

Received: 2009.06.10
Accepted: 2009.08.31
Published: 2009.09.10

BNIP3 jako nietypowy przedstawiciel rodziny Bcl-2. Część 2: Regulacja ekspresji i aktywności BNIP3 oraz jego rola w chorobie nowotworowej*

BNIP3 as an atypical representative of the Bcl-2 protein family. Part 2: Regulation of the expression and activity of BNIP3 protein and its role in tumorigenesis

Ewelina Swoboda, Leon Strządała

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

Streszczenie

BNIP3 należy do rodziny białek Bcl-2, których funkcją jest regulacja programowanej śmierci komórki. Jest to jedyne znane białko proapoptotyczne ulegające ekspresji w czasie hipoksji, co jest uwarunkowane obecnością w promotorze jego genu elementu odpowiedzi na czynnik transkrypcyjny HIF-1. Wyniki badań wskazują jednak, że hipoksja prawdopodobnie nie jest czynnikiem wystarczającym do aktywacji BNIP3, a ewentualna śmierć komórki zależna od tego białka następuje dopiero na skutek wtórnych efektów niedoboru tlenu, m.in. zakwaszenia. Ekspresja białka BNIP3 w warunkach hipoksji jest także regulowana przez inne czynniki, takie jak E2F-1, NF-κB i Rb oraz w warunkach normoksji, np. przez tlenek azotu. Zasadniczymi dla aktywności BNIP3 są również modyfikacje potranslacyjne, jednak ich znaczenie jest ciągle niejasne. Fosforylacja BNIP3 przez PKC sprzyja jego akumulacji pod wpływem hipoksji, z kolei fosforylacja przez CK2 ma znaczenie dla degradacji tego białka. Ponadto, aktywność BNIP3 może być modulowana przez glikozylację, czy interakcje z białkami antyapoptotycznymi rodziny Bcl-2. BNIP3, jako białko regulujące programowaną śmierć komórki, jest istotne w progresji chorób nowotworowych. Wydaje się, że jego rola w tym procesie jest uzależniona od stadium choroby. Komórki nowotworowe wykształciły wiele mechanizmów wyciszania ekspresji lub aktywności białka BNIP3, wśród których jednym z najczęściej obserwowanych jest metylacja promotora jego genu.

Słowa kluczowe:

BNIP3 • HIF-1 • E2F-1 • Rb • hipoksja • progresja nowotworowa • regulacja programowanej śmierci komórki

Summary

BNIP3 belongs to the Bcl-2 protein family that regulates programmed cell death. It is the only known pro-apoptotic protein expressed during hypoxia and this effect is determined by the HIF-1 responsive element in the bnip3 promoter. However, there is evidence that hypoxia is not a sufficient factor to activate BNIP3; possible cell death dependent on this protein occurs as a result of secondary effects of oxygen deprivation, such as acidosis. BNIP3 expression is also regulated by

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

other factors, such as E2F-1, NF- κ B, and Rb during hypoxia and nitrogen oxide during normoxia. Posttranslational modifications also seem to be essential for BNIP3 activity, but their actual significance is still unclear. Phosphorylation of BNIP3 by PKC promotes its accumulation under hypoxic conditions, but phosphorylation by CK2 can accelerate its degradation. In turn, glycosylation and interactions with anti-apoptotic Bcl-2 proteins suppress BNIP3 activity. Our knowledge about the role of BNIP3 protein in tumor progression is incomplete. It seems to be dependent on the stage of tumor progression. Tumor cells evolved multiple mechanisms of silencing BNIP3 expression or activity and promoter methylation is one of the most frequently observed among them.

Key words: BNIP3 • HIF-1 • E2F-1 • Rb • hypoxia • tumor progression • regulation of programmed

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=894144>

Word count: 2949

Tables: –

Figures: 2

References: 28

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: **BNIP3** – białko wiążące Bcl-2 i adenowirusowe białko E1B-19kDa 3 (Bcl-2/adenovirus E1B-19kDa interacting protein 3); **BOP** – białka mające wyłącznie domenę BH3 (BH3-only proteins); **CIP** – cieleca fosfataza alkaliczna (calf intestinal alkaline phosphatase); **CK2** – kinaza kazeinowa 2 (casein kinase-2); **EGF** – naskórkowy czynnik wzrostu (epidermal growth factor); **HIF-1** – czynnik indukowany hipoksją 1 (hypoxia-inducible factor-1); **HRE** – element odpowiedzi na hipoksję (hypoxia-responsive element); **iNOS** – indukowalna syntaza tlenu azotu (inducible nitric oxide synthase); **NF- κ B** – czynnik jądrowy κ B (nuclear factor κ B); **NO** – tlenek azotu (nitric oxide); **PCD** – programowana śmierć komórki (programmed cell death); **PKC** – kinaza białkowa C (protein kinase C); **PLAGL-2** – pleomorphic adenoma gene-like 2; **Rb** – (białko) retinoblastoma (retinoblastoma protein); **ROS** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species).

