

Received: 2009.06.10  
Accepted: 2009.08.31  
Published: 2009.09.10

## **BNIP3 jako nietypowy przedstawiciel rodziny Bcl-2. Część 1: BNIP3 – regulator nieapoptotycznej programowanej śmierci komórek\***

BNIP3 as an atypical representative of the Bcl-2 protein family. Part 1: BNIP3, a regulator of non-apoptotic programmed cell death

**Ewelina Swoboda, Leon Strządała**

Laboratorium Immunobiologii Molekularnej Nowotworów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

### **Streszczenie**

Białko BNIP3 jest zaliczane do rodziny białek Bcl-2, regulujących programowaną śmierć komórki oraz do grupy białek BOP (BH3-only proteins), ze względu na występowanie tylko jednej domeny BH. Ma ono także domenę transmembranową, której obecność warunkuje przynajmniej część jego funkcji proapoptotycznych. Mimo pewnych podobieństw do pozostałych białek BOP, np. zdolności interakcji z antyapoptotycznymi członkami rodziny Bcl-2 czy indukcji uwalniania cytochromu c z mitochondriów, BNIP3 jest niewątpliwie białkiem odmiennym, zarówno pod względem aktywności, jak i regulacji. Ma ono zdolność aktywacji nie tylko apoptozy, ale także – a może przede wszystkim – śmierci przypominającej w przebiegu nekrozę, dzięki bezpośredniemu oddziaływaniu na błonę mitochondrialną. Uczestniczy również w autofagii, choć jego rola w tym procesie nie została dokładnie poznana. Jest prawdopodobne, że indukując lub stymulując autofagię, BNIP3 pełni funkcję antyapoptotyczną, np. w komórkach mięśnia sercowego. Podobnie dzieje się w przypadku komórek, w których białko to ulega sekwestracji w jądrze i działa jako represor transkrypcji czynnika proapoptotycznego AIF, dzięki czemu komórki nowotworowe uzyskują oporność na chemioterapeutyki.

**Słowa kluczowe:**

**BNIP3 • programowana śmierć komórki • autofagia • mitochondria**

### **Summary**

BNIP3 is classified as a member of the Bcl-2 protein family that regulates programmed cell death and of the BH3-only protein subfamily as it only contains one BH domain. However, the transmembrane domain of BNIP3 is involved in at least some of its pro-apoptotic functions. Although there are some similarities between BNIP3 and other BH3-only proteins, for example the ability to interact with anti-apoptotic Bcl-2 proteins and to induce cytochrome c release from mitochondria, BNIP3 is undoubtedly distinct in regard to its activity and regulatory mechanisms. Not only can BNIP3 activate apoptosis, but also, or perhaps first of all, it can activate necrosis-like cell death due to its direct interaction with the mitochondrial membrane. BNIP3 is also involved in autophagy, but its role in this process is not yet clearly understood. It is possible that the induction or stimulation of autophagy by this protein can simultaneously inhibit apoptosis, for exam-

\* Praca powstała w ramach grantów MNiSW nr N301 104 31/3087 i nr 1243/B/P01/2007/33.

ple in cardiac myocytes. In some cells, BNIP3 is sequestered in the nucleus, where it also acts as an anti-apoptotic factor, namely as a repressor of AIF transcription. This activity may enable tumor cells to achieve resistance to chemotherapeutics. Understanding BNIP3 functions and regulatory mechanisms can point to new molecular targets in the treatment of cancer and ischemic heart or brain diseases.

**Key words:** BNIP3 • programmed cell death • autophagy • mitochondria

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=894143>

**Word count:** 3980

**Tables:** –

**Figures:** 2

**References:** 46

**Adres autorki:** mgr Ewelina Swoboda, Laboratorium Immunobiologii Molekularnej Nowotworów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: swoboda@iitd.pan.wroc.pl

**Wykaz skrótów:** **AICD** – śmierć indukowana aktywacją (activation-induced cell death); **AIF** – czynnik indukujący apoptozę (apoptosis-inducing factor); **BH** – (domena) homologii z Bcl-2 (Bcl-2 homology); **BNIP3** – białko wiążące Bcl-2 i adenowirusowe białko E1B-19kDa 3 (Bcl-2/adenovirus E1B-19kDa interacting protein 3); **BNIP3L** – białko podobne do BNIP3 (BNIP3-like); **BOP** – białka mające wyłącznie domenę BH3 (BH3-only proteins); **HDAC1** – deacetylaza histonów 1 (histone deacetylase 1); **I/R** – niedokrwienie/reperfuzja (ischemia/reperfusion); **JNK1** – N-terminalna kinaza białka c-Jun (c-Jun N-terminal protein kinase); **MEFs** – mysie fibroblasty embrionalne (mouse embryonal fibroblasts); **MMP** – permeabilizacja błony mitochondrialnej (mitochondrial membrane permeabilization); **MPT** – zmiana przepuszczalności błony mitochondrialnej (mitochondrial permeability transition); **MPTP** – megakanal (mitochondrial permeability transition pore); **mTOR** – ssaczy cel rapamycyny (mammalian target of rapamycin); **NMR** – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (nuclear magnetic resonance); **PCD** – programowana śmierć komórki (programmed cell death); **PSF** – czynnik splicingowy związany z PTB (PTB-associated splicing factor); **ROS** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species); **SDS** – dodecylosiarczan sodu (sodium dodecyl sulphate); **TMZ** – temozolomid; **TSP-1** – trombospondyna 1.

## 1. RODZINA BIAŁEK BCL-2

Śmierć komórki jest procesem kluczowym dla utrzymania właściwego funkcjonowania organizmu wielokomórkowego, m.in. dla zapobiegania transformacji nowotworowej. W związku z tym musi podlegać ona bardzo precyzyjnej kontroli. Pierwszorzędną rolę w regulacji programowanej śmierci komórek (programmed cell death – PCD) odgrywają białka rodziny Bcl-2. Jest to heterogenna grupa białek, których wspólną cechą jest obecność przynajmniej jednej domeny BH (Bcl-2 homology). Liczba i kombinacja domen BH, budujących dane białko, decydują o jego właściwościach [33] (ryc. 1).

