRZNEGO SZLAKU APOPTOZY

Chociaż szlaki wewnętrzny i zewnętrzny apoptozy przebiegają niezależnie, istnieje białkowy czynnik mogący je połączyć. Gdy sygnał z receptorów błonowych jest słaby i nie wystarczy do uruchomienia kaskady kaspaz, zachodzi amplifikacja sygnału śmierci za pośrednictwem białka Bid [19,42]. Częśćka ta należąca do rodziny Bcl-2 ulega proteolizie pod wpływem kaspazy 8 (miejsce to w szlaku apoptozy nazywamy cross-talk, czyli skrzyżowaniem ścieżek), która musi zostać uprzednio aktywowana przez kompleks DISC, będący elementem ścieżki receptorowej. Przecięte przez kaspazę 8 białko Bid przybiera postać tBid (truncated Bid) i łączy się z białkiem Bax, indukując w nim zmiany konformacyjne. Przestrzennie zmodyfikowane białko Bax ma zdolność przyłączenia się do błony mitochondrialnej i zwiększenia przepuszczalności porów, co z kolei

Tabela 1. Czynniki hamujące i aktywujące drogę mitochondrialną apoptozy (skrótowo wyjaśniono w tekście)

Czynniki hamujące apoptozę	Czynniki aktywujące apoptozę
Białka z rodziny Bcl-2 (Bcl-2, Bcl <sub>XL</sub> , Bcl <sub>w</sub> , Mcl-1, A1/Bfl-1)	Białka z rodziny Bcl-2 (Bak, Bok/Mtd, Bax, Bcl-XS) Bid, Bim/Bod, Bad, MAP-1, Bmf, Bik/Nbk, Blk, Noxa, Puma/Bbc3, Hrk/DP5)
Białka IAP (XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2, NAIP, ILP-2, livina)	Białko Smac/DIABLO, Omi/HtrA
Białka szoku cieplnego (HSP) – cytosolowe HSP60, HSP27	Białka szoku cieplnego (HSP) – mitochondrialne HSP60

powoduje wzrost intensywności wypływu cytochromu c. Wykazano, że działanie białka tBid powoduje 100-krotnie efektywniejsze uwalnianie cytochromu c z mitochondrium w porównaniu z nieobecnością tego czynnika w cytoplazmie [19]. Przepuszczalność błon mitochondrialnych zależy nie tylko od białek, ale także od ulegającym częstym przearanżowaniu lipidów. Na całkowity wypływ cytochromu c z mitochondriów ma wpływ peroksydacja kardiolipiny. Wydaje się, że do interakcji białka tBid z błoną mitochondrium jest potrzebna obecność właśnie tego fosfolipidu [19,35,38]. Białko tBid działa na dwa sposoby. Po pierwsze indukuje ono oligomeryzację Bax i Bak, a po drugie asocjuje z kardiolipiną i w ten sposób umożliwia uwolnienie z wnętrza mitochondrium większej puli cytochromu c [19].

## 6. ZAKOŃCZENIE

Mitochondrialna ścieżka apoptozy jest kontrolowana i regulowana przez wiele różnych czynników (tabela 1).