W wyniku aktywacji białek BOP (BH3-only proteins), w tym BNIP3 (Bcl-2/adenovirus E1B-19 kDa interacting protein 3), może dojść do indukcji śmierci komórki, dlatego ich aktywność musi być regulowana ze szczególną precyzją. Zarówno nadmiar, jak i niedostatek któregoś z tych białek jest potencjalnie niebezpieczny dla komórki i całego organizmu. Znanych jest wiele mechanizmów regulacji ekspresji i funkcji białek BOP, w tym m.in. indukcja transkrypcji, stabilizacja białka, fosforylacja [22], czy cięcie proteolityczne [8]. Aktywność BNIP3 również jest regulowana na kilku poziomach, choć wielu autorów podkreśla, że najważniejszym mechanizmem jest regulacja transkrypcji. Zauważono, że poziom białka najczęściej koreluje z poziomem mRNA [24].

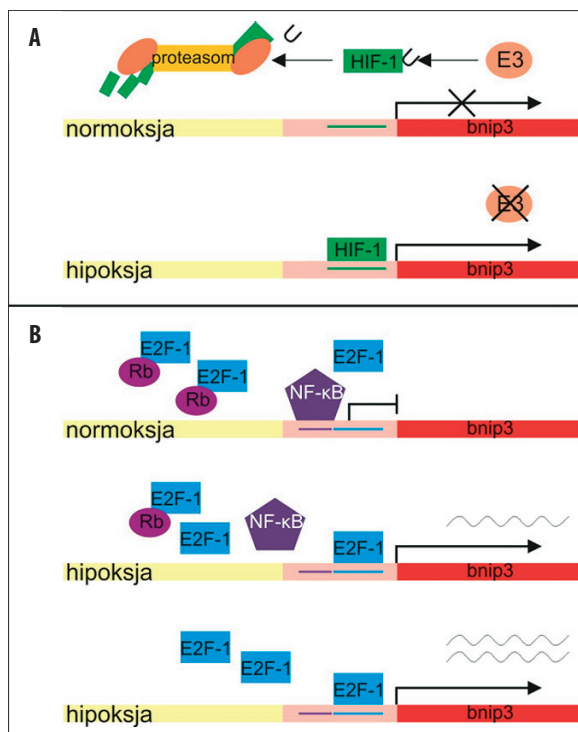
1. REGULACJA TRANSKRYPCJI ZALEŻNA OD HIPOKSJI

HIF-1

W promotorze genu *bnip3* znajdują się dwa miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1; HRE, hypoxia-responsive element) [28], który jest podstawowym regulatorem transkrypcji genów odpowiedzi na hipoksję, związanych głównie z erytropoezą, angiogenezą, wytwarzaniem ATP, proliferacją i śmiercią [12].

Czynnik ten jest zaangażowany w utrzymanie homeostazy tlenowej w komórce, zapobiegając akumulacji reaktywnych form tlenu (reactive oxygen species – ROS), która mogłaby prowadzić do uszkodzenia białek, lipidów i kwasów nukleinowych i w efekcie do dysfunkcji komórki. HIF-1 reguluje również liczbę mitochondriów w komórce w warunkach fizjologicznych *in vivo* [27]. Ponadto, w pozycji -234 w stosunku do kodonu startowego genu *bnip3* znajduje się dodatkowe miejsce wiązania HIF-1, które jest odpowiedzialne za transaktywację promotora [28]. Podjednostka HIF-1 α w warunkach normoksji ulega konstytutywnej ubikwitynizacji i degradacji proteasomalnej. W czasie hipoksji ubikwitynizacja zostaje zahamowana, dzięki czemu poziom białka podnosi się [11] (ryc. 1A). Tym samym, po obniżeniu poziomu tlenu gen *bnip3* ulega szybkiej transkrypcji, po czym białko jest kierowane do mitochondrium i ulega insercji do jego zewnętrznej błony [16].