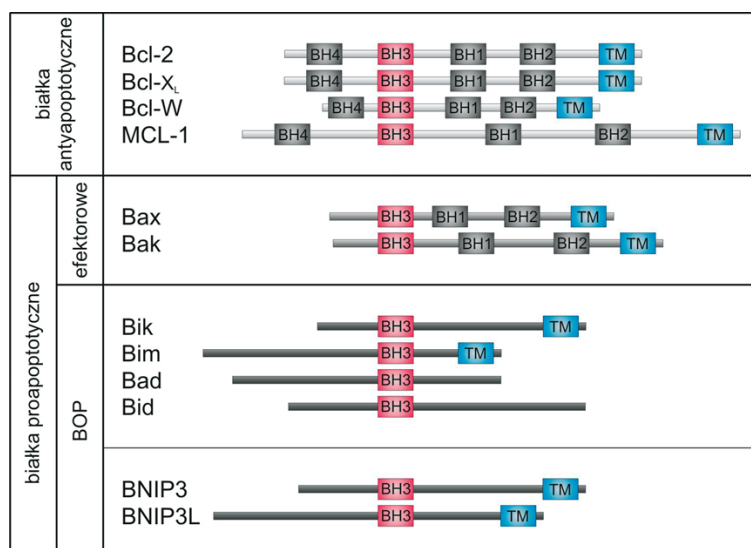
Białka zawierające 4 domeny BH (BH1–4) to białka antyapoptotyczne (m.in. Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>), które występują najczęściej na zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Ich funkcją jest bezpośrednio wiązanie i hamowanie aktywności białek proapoptotycznych rodziny Bcl-2, które z kolei dzieli się na 2 grupy:

- białka efektorowe (Bax i Bak), zawierające 3 domeny BH (BH1–3) i powodujące permeabilizację zewnętrznej błony mitochondrialnej (mitochondrial membrane permeabilization – MMP),

- białka BOP (BH3-only proteins), zawierające tylko 1 domenę BH i biorące udział w przekazywaniu wewnątrz komórki zróżnicowanych sygnałów wskazujących na wystąpienie czynników stresowych [13].

W chwili wystąpienia w komórce sygnału inicjującego MMP, białka antyapoptotyczne ulegają funkcjonalnej neutralizacji poprzez wiązanie z aktywowanymi białkami BOP za pośrednictwem domeny BH3. Prowadzi to do uwolnienia białek efektorowych Bax i/lub Bak i w konsekwencji do permeabilizacji błony mitochondriów [13]. W ten sposób białka BOP przekazują większość, jeśli nie wszystkie, sygnały śmierci [46], przekształcając je do nowej postaci, czytelnej dla efektorów programowanej śmierci. Decyzja o inicjacji MMP, a tym samym o losie komórki, jest zatem uzależniona od złożonych wzajemnych oddziaływań pomiędzy białkami rodziny Bcl-2.

Przedstawiony wyżej model, zakładający, że jedyną rolą białek BOP jest transmisja sygnału śmierci do białek efektorowych [37], poprzez neutralizację białek antyapoptotycznych, jest niepełny. Wykazano, że białka efektorowe do pełnienia swej funkcji często wymagają dodatkowej



Ryc. 1. Tradycyjna klasyfikacja białek rodziny Bcl-2 oraz porównanie ich budowy domenowej. Białko BNIP3 zaliczane jest do grupy białek BOP, mimo że wyróżnia się ono zarówno pochodzeniem ewolucyjnym, jak i funkcją w komórce

aktywacji [38]. Ponadto, białka BOP mogą powodować zmiany konformacyjne białek efektorowych, są także zaangażowane w stabilizację białek Bax i Bak w błonie mitochondrium oraz w tworzenie porów [13]. Tym samym, na podstawie mechanizmu działania białek BOP, sklasyfikowano je do dwóch grup:

- aktywatorów (activators; np. tBid, Bim) i
- derepresorów (derepresors, sensitizers, facilitators; np. Bad) [1,13,22].

Niektórzy autorzy uważają, że białka BOP nie mogą aktywować programowanej śmierci komórki bez udziału choćby jednego z białek efektorowych. Co więcej, przypuszczają, że białka BOP nie są niezbędne do zajścia apoptozy i że nie wymaga ona bezpośredniej aktywacji Bax i Bak, a ich aktywacja w określonych warunkach może służyć jedynie amplifikacji sygnału [1]. Z drugiej strony, dowiedziono, że białka BOP mogą ulegać insercji lub być importowane do zewnętrznej błony mitochondriów [17], co może wskazywać na funkcje potencjalnie niezależne od białek Bax i Bak. Jak wynika z powyższego zarysu, część naszej wiedzy na temat inicjacji, kontroli i egzekucji PCD jest już ugruntowana i jasna. Wciąż jednak pozostaje wiele niewiadomych, zwłaszcza dotyczących funkcjonowania białek BOP.

Niniejsza praca jest próbą uporządkowania i podsumowania aktualnej wiedzy na temat białka BNIP3, jednego z najbardziej intrygujących białek grupy BOP.

## 2. BIAŁKO BNIP3 – WPROWADZENIE

Białko BNIP3 (Bcl-2/adenovirus E1B-19kDa interacting protein 3) zostało po raz pierwszy zidentyfikowane dzięki zastosowaniu drożdżowego systemu dwuhybrydowego jako białko mogące wiązać wirusowy supresor apoptozy E1B-19K [2]. Następnie dowiedziono, że BNIP3 może również wiązać endogenne antyapoptotyczne białko Bcl-2 [40]. Potwierdzono także w jego strukturze obecność domeny o częściowej homologii do BH3 [24] (określanej czasem jako BH3-like, jednak najczęściej w literaturze spotyka się określenie BH3) i na tej podstawie zaliczono BNIP3 do grupy BOP, choć stanowi ono, po-

dobnie jak jego homolog BNIP3L (BNIP3-like)/Nix, odrębną gałąź ewolucyjną [3] (ryc. 1). Białko BNIP3 różni się od innych białek tej grupy także tym, że do pełnienia przynajmniej części funkcji proapoptotycznych jego domena BH3 nie jest wymagana. Wykazuje ono zdolność bezpośredniego oddziaływania na mitochondria, wskutek czego wpływa na potencjał błony mitochondrialnej [6] (ryc. 2A i B).

BNIP3 w warunkach fizjologicznych jest nieobecny w większości typów komórek organizmu [27], ulega jednak ekspresji w komórkach mięśnia sercowego [19], a także na niskim poziomie w komórkach mózgowych [30] i mięśni szkieletowych. Zróżnicowany poziom ekspresji obserwuje się w komórkach nowotworowych. Jest on znacznie podwyższony w raku gruczołu sutkowego i płuc (non-small cell lung cancer), natomiast obniżony w raku trzustki oraz w wielu przypadkach raka jelita grubego, żołądka i nowotworów hematopoetycznych [27].

BNIP3 wydaje się kluczowym regulatorem śmierci komórkowej spowodowanej hipoksją i na tej właśnie funkcji koncentruje się ogromna większość badań nad tym białkiem. Stopniowo jednak coraz bardziej oczywiste staje się, że rola BNIP3 w komórce nie ogranicza się wyłącznie do indukcji PCD w warunkach niedoboru tlenu i że jego rola jest znacząca także w czasie normoksji (patrz część II). Białko to może indukować zarówno apoptozę, jak i śmierć o charakterze nieapoptotycznym, w zależności od typu komórki i rodzaju bodźca [30].