Modulowanie poziomu białek regulatorowych może być przyczyną zaburzeń w przebiegu apoptozy. Z taką sytuacją mamy do czynienia w przypadkach licznych chorób m.in. nowotworowych i autoimmunoagresywnych. Jednocześnie czynniki wpływające na programowaną śmierć mogą się stać celem leków nowej generacji i dlatego pozostają nadal interesującym i aktualnym tematem badań licznych zespołów naukowych na świecie. Większość obecnie stosowanych leków przeciwnowotworowych indukuje apoptozę przez uszkodzenia DNA (np. Etopozyd) lub też wpływa na zahamowanie działania głównych enzymów w systemie związanym z przekazywaniem sygnału przeżycia komórki (inhibitory transferaz). Do leków indukujących mitochondrialną drogę śmierci należy m.in. Genasense TM, który jest oligonukleotydem antysensownym Bcl-2. Wpływa on na zmniejszenie poziomu mRNA i białka Bcl-2 w komórkach szpiczakowych. W terapiach przeciwnowotworowych stosuje się także czynniki wzrostu, które stymulują powstawanie prawidłowych komórek. Poznawanie mechanizmu zaburzeń w procesie apoptozy jest przedmiotem badań wielu naukowców na świecie, co umożliwi stwarzanie coraz to nowszych i bardziej skutecznych terapii przeciwnowotworowych.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Acehan D., Jiang X., Morgan D.G., Heuser J.E., Wang X., Akey C.W.: Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell.*, 2002; 9: 423–432
- [2] Adams J.M., Cory S.: Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2002; 14: 715–720
- [3] Bala S., Oliver H., Renault B., Montgomery K., Dutta S., Rao P., Houldsworth J., Kucherlapati R., Wang X., Chaganti R.S., Murty V.V.: Genetic analysis of the APAF1 gene in male germ cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000; 28: 258–268
- [4] Baldi A., Santini D., Russo P., Catricala C., Amantea A., Picardo M., Tatangelo F., Botti G., Dragonetti E., Murace R., Tonini G., Natali P.G., Baldi F., Paggi M.G.: Analysis of APAF-1 expression in human cutaneous melanoma progression. *Exp. Dermatol.*, 2004; 13: 93–97
- [5] Baliga B., Kumar S.: Apaf-1/cytochrome c apoptosome: an essential initiator of caspase activation or just a sideshow? *Cell Death Differ.*, 2003; 10: 16–18
- [6] Borner C.: The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol.*, 2003; 39: 615–647
- [7] Bratton S.B., Walker G., Roberts D.L., Cain K., Cohen G.M.: Caspase-3 cleaves Apaf-1 into an approximately 30 kDa fragment that associates with an inappropriately oligomerized and biologically inactive approximately 1.4 MDa apoptosome complex. *Cell Death Differ.*, 2001; 8: 425–433
- [8] Cain K., Bratton S.B., Cohen G.M.: The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*, 2002; 84: 203–214
- [9] Chau B.N., Cheng E.H., Kerr D.A., Hardwick J.M.: Aven, a novel inhibitor of caspase activation Bcl-xL and Apaf-1. *Mol. Cell*, 2000; 6: 31–40
- [10] Cymerys J., Niemiałowski M.: Białka szoku ciepłego – molekularne perpetuum mobile. *Post. Biol. Kom.*, 2004; 31: 331–352
- [11] Dai D.L., Martinka M., Bush J.A., Li G.: Reduced Apaf-1 expression in human cutaneous melanomas. *Br. J. Cancer*, 2004; 91: 1089–1095
- [12] Daniel P.T.: Dissecting the pathways to death. *Leukemia*, 2000; 14: 2035–2044
- [13] Del Bello B., Valentini M.A., Mangiacavchi P., Comporti M., Maellaro E.: Role of caspases-3 and -7 in Apaf-1 proteolytic cleavage and degradation events during cisplatin-induced apoptosis in melanoma cells. *Exp. Cell Res.*, 2004; 293: 302–310
- [14] Dlamini Z., Mbita Z., Zungu M.: Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. *Pharmacol. Ther.*, 2004; 101: 1–15
- [15] Du C., Fang M., Li Y., Li L., Wang X.: Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 2000; 102: 33–42
- [16] Fu W.N., Bertoni F., Kelsey S.M., Mc Elwaine S.M., Cotter F.E., Newland A.C., Jia L.: Role of DNA methylation in the suppression of Apaf-1 protein in human leukaemia. *Oncogene*, 2003; 22: 451–455
- [17] Fujimoto A., Takeuchi H., Taback B., Hsueh E.C., Elashoff D., Morton D.L., Hoon D.S.: Allelic imbalance of 12q22-23 associated with APAF-1 locus correlates with poor disease outcome in cutaneous melanoma. *Cancer Res.*, 2004; 64: 2245–2250
- [18] Garrido C., Gurbuxani S., Ravagnan L., Kroemer G.: Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001; 286: 433–442
- [19] Gonzalez F., Pariselli F., Dupaigne P., Budihardjo I., Lutter M., Antonsson B., Dirolez P., Manon S., Martinou J.C., Goubern M., Wang X., Bernard S., Petit P.X.: tBid interaction with cardiolipin primarily orchestrates mitochondrial dysfunctions and subsequently activates Bax and Bak. *Cell Death Differ.*, 2005; 12: 614–626