### 2.1. Domena BH3

Domena BH3 jest  $\alpha$ -helisą [38], charakterystyczną zarówno dla pro-, jak i antyapoptotycznych białek rodziny Bcl-2, niezbędna do interakcji pomiędzy nimi [40]. Po aktywacji białek BOP, ich domena BH3 wnika do hydrofobowego rowka na powierzchni globularnej struktury białek antyapoptotycznych [38], utworzonej z domen BH1, BH2 i BH3, powodując ich neutralizację. Domeny BH3 poszczególnych białek BOP mają zróżnicowany stopień powinowactwa do różnych białek antyapoptotycznych [43]:

- Bim, Puma i tBid wiążą wszystkie białka antyapoptotyczne;
- Noxa wiąże Mcl-1 i A1;
- Bad wiąże Bcl-2, Bcl-XL i Bcl-w.

Tym samym w różnych komórkach, ze względu na występowanie różnych białek antyapoptotycznych, do indukcji apoptozy wymagany jest również inny zestaw białek BOP [1,38].

Domena BH3 białka BNIP3 znajduje się na N-końcu i zawiera dwa kluczowe i konserwatywne aminokwasy – leucynę w pozycji 1 i kwas asparaginowy w pozycji 6, nie zawiera jednak dwóch innych aminokwasów charakterystycznych dla BH3 – glicyny i kwasu glutaminowego, odpowiednio, w pozycjach 5 i 7 [24]. Dyskusyjne jest, czy domena ta uczestniczy w interakcjach BNIP3 z innymi białkami rodziny Bcl-2. Część autorów uważa, że jest ona odpowiedzialna za heterodimeryzację z białkami antyapoptotycznymi, np. Bcl-2 czy Bcl-XL, przez co może modulować ich aktywność [6,37,40]. Z kolei badania na innych modelach komórkowych wskazują, że odmiennie niż w przypadku pozostałych białek BOP, domena BH3 białka BNIP3 nie jest niezbędna do interakcji z pozostałymi członkami rodziny Bcl-2, ponieważ odpowiada za nie domena transmembranowa (transmembrane domain – TM) [24].

## 2.2. Domena transmembranowa

Większość białek rodziny Bcl-2, oprócz domen BH, zawiera na C-końcu domenę transmembranową, która determinuje lokalizację subkomórkową danego białka. W przypadku BNIP3 domena TM kieruje białko do mitochondrium [40] i umożliwia jego wbudowanie się w zewnętrzną błonę mitochondrialną [35]. Podczas gdy domena C-końcowa (TM) zostaje wbudowana w błonę, domena N-końcowa pozostaje w cytoplazmie [30]. Obecnie wydaje się, że to właśnie domena TM jest zasadnicza do pełnienia funkcji proapoptotycznych, ponieważ odpowiada za zachowanie lokalizacji mitochondrialnej [21] i homodimeryzację białka BNIP3 [6]. Potwierdzają to wyniki badań na izolowanych mitochondriach, według których domena BH3 nie jest niezbędna do zajścia procesu permeabilizacji błony mitochondrialnej, zwanego MPT (mitochondrial permeability transition), ale zależy on przede wszystkim od domeny TM oraz C-końca [21].

Domena TM białka BNIP3 występuje w postaci ciasno zassocjowanego, helikalnego dimeru, zarówno w środowisku lipidowym, jak i w obecności detergentu [6]. Właściwość tę potwierdziły badania w błonach biologicznych *E. coli*. Powstałe z jej udziałem dimery są odporne nawet na działanie dodecylsulfianu sodu (sodium dodecyl sulphate – SDS), dzięki czemu mogą być wykrywane techniką Western blotting z zastosowaniem elektroforezy w warunkach denaturujących [34].

Struktura domeny TM BNIP3, określona dzięki zastosowaniu techniki NMR (nuclear magnetic resonance) oraz modelowania opartego na dynamice molekularnej, sugeruje możliwość tworzenia przez BNIP3 kanałów jonowych w błonie. Wynika to z właściwości strukturalnych dimeru, tj. węzła umiejscowionego pośrodku błony, bogate-

go w wiązania wodorowe His-Ser; dostępności węzła dla wody i obecności ciągłego hydrofilowego traktu wzdłuż całego regionu transmembranowego. Struktura i dynamika domen TM, jak również korelacja zmian pH ze zmianami przepuszczalności błon wskazują na to, że BNIP3 tworzy w błonach kanał protonowy [6]. Zdolność domeny TM do homodimeryzacji wyłącznie w błonach biologicznych może służyć jako mechanizm zapewniający, że białko najpierw zostanie zlokalizowane w mitochondrium, a dopiero później ulegnie dimeryzacji [34].

Wspomniane wcześniej badania na izolowanych mitochondriach sugerują jednak, że formowanie homodimerów nie jest warunkiem koniecznym do zajścia permeabilizacji błony [21], podobnie jak nie jest niezbędne do proapoptotycznej aktywności BNIP3 [10]. Wskazuje to na istnienie kilku różnych, potencjalnie niezależnych mechanizmów permeabilizacji błony mitochondrialnej przez BNIP3, prowadzącej do spadku potencjału transmembranowego oraz dysfunkcji mitochondriów, a w konsekwencji do śmierci komórki (patrz niżej).

Podczas gdy homodimeryzacja wydaje się być cechą wyłącznie lokalizacji mitochondrialnej białka BNIP3 [29], sama domena TM odpowiada także za jego oddziaływanie z innymi białkami, np. receptorem błonowym trombospondyny 1 (TSP-1), CD47 [26]. Ponadto, interakcje pomiędzy osadzonymi w błonach regionami różnych białek BOP mogą modulować ich funkcje proapoptotyczne. Przykładem jest oddziaływanie BNIP3 z BNIP3L za pośrednictwem domen TM, które znosi działanie proapoptotyczne białka BNIP3 [34].

## 3. ROLA BNIP3 W PROGRAMOWANEJ ŚMIERCI KOMÓRKI

Do niedawna wyróżniano wyłącznie dwa typy śmierci komórkowej: apoptozę, uważaną za proces kontrolowany i fizjologiczny, utożsamiany tym samym z programowaną śmiercią komórki oraz nekrozę – proces przypadkowy i patologiczny. W ostatnich latach zaczyna jednak dominować pogląd, że tego rodzaju dychotomiczny podział jest zbyt uproszczony [8], ponieważ intensywne badania nad śmiercią komórkową ujawniły istnienie alternatywnych typów śmierci (autofagia [28], katastrofa mitotyczna [8], pyroptoza [15]), które również można zaliczyć do PCD. Opisano także mechanizmy śmierci komórkowej wykazujące zarówno cechy apoptozy, jak i nekrozy [45]. Ponadto, poddaje się w wątpliwość przypadkowość procesu nekrozy [16], czego rezultatem jest powstanie terminu 'necrosis-like cell death'. Obecnie wyróżnia się 3 podstawowe rodzaje śmierci komórkowej:

- śmierć typu I – apoptoza,
- śmierć typu II – autofagia,
- śmierć typu III – nekroza [7].