- [20] Grądzka I., Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium. *Post. Biochem.*, 2000; 46: 2–16
- [21] Grzelakowska-Sztabert B.: Apoptoza i nowotwory. *Post. Biol. Kom.*, 2000; 27(Supl.15): 9–43
- [22] Joo M., Chi J.G., Lee H.: Expression of HSP 70 and HSP 27 in hepatocellular carcinoma. *J. Korean Med. Sci.*, 2005; 20: 829–834
- [23] Kiliańska Z.M., Miśkiewicz A.: Kaspazy kręgowców; ich rola w przebiegu apoptozy. *Post. Biol. Kom.*, 2003; 30: 129–152
- [24] Kroemer G.: Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 304: 433–435
- [25] Le Blanc A.C.: Natural cellular inhibitors of caspases. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry*, 2003; 27: 215–229
- [26] Lucken-Ardjomande S., Martinou J.C.: Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane. *CR Biol.*, 2005; 328: 616–631
- [27] Małecki M., Rzońca S.: Indukcja apoptozy jako cel terapii genowej nowotworów. *Post. Biol. Kom.*, 2005; 32: 327–341
- [28] Marchenko N.D., Zaika A., Moll U.M.: Death signal – induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 16202–16212
- [29] Mihara M., Erster S., Zaika A., Petrenko O., Chittenden T., Pancoska P., Moll U.M.: p53 has a direct apoptogenic role at mitochondria. *Mol. Cell*, 2003; 11: 577–590
- [30] Motyl T., Gajkowska B., Górka M., Godlewski M.M., Lamparska-Przybylska M.: Kinetyka oraz regulacja uwalniania Smac/DIABLO z mitochondriów komórek nowotworowych pod wpływem stymulacji apoptogennej. *Post. Biol. Kom.*, 2004; 31: 219–233
- [31] Mróz P., Młynarczuk I.: Mechanizmy indukcji apoptozy i zastosowanie TRAIL w terapii nowotworów. *Post. Biol. Kom.*, 2003; 30: 113–128
- [32] Mustika R., Budiyo A., Nishigori C., Ichihashi M., Ueda M.: Decreased expression of Apaf-1 with progression of melanoma. *Pigment Cell Res.*, 2005; 18: 59–62
- [33] Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B.A., Yuan J.: Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 2000; 403: 98–103
- [34] Nakano K., Vousden K.H.: PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell*, 2001; 7: 683–694
- [35] Nomura K., Imai H., Koumura T., Kobayashi T., Nakagawa Y.: Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem. J.*, 2000; 351: 183–193
- [36] Ockner R.K.: Apoptosis and liver diseases: recent concepts of mechanism and significance. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2001; 16: 248–260
- [37] Ohsato T., Ishihara N., Muta T., Umeda S., Ikeda S., Mihara K., Hamasaki N., Kang D.: Mammalian mitochondrial endonuclease G. Digestion of R-loops and localization in intermembrane space. *Eur. J. Biochem.*, 2002; 269: 5765–5770
- [38] Ott M., Robertson J.D., Gogvadze V., Zhivotovsky B., Orrenius S.: Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 1259–1263
- [39] Parcellier A., Gurbuxani S., Schmitt E., Solary E., Garrido C.: Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 304: 505–512
- [40] Pivovarova A.V., Mikhailova V.V., Chernik I.S., Chebotareva N.A., Levitsky D.I., Gusev N.B.: Effects of small heat shock proteins on the thermal denaturation and aggregation of F-actin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 331: 1548–1553
- [41] Rupniewska Z., Bojarska-Junak A.: Apoptoza: Przepuszczalność błony mitochondrialnej i rola peptyna przez białka z rodziny Bcl-2. *Post. Hig. i Med. Dośw.*, 2004; 58: 538–547
- [42] Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K.M., Kramer P.H., Peter M.E.: Two CD 95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.*, 1998; 17: 1675–1687
- [43] Scorrano L., Ashiya M., Buttle 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
- [44] Shi Y.: Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure*, 2002; 10: 285–288
- [45] Shiozaki E.N., Chai J., Shi Y.: Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 4197–4202
- [46] Smolewski P.: Rola kaspaz w procesie apoptozy. *Post. Hig. i Med. Dośw.*, 2003; 57: 335–354
- [47] Soengas M.S., Capodiceci P., Polsky D., Mora J., Esteller M., Opitz-Araya X., McCombie R., Herman J.G., Gerald W.L., Lazebnik Y.A., Cordon-Cardo C., Lowe S.W.: Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*, 2001; 409: 207–211
- [48] Soengas M.S., Gerald W.L., Cordon-Cardo C., Lazebnik Y., Lowe S.W.: Apaf-1 expression in malignant melanoma. *Cell Death Differ.*, 2006; 13: 352–353