Właściwości proapoptotyczne białka BNIP3 określa się jako słabe, a maksimum jego aktywności jest opóźnione w porównaniu z innymi białkami proapoptotycznymi rodziny Bcl-2 [42]. Badania potwierdzają udział BNIP3 we wszystkich trzech z wyżej wymienionych typów śmierci komórki. To, w jaki sposób BNIP3 wpływa na funkcjonowanie mitochondriów, a tym samym, jaki szlak śmierci zostanie uaktywniony, wydaje się zależeć przede wszystkim od typu komórek. Zaobserwowano, że najczęściej:

- w kardiomiocytach zlokalizowanie BNIP3 w błonie mitochondrium powoduje uwolnienie cytochromu c, aktywację kaspaz i apoptozę [32],
- w neuronach aktywacja BNIP3 jest związana z uwolnieniem endonukleazy G, ale nie cytochromu c, przez co komórki giną na drodze niezależnej od kaspaz [44],
- w komórkach nabłonkowych BNIP3 nie powoduje uwolnienia z mitochondriów żadnych białek, przez co nie aktywuje również kaspaz, ale wywołuje spadek potencjału mitochondrialnego i śmierć komórek przypominającą w przebiegu nekrozę [35].

W kardiomiocytach możliwe jest także równoczesne wystąpienie cech nekrozy, apoptozy i autofagii [10]. Oprócz tego, typ śmierci komórki indukowanej za pośrednictwem BNIP3 może zależeć od poziomu jego ekspresji, interakcji z białkami rodziny Bcl-2 i innymi oraz od kondycji mitochondriów, związanej bezpośrednio z potencjałem błony mitochondrialnej [30].

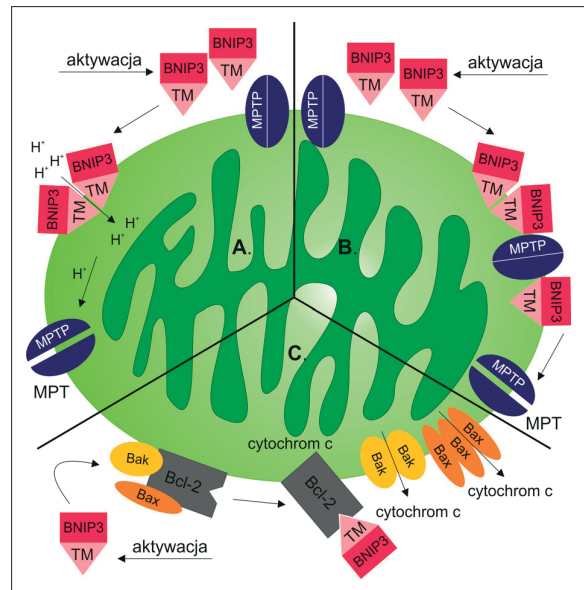
Mechanizm śmierci uruchamiany w odpowiedzi na hipoksję nie jest w pełni poznany, ponieważ notowano zarówno przypadki apoptozy, nekrozy, jak i autofagii [4]. BNIP3 do pełnej aktywacji programu śmierci wymaga często udziału dodatkowych czynników, będących następstwem hipoksji, np. niedostatków glukozy, zakwaszenia, czy braku czynników wzrostowych [29]. Może to być przyczyną zróżnicowania mechanizmów prowadzących do śmierci komórki po aktywacji BNIP3.

Dyskusyjne jest czy BNIP3 do swojej aktywności proapoptycznej wymaga białek efektorowych Bax i Bak, tak jak pozostałe białka BOP. Badania na mysich fibroblastach embrionalnych (mouse embryonal fibroblasts – MEFs) wykazały, że delekcja Bax i Bak powoduje oporność na śmierć indukowaną hipoksją, mimo wyraźnego wzrostu poziomu BNIP3. Podobnie dzieje się w przypadku komórek MEF Bax<sup>-/-</sup>/Bak<sup>-/-</sup> z wymuszoną nadekspresją BNIP3 w warunkach normoksji, podczas gdy prawidłowe komórki wytwarzające zwiększoną ilość BNIP3 giną z powodu utraty potencjału mitochondrialnego. Według autorów tych badań białka Bax i Bak uczestniczą zarówno w śmierci kaspazozależnej, jak i niezależnej, indukowanej przez BNIP3 [24].

Istnieją jednak inne możliwe mechanizmy permeabilizacji błony mitochondrialnej przez BNIP3 prowadzące do utraty potencjału (ryc. 2).

Oprócz interakcji z Bax i Bak, może to być bezpośrednie oddziaływanie na tzw. megakanały (mitochondrial permeability transition pores – MPTP) [42], zlokalizowane w miejscach połączenia wewnętrznej i zewnętrznej błony mitochondrialnej [21], lub ich pośrednia aktywacja poprzez zwiększenie pobierania wapnia przez mitochondria. Innym potencjalnym mechanizmem jest tworzenie przez dimery BNIP3 kanałów w zewnętrznej błonie mitochondriów [42], co wynika ze wspomnianych wyżej właściwości domeny TM.

BNIP3 pełni bardzo istotną rolę w komórkach mięśnia sercowego. W kardiomiocytach, w których wystąpił tzw. zespół poreperfuzyjny (ischemia/reperfusion – I/R), czyli skutki przywrócenia krążenia, obserwuje się wzrost aktywności BNIP3 związany ze wzrostem wytwarzania reaktywnych form tlenu (reactive oxygen species – ROS), zakwaszeniem



Ryc. 2. Potencjalne mechanizmy permeabilizacji błony mitochondrialnej przez BNIP3. **A** – po aktywacji BNIP3 wbudowuje się w błonę mitochondrium z udziałem domeny transmembranowej, gdzie dimeryzuje, tworząc kanał protonowy. Wnikające do przestrzeni międzybłonowej jony wodoru powodują spadek potencjału błonowego i otwarcie megakanałów (MPTP); **B** – aktywowany BNIP3 wbudowuje się w błonę mitochondrialną i oddziałuje bezpośrednio na kompleks MPTP w postaci monomeru lub dimeru, powodując jego otwarcie; **C** – aktywacja BNIP3 powoduje jego związanie z białkiem Bcl-2 i oddysocjowanie białek Bax i/lub Bak. Wbudowanie się białek efektorowych w błonę mitochondrialną prowadzi do uwolnienia cytochromu c do cytoplazmy

cytoplazmy [19] i spadkiem wytwarzania ATP, co ostatecznie prowadzi do śmierci komórek. Stanowi to potwierdzenie tezy, że hipoksja sama w sobie nie musi być dla komórek stresem letalnym [37]. Trudno jednoznacznie określić, jaki charakter ma śmierć kardiomiocytów następująca w odpowiedzi na I/R. Z części badań wynika, że zachodzi ona na drodze zależnej od cytochromu c, białka AIF i kaspaz [19], jednak inne badania wskazują, że możliwa jest także śmierć kaspazozależna [23]. Oprócz tego, w szczurzych komórkach mięśnia sercowego poddanych I/R zaobserwowano autofagię, podobnie jak w komórkach poddanych chronicznemu niedokrwieniu. Autofagia może wynikać z uruchomienia w komórce mechanizmów, mających na celu usunięcie uszkodzonych przez BNIP3 mitochondriów, a przez to ograniczenie wpływu czynników proapoptycznych i zapobieganie apoptozie [19]. W autofagosomach indukowanych aktywacją BNIP3 często obserwuje się zdegradowane mitochondria [18]. Wiadomo także, że w rejonach nasilonej autofagii obniża się częstotliwość apoptozy, tym samym autofagię można uznać za mechanizm chroniący miocyty przed śmiercią i przed uszkodzeniami mięśnia sercowego po wystąpieniu I/R. Podobny efekt można uzyskać hamując całkowicie aktywność BNIP3 [19]. Rola tego białka dla komórek mięśnia sercowego jest zatem dwoista.

### 3.1. Apoptoza

BNIP3 może potencjalnie indukować apoptozę co najmniej na dwa sposoby. Po pierwsze, działając jak klasyczne biał-

ko BOP, tj. powodując neutralizację białek antyapoptotycznych rodziny Bcl-2 poprzez heterodimeryzację za pośrednictwem ich domeny BH3. BNIP3 najprawdopodobniej jednak nie oddziałuje z Bcl-2 czy Bcl-X<sub>L</sub> za pośrednictwem własnej domeny BH3, ale za pośrednictwem domeny transmembranowej [31], co nie jest typowe dla białek grupy BOP. Niemniej jednak, BNIP3 może w mysich embrionalnych fibroblastach poddanych działaniu hipoksji powodować uwolnienie i/lub aktywację białek efektorowych Bax i Bak, pośrednio indukując wypływ cytochromu c z mitochondriów i apoptozę [24], co świadczy o jego przynajmniej częściowym podobieństwie do innych białek BOP (ryc. 2C). Po drugie, BNIP3 może powodować uwolnienie cytochromu c, bezpośrednio oddziałując na błonę mitochondrium. Przykładem są embrionalne komórki kory mózgowej szczura traktowane cyjankiem potasu w krótkotrwałej hodowli *in vitro*, w celu uzyskania warunków naśladujących hipoksję. Wrażliwość komórek kory na cyjanek koreluje z poziomem białka BNIP3. Ponadto, transfekcja komórek cDNA genu *bnip3* i wynikająca z niej nadekspresja białka powoduje wzmocnienie tego efektu. Badane komórki giną na drodze zależnej od kaspaz. Czynnikiem inicjującym szlak BNIP3 w warunkach normoksji może być wywołany przez cyjanek stres oksydacyjny [30].

### 3.2 Autofagia

Funkcją autofagii jest zasadniczo ochrona komórki przed skutkami niedoboru składników odżywczych lub gromadzenia się nadmiaru długo żyjących białek i uszkodzonych organelli w cytoplazmie i jako taka jest procesem sprzyjającym przeżyciu komórki. Jednak w pewnych warunkach może służyć również eliminacji komórek, jest wtedy określana jako programowana śmierć komórkowa typu 2 [28]. U ssaków, proces autofagii jest związany z nowotworami, kardiomiopatią, starzeniem i innymi stanami patologicznymi [12].

Choć zależności między białkiem BNIP3 a autofagią były wielokrotnie obserwowane, jego rola w tym procesie jest bardzo niejasna. Część autorów uważa, że BNIP3 ma zdolność indukcji autofagii, ponieważ jego nadekspresja powoduje masowy wzrost intensywności tego procesu [24], np. w komórkach glejaka czy w komórkach embrionalnych. Jednakże ekspresja BNIP3 następuje relatywnie późno w czasie autofagii indukowanej hipoksją w porównaniu z formowaniem się autofagosomów [4]. Z kolei wyciszenie ekspresji BNIP3 hamuje autofagię indukowaną hipoksją i śmierć komórek, ale nie hamuje kolokalizacji LC3 (najlepiej scharakteryzowanego markera autofagii) i autofagosomów. Sugeruje to raczej, że BNIP3 jest zaangażowany w jeden z pośrednich etapów procesu autofagii [10], ale nie jest jej induktorem. Przypuszcza się, że BNIP3 może być zaangażowany w fuzję lizosomów z autofagosomami. Do pełnienia tej funkcji w czasie autofagii niezbędna jest domena TM białka BNIP3 [4].

Poza hipoksją, również ceramid C2 może indukować śmierć komórek glejaka, która nie wykazuje cech apoptozy (kondensacja i fragmentacja chromatyny), ale następuje na skutek wzmoczonej autofagii – w komórkach widoczna jest silna wakuolizacja cytoplazmy i akumulacja na błonach wakuol białka LC3. Równocześnie udowodniono, że traktowanie komórek glejaka ceramidem C2 powoduje utratę potencjału

mitochondrialnego na drodze zależnej od BNIP3. Wzrost poziomu białka BNIP3 w komórkach traktowanych ceramidem odbywa się na drodze transkrypcyjnej. Podobny rezultat, tj. śmierć komórek glejaka na drodze autofagii daje nadekspresja BNIP3 [14]. Badania te również nie wyjaśniają mechanizmu wiążącego BNIP3 z autofagią.

Zdaniem Chena i wsp. [12] autofagia indukowana hipoksją jest początkowo procesem adaptacyjnym, służącym ochronie komórki przed skutkami stresu. W tym celu aktywowany jest szlak PKC $\delta$ /JNK1 – aktywacja JNK1 (c-Jun N-terminal protein kinase) prowadzi prawdopodobnie do fosforylacji Bcl-2 i dysocjacji bekliny 1 lub zahamowania aktywności białka mTOR (mammalian target of rapamycin), co w obu przypadkach powoduje inicjację autofagii. Przedłużająca się aktywność szlaku PKC $\delta$ /JNK1, wynikająca z długotrwałej hipoksji, prowadzi w końcu do aktywacji HIF-1 i BNIP3, a tym samym do śmierci komórki. Autorzy sugerują, że jest to wywołane nagromadzeniem reaktywnych form tlenu w komórce [12].