- [49] Sulejczak D.: Apoptoza i metody jej identyfikacji. *Post. Biol. Kom.*, 2000; 27: 527–568
- [50] Suzuki Y., Imai Y., Nakayama H., Takahashi K., Takio K., Takahashi R.: A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell*, 2001; 8: 613–621
- [51] Svingen P.A., Loegering D., Rodriguez J., Meng X.W., Mesner P.W. Jr, Holbeck S., Monks A., Krajewski S., Scudiero D.A., Sausville E.A., Reed J.C., Lazebnik Y.A., Kaufmann S.H.: Components of the cell death machine and drug sensitivity of the National Cancer Institute Cell Line Panel. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10: 6807–6820
- [52] Van Gurp M., Festjens N., Van Loo G., Saelens X., Vandenabeele P.: Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 304: 487–497
- [53] Van Loo G., Schotte P., Van Gurp M., Demol H., Hoorelbeke B., Gevaert K., Rodriguez I., Ruiz-Carrillo A., Vandekerckhove J., Declercq W., Beyaert R., Vandenabeele P.: Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ.*, 2001; 8: 1136–1142
- [54] Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M., Silke J., Connolly L.M., Reid G.E., Moritz R.L., Simpson R.J., Vaux D.L.: Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 2000; 102: 43–53
- [55] Wang H.W., Sharp T.V., Koumi A., Koentges G., Boshoff C.: Characterization of an anti-apoptotic glycoprotein encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus which resembles a spliced variant of human survivin. *EMBO J.*, 2002; 21: 2602–2615
- [56] Wang Z.B., Liu Y.Q., Cui Y.F.: Pathways to caspase activation. *Cell Biol. Int.*, 2005; 29: 489–496
- [57] Widlak P., Li L.Y., Wang X., Garrard W.T.: Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 48404–48409
- [58] Yasuda E., Kumada T., Takai S., Ishisaki A., Noda T., Matsushima-Nishiwaki R., Yoshimi N., Kato K., Toyoda H., Kaneoka Y., Yamaguchi A., Kozawa O.: Attenuated phosphorylation of heat shock protein 27 correlates with tumor progression in patients with hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 337: 337–342
- [59] Yu J., Zhang L.: The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 331: 851–858
- [60] Yu S.W., Wang H., Poitras M.F., Coombs C., Bowers W.J., Federoff H.J., Poirier G.G., Dawson T.M.: Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*, 2002; 297: 259–263
- [61] Zanon M., Piris A., Bersani I., Vegetti C., Molla A., Scarito A., Anichini A.: Apoptosis protease activator protein-1 expression is dispensable for response of human melanoma cells to distinct proapoptotic agents. *Cancer Res.*, 2004; 64: 7386–7394