Zastanawiające jest, dlaczego HIF-1, uważany za czynnik sprzyjający przeżyciu komórki, indukuje transkrypcję proapoptotycznego białka BNIP3. Zaproponowano hipotezę, według której BNIP3 wraz z jego homologiem BNIP3L, jest częścią proprzeżyciowej odpowiedzi na hipoksję, zależnej od HIF-1. Wykazano, że obniżenie poziomu BNIP3 i BNIP3L znacząco hamuje przekształcanie białka LC3 do postaci LC3II, która jest markerem autofagii i przyspiesza śmierć komórek w czasie hipoksji. Zahamowanie ekspresji każdego z tych białek z osobną powodowało częściową supresję autofagii, a jednocześnie brak obydwu powodował całkowite zablokowanie tego procesu, zarówno w komórkach prawidłowych, jak i nowotworowych. W warunkach normoksji wymuszona ekspresja obydwu białek była czynnikiem wystarczającym do indukcji autofagii. Tym samym można stwierdzić, że hipoksja nie indukuje śmierci komórki, ale prowadzi do uruchomienia mechanizmów obronnych. Ponieważ autofagia jest kontrolowana poprzez interakcję bekliny 1 z Bcl-2, mechanizm indukcji autofagii może polegać na osłabieniu tej interakcji. Dowiedziono, że białka BNIP3 i BNIP3L powodują oddysocjowanie bekliny 1 od Bcl-2 w warunkach hipoksji na skutek konkurencji o wiązanie Bcl-2 za pośrednictwem domeny BH3 białek BNIP [5]. Ponieważ, według autorów opisanych wcześniej badań [4], w zależności pomiędzy BNIP3 a autofagią zaangażowana jest domena TM BNIP3, możliwe jest istnienie dwóch różnych, całkowicie niezależnych mechanizmów, których aktywacja może dawać odmienny skutek.

Interakcja między BNIP3 a Bcl-2 w celu uwolnienia bekliny 1 i indukcji autofagii wydaje się mieć znaczenie również w procesie kontroli liczby mitochondriów, który jest zależny od HIF-1 i zachodzi zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w czasie hipoksji. W warunkach niedoboru tlenu redukcja liczby mitochondriów, a tym samym intensywności oddychania tlenowego i wytwarzania energii, zależą od ekspresji BNIP3, przy czym jego obecność jest wystarczająca do zajścia tych procesów. Hipoksja, za pośrednictwem BNIP3, może selektywnie indukować autofagię mitochondriów, ale nie retikulum endoplazmatycznego. Autofagia jest w tym wypadku procesem adaptacyjnym, a ewentualna śmierć komórki rezultatem jej niepowodzenia [41].

Oprócz przedstawionych wyżej modeli, istnieje jeszcze jeden opisujący związek BNIP3 z autofagią, według którego BNIP3 hamuje autofagię wiążąc białko Rheb, będące aktywatorem mTOR [10]. Model ten jest jednak w opozycji do pozostałych, które opisują dodatnią korelację między poziomem BNIP3 a intensywnością autofagii.

### 3.3. Nekroza

BNIP3 może także indukować śmierć komórki, która w przebiegu przypomina nekrozę i jest niezależna od kaspaz [39], białka Apaf-1 i cytochromu c. Ten rodzaj śmierci ('necrosis-like cell death') następuje w wyniku permeabilizacji błony mitochondrium, co prowadzi do utraty potencjału mitochondrialnego i wytwarzania reaktywnych form tlenu. W wyniku tego następuje szybka utrata integralności błony komórkowej, która w czasie poprzedza fragmentację DNA. Charakterystyczna dla komórek ginących w ten sposób jest również znacząca wakuolizacja cytoplazmy [35].

Utrata potencjału mitochondrialnego i wytwarzanie ROS może być zarówno przyczyną, jak i rezultatem otwarcia megakanalów, w zależności od sygnału indukującego śmierć komórki. Aktywowany BNIP3 może oddziaływać bezpośrednio na elementy kompleksu MPTP, powodując jego otwarcie lub też wpływać na inne białko błony, co spowoduje utratę potencjału i wytwarzanie ROS oraz wtórne otwarcie kanałów MPTP [35]. Hipotetycznie, także sama inkorporacja BNIP3 do błony mitochondrialnej może podnosić jej przepuszczalność, powodując spadek pH w przestrzeni międzłononowej mitochondrium na skutek wpływu protonów z cytosolu. To z kolei może prowadzić do hiperpolaryzacji wewnętrznej błony mitochondrialnej, otwarcia megakanalów i śmierci na drodze 'necrosis-like' [6] (ryc. 2A).

Śmierć aktywowanych limfocytów T (activation-induced cell death – AICD) przypomina w przebiegu nekrozę, ponieważ nie jest zależna od kaspaz, a charakteryzuje się wzrostem wytwarzania ROS i szybką utratą potencjału mitochondrialnego [36]. Aktywowane komórki T są eliminowane z krwiobiegu przez trombospondynę 1 (TSP-1), oddziałującą z receptorem CD47, który z kolei aktywuje BNIP3. Nie dotyczy to spoczynkowych limfocytów T. Interakcja ta ma znaczenie w wygaszaniu reakcji zapalnej [26]. U myszy CD47<sup>-/-</sup> obserwowano spowolnione ustępowanie stanu zapalnego wywołanego oksazolonom, co było spowodowane defektami programowanej śmierci komórek T. Aktywacja CD47 przez TSP-1 może powodować szybką i kaspazonie niezależną śmierć komórek *in vitro*. W stanie spoczynku limfocytów T BNIP3 jest fizycznie związany z CD47; po inicjacji śmierci komórkowej, zostaje przeniesiony na mitochondria, gdzie powoduje ich dysfunkcję. W limfocytach T stymulacja receptora TCR/CD3 indukuje ekspresję BNIP3, dzięki czemu aktywowane limfocyty stają się wrażliwe na śmierć. Interakcja z CD47 pozwala również na ochronę BNIP3 przed degradacją proteasomalną i wspomaga jego akumulację. Śmierć aktywowanych limfocytów T u myszy CD47<sup>-/-</sup>, która ostatecznie po długim czasie powoduje zanik stanu zapalnego, następuje wskutek powolnej akumulacji BNIP3 na błonach mitochondrialnych [25].

Wykazano również, że BNIP3 może pośredniczyć w śmierci komórkowej wykazującej równocześnie cechy apoptozy i nekrozy, np. wczesną ekspozycję fosfatydyloseryny,

ale brak uwalniania cytochromu c i aktywacji kaspaz [26]. Łącznie dane te wskazują, że z całą pewnością nie istnieje pojedynczy mechanizm indukcji śmierci komórkowej przez BNIP3, a zależy on zarówno od typu komórki, jak i warunków wewnątrz i na zewnątrz komórki.

### 3.4. Aktywność antyapoptotyczna

W ostatnim czasie odkryto nową i zaskakującą funkcję białka BNIP3, związaną z programowaną śmiercią komórki. W prawidłowych astrocytach BNIP3 jest umiejscowiony w jądrze, co ma na celu zapobieganie jego translokacji na mitochondria i indukcji śmierci komórki w warunkach fizjologicznych. Podobne zjawisko obserwuje się w komórkach linii U251 pochodzącej z glejaka, dzięki czemu komórki nowotworowe zyskują oporność na śmierć indukowaną hipoksją [11], jak i temozolomidem (TMZ) [9]. Początkowo sądzono, że jest to jedynie prosty mechanizm, polegający na sekwestracji białka, zapobiegający wiązaniu się BNIP3 z błoną mitochondrium. Okazało się jednak, że BNIP3 nie tylko nie ma możliwości indukcji śmierci komórek glejaka, ale bierze również czynny udział w jej zapobieganiu dzięki zdolności wiązania DNA. Udało się potwierdzić, że BNIP3 swoiście wiąże się do promotora genu czynnika AIF (apoptosis-inducing factor), indukującego kaspazonie niezależną śmierć komórkową, i powoduje represję jego transkrypcji. BNIP3 tworzy w jądrze komórek glejaka kompleks z PSF (PTB-associated splicing factor) oraz deacetylazą histonów HDAC1 (histone deacetylase 1), która zmieniając stopień kondensacji chromatyny w pobliżu promotora genu AIF zapobiega jego ekspresji. Tym samym rola BNIP3 w hamowaniu transkrypcji genu AIF polega najprawdopodobniej na rekrutacji deacetylazy HDAC1. W opisanych badaniach ukazano nową, antyapoptotyczną właściwość BNIP3, dzięki której komórki nowotworowe uzyskują oporność na chemioterapeutyki [9].

## 4. PODSUMOWANIE

Białka rodziny Bcl-2 sklasyfikowano na podstawie ich struktury, która determinuje funkcje. Choć BNIP3, mimo odmiennego pochodzenia, strukturalnie przypomina pozostałe białka BOP, to jednak mechanizm jego działania i znaczenie dla komórki wydają się go wyróżniać. Większość białek grupy 'BH3-only' pełni funkcje pomocnicze – przekazuje sygnały proapoptotyczne i aktywuje białka efektorowe. BNIP3 może indukować śmierć komórki bez udziału innych białek, oddziałując bezpośrednio na błonę mitochondrialną. To wskazywałoby, że jest on raczej białkiem efektorowym, a nie pomocniczym.

BNIP3 może aktywować nie tylko apoptozę, ale i inne programy śmierci. Co więcej, nie jest jasne, czy autofagia, w której indukcji uczestniczy to białko, ma na celu spowodowanie śmierci komórki, czy przeciwnie – jej zapobieganie. Być może dysfunkcja mitochondriów, wywołana przez BNIP3, indukuje tzw. mitofagię, czyli rodzaj autofagii mający na celu usunięcie uszkodzonych organelli i zapobieganie aktywacji szlaku śmierci [28]. Dodatkowo, proces ten pozwala na odzyskanie części 'unieruchomionych' w organellach komponentów, niezbędnych do adaptacji do niekorzystnych warunków, np. aminokwasów czy kwasów tłuszczowych [20]. BNIP3 może być zatem nie tyle egzekutorem PCD, co raczej 'ostatnią deską ra-

tunku' komórki przed śmiercią. W przypadku kardiomyocytów, narażonych na reperfuzję po wcześniejszym niedokrwieniu, BNIP3 wydaje się pełnić właśnie funkcję ochronną. Mechanizm regulacji transkrypcji BNIP3 angażujący białko Rb (patrz część II), ma prawdopodobnie na celu utrzymanie takiego poziomu BNIP3, który pozwoli na aktywację autofagii, ale nie spowoduje śmierci komórki. Sugeruje to, że w pewnych określonych warunkach, białko to może wykazywać również działanie antyapoptotyczne, co potwierdza odkryta niedawno funkcja BNIP3 jako represora transkrypcji czynnika proapoptycznego AIF.

Mnogość mechanizmów charakteryzujących działanie BNIP3 oraz ich odmiennosc w porównaniu z pozostałymi białkami BOP nakazują postawić pytanie, czy obecny podział białek Bcl-2 nie jest zbyt uproszczony. Choć wiedza na temat białka BNIP3 jest wciąż bardzo skromna, wydaje się, że jego charakterystyka znacznie wykracza poza ramy wyznaczone białkom BOP.

\*\*\*

Składamy podziękowania dr. Wojciechowi Kałasowi za wszelkie uwagi i rady pomocne w przygotowaniu niniejszej pracy.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Adams J.M., Cory S.: Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr. Opin. Immunol.*, 2007; 19: 488–496
- [2] An H., Maeng O., Kang K., Lee J., Kim Y., Paik S., Lee H.: Activation of Ras up-regulates pro-apoptotic BNIP3 in nitric oxide-induced cell death. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 33939–33948
- [3] Aouacheria A., Brunet F., Gouy M.: Phylogenomics of life-or-death switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-Only, and Bnip families of apoptotic regulators. *Mol. Biol. Evol.*, 2005; 22: 2395–2416
- [4] Azad M.B., Chen Y., Henson E.S., Cizeau J., McMillan-Ward E., Israels S.J., Gibson S.B.: Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3. *Autophagy*, 2008; 4: 195–204
- [5] Bellot G., Garcia-Medina R., Gounon P., Chiche J., Roux D., Pouyssegur J., Mazure N.M.: Hypoxia-induced Autophagy is mediated through HIF-induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3-domains. *Mol. Cell. Biol.*, 2009; 29: 2570–2581
- [6] Bocharov E.V., Pustovalova Y.E., Pavlov K.V., Volynsky P.E., Goncharuk M.V., Ermolyuk Y.S., Karpunin D.V., Schulga A.A., Kirpichnikov M.P., Efremov R.G., Maslennikov I.V., Arseniev A.S.: Unique dimeric structure of BNIP3 transmembrane domain suggests membrane permeabilization as a cell death trigger. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 16256–16266
- [7] Bras M., Queenan B., Susin S.A.: Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry Mosc.*, 2005; 70: 231–239
- [8] Bröker L.E., Krut F.A.E., Giaccone G.: Cell death independent of caspases: a review. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 3155–3162
- [9] Burton T.R., Eisenstat D.D., Gibson S.B.: BNIP3 (Bcl-2 19 kDa interacting protein) acts as transcriptional repressor of apoptosis-inducing factor expression preventing cell death in human malignant gliomas. *J. Neurosci.*, 2009; 29: 4189–4199
- [10] Burton T.R., Gibson S.B.: The role of Bcl-2 family member BNIP3 in cell death and disease: NIPPING at the heels of cell death. *Cell Death Differ.*, 2009; 16: 515–523
- [11] Burton T.R., Henson E.S., Baijal P., Eisenstat D.D., Gibson S.B.: The pro-cell death Bcl-2 family member, BNIP3, is localized to the nucleus of human gliial cells: Implications for glioblastoma multiforme tumor cell survival under hypoxia. *Int. J. Cancer*, 2006; 118: 1660–1669
- [12] Chen J., Lin H.H., Kim K., Lin A., Forman H.J., Ann D.K.: Novel roles for protein kinase Cdelta-dependent signaling pathways in acute hypoxic stress-induced autophagy. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 34432–34444
- [13] Chipuk J.E., Green D.R.: How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol.*, 2008; 18: 157–164
- [14] Daido S., Kanzawa T., Yamamoto A., Takeuchi H., Kondo Y., Kondo S.: Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res.*, 2004; 64: 4286–4293
- [15] Fink S.L., Cookson B.T.: Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.*, 2005; 73: 1907–1916
- [16] Golstein P., Kroemer G.: Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.*, 2007; 32: 37–43
- [17] Häcker G., Weber A.: BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007; 462: 150–155
- [18] Hamacher-Brady A., Brady N.R., Gottlieb R.A., Gustafsson A.B.: Autophagy as a protective response to Bnip3-mediated apoptotic signaling in the heart. *Autophagy*, 2006; 2: 307–309
- [19] Hamacher-Brady A., Brady N.R., Logue S.E., Sayen M.R., Jinno M., Kirshenbaum L.A., Gottlieb R.A., Gustafsson A.B.: Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death Differ.*, 2007; 14: 146–157
- [20] Hippert M.M., O'Toole P.S., Thorburn A.: Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer Res.*, 2006; 66: 9349–9351
- [21] Kim J., Cho J., Ha J., Park J.: The carboxy terminal C-tail of BNIP3 is crucial in induction of mitochondrial permeability transition in isolated mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2002; 398: 147–152
- [22] Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C.: Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.*, 2007; 87: 99–163
- [23] Kubasiak L.A., Hernandez O.M., Bishopric N.H., Webster K.A.: Hypoxia and acidosis activate cardiac myocyte death through the Bcl-2 family protein BNIP3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 12825–12830
- [24] Kubli D.A., Ycaza J.E., Gustafsson A.B.: Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak. *Biochem. J.*, 2007; 405: 407–415
- [25] Lamy L., Foussat A., Brown E.J., Bornstein P., Ticchioni M., Bernard A.: Interactions between CD47 and thrombospondin reduce inflammation. *J. Immunol.*, 2007; 178: 5930–5939
- [26] Lamy L., Ticchioni M., Rouquette-Jazdanian A.K., Samson M., Deckert M., Greenberg A.H., Bernard A.: CD47 and the 19 kDa interacting protein-3 (BNIP3) in T cell apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 23915–23921
- [27] Lee H., Paik S.: Regulation of BNIP3 in normal and cancer cells. *Mol. Cells*, 2006; 21: 1–6
- [28] Maiuri M.C., Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G.: Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007; 8: 741–752
- [29] Mellor H.R., Harris A.L.: The role of the hypoxia-inducible BH3-only proteins BNIP3 and BNIP3L in cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, 2007; 26: 553–566
- [30] Prabhakaran K., Li L., Zhang L., Borowitz J.L., Isom G.E.: Upregulation of BNIP3 and translocation to mitochondria mediates cyanide-induced apoptosis in cortical cells. *Neuroscience*, 2007; 150: 159–167
- [31] Ray R., Chen G., Vande Velde C., Cizeau J., Park J.H., Reed J.C., Gietz R.D., Greenberg A.H.: BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 1439–1448
- [32] Regula K.M., Ens K., Kirshenbaum L.A.: Inducible expression of BNIP3 provokes mitochondrial defects and hypoxia-mediated cell death of ventricular myocytes. *Circ. Res.*, 2002; 91: 226–231
- [33] Ricci M.S., Zong W.: Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist*, 2006; 11: 342–357
- [34] Sulistijo E.S., Jaszewski T.M., MacKenzie K.R.: Sequence-specific dimerization of the transmembrane domain of the "BH3-only" protein BNIP3 in membranes and detergent. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 51950–51956
- [35] Vande Velde C., Cizeau J., Dubik D., Alimonti J., Brown T., Israels S., Hakem R., Greenberg A.H.: BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol. Cell. Biol.*, 2000; 20: 5454–5468
- [36] Wan J., Martinvalet D., Ji X., Lois C., Kaech S.M., Von Andrian U.H., Lieberman J., Ahmed R., Manjunath N.: The Bcl-2 family pro-apoptotic molecule, BNIP3 regulates activation-induced cell death of effector cytotoxic T lymphocytes. *Immunology*, 2003; 110: 10–17



- [37] Webster K.A., Graham R.M., Bishopric N.H.: BNIP3 and signal-specific programmed death in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2005; 38: 35–45
- [38] Willis S.N., Adams J.M.: Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2005; 17: 617–625
- [39] Yan J., Yun H., Yang Y., Jing B., Feng C., Song-bin F.: Upregulation of BNIP3 promotes apoptosis of lung cancer cells that were induced by p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006; 346: 501–507
- [40] Yasuda M., Theodorakis P., Subramanian T., Chinnadurai G.: Adenovirus E1B-19K/BCL-2 interacting protein BNIP3 contains a BH3 domain and a mitochondrial targeting sequence. *J. Biol. Chem.*, 273: 1998; 12415–12421
- [41] Zhang H., Bosch-Marce M., Shimoda L.A., Tan Y.S., Baek J.H., Wesley J.B., Gonzalez F.J., Semenza G.L.: Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 10892–10903
- [42] Zhang J., Ney P.A.: Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ.*, 2009, 16, 939–946
- [43] Zhang L., Ming L., Yu J.: BH3 mimetics to improve cancer therapy: mechanisms and examples. *Drug Resist. Updat.*, 2007; 10: 207–217
- [44] Zhang Z., Yang X., Zhang S., Ma X., Kong J.: BNIP3 upregulation and EndoG translocation in delayed neuronal death in stroke and in hypoxia. *Stroke*, 2007; 38: 1606–1613
- [45] Ziegler U., Groscurth P.: Morphological features of cell death. *News Physiol. Sci.*, 2004; 19: 124–128
- [46] Zong W.X., Lindsten T., Ross A.J., MacGregor G.R., Thompson C.B.: BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev.*, 2001; 15: 1481–1486

---

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.