Mimo że hipoksja jest czynnikiem toksycznym, wśród komórek nowotworowych często obserwuje się procesy adaptacji do warunków niedoboru tlenu [1]. Jednym z mechanizmów może być nadekspresja HIF-1, związana ze stymulacją angiogenezy, zmianami metabolizmu wewnątrzkomórkowego oraz ze wzrostem stopnia inwazyjności nowotworu [11], co często obserwuje się np. w komórkach raka



Ryc. 1. Regulacja transkrypcji genu *bnip3* zależna od hipoksji. **A** – w warunkach normoksji podjednostka α czynnika transkrypcyjnego HIF-1 ulega konstytutywnej ubikwitynizacji i degradacji proteasomalnej, transkrypcja genu *bnip3* nie zachodzi. Po obniżeniu poziomu tlenu ubikwitynizacja HIF-1 α zostaje zahamowana, dzięki czemu czynnik ten wiąże się do promotora *bnip3* i inicjuje transkrypcję genu; E3 – ligaza ubikwityny; **B** – w czasie normoksji NF- κ B pozostaje związany z promotorem genu *bnip3* uniemożliwiając przyłączenie się czynnika transkrypcyjnego E2F-1 i inicjację transkrypcji. Dodatkowo, aktywność E2F-1 jest hamowana przez białko Rb. W warunkach hipoksji NF- κ B oddysocjuje od promotora, a białko Rb ulega stopniowej degradacji, umożliwiając tym samym inicjację transkrypcji genu *bnip3* przez E2F-1. Całkowity zanik negatywnej kontroli ze strony białka Rb powoduje wzrost poziomu transkrypcji

trzustki. Ponieważ BNIP3 jest genem proapoptocytynym i jego ekspresja jest niekorzystna dla komórek nowotworowych, jest ona wyciszana w wyniku metylacji promotora [1], który znajduje się w obrębie wyspy CpG. Metylacja promotora genu *bnip3* jest ograniczona wyłącznie do komórek nowotworowych, nie obserwuje się jej w sąsiadujących komórkach prawidłowych [12]. Powoduje to oporność komórek nowotworowych na śmierć indukowaną hipoksją [1]. Wyciszenie ekspresji BNIP3 na skutek metylacji występuje również w 66% przypadków pierwotnych guzów jelita grubego, 49% przypadków raka żołądka i 10–20% przypadków białaczek limfoblastycznych i szpikowych oraz szpiczaka mnogiego [2]. Wykazano, że proces ten można odwrócić traktując komórki 5-azacytydyną, która hamuje metylację, czego następstwem jest podniesienie poziomu białka BNIP3 [1].

E2F-1

Poza HIF-1 również inne czynniki regulują ekspresję BNIP3 w warunkach hipoksji (ryc. 1B).

Czynnik transkrypcyjny E2F-1 jest kluczowym regulatorem śmierci komórkowej o działaniu proapoptocytynym [25]. Promotor genu *bnip3*, w odróżnieniu od genów innych białek proapoptocytynych rodziny Bcl-2, zawiera element wiążący E2F-1 [18]. Udowodniono, że gen *bnip3* ulega transkrypcji po aktywacji E2F-1 w czasie hipoksji, a także w komórkach mięśnia sercowego z nadekspresją E2F-1. Prowadzi to do śmierci komórek, charakteryzującej się m.in. fragmentacją DNA, w której BNIP3 odgrywa główną rolę, ponieważ zahamowanie jego aktywności powoduje supresję apoptozy [25].

Ekspresja BNIP3 zależna od E2F-1 podlega złożonej regulacji negatywnej. W warunkach fizjologicznych komórka potrzebuje mechanizmów hamujących ekspresję BNIP3, aby uniknąć nieuzasadnionej inicjacji programu śmierci. Jednym z nich jest wiązanie czynnika E2F-1 przez białko Rb (retinoblastoma protein), uniemożliwiające jego przyłączenie się do promotora genu *bnip3* [18].

Zaproponowano hipotezę [21], według której rolę Rb w warunkach hipoksji jest utrzymanie poziomu BNIP3 w takim zakresie, który będzie stymulował autofagię, ale nie spowoduje śmierci komórki wskutek zbyt szybkiej degradacji jej organelli (w sytuacji, gdy białka BNIP3 jest za dużo), a jednocześnie nie dopuści do śmierci nekrotycznej spowodowanej hipoksją. Białko Rb hamuje również ekspresję BNIP3 zależną od HIF-1 [21].

E2F-1 i NF- κ B

W promotorze genu białka BNIP3 znajduje się również miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (nuclear factor κ B). E2F-1 i NF- κ B wpływają przeciwstawnie na los komórki – pierwszy jest czynnikiem pro-, drugi antyapoptocytynym. Również w kontekście ekspresji BNIP3 działają one antagonistycznie. Z jednej strony wykazano, że aktywacja NF- κ B znacznie redukuje wiązanie E2F-1 do promotora *bnip3*. Ze względu na bliskie położenie miejsc wiązania obu czynników prawdopodobne jest, że NF- κ B hamuje ekspresję *bnip3*, a tym samym śmierć komórki, poprzez zapobieganie rekrutacji czynnika E2F-1. Z drugiej strony nadekspresja E2F-1 również osłabia wiązanie NF- κ B do promotora *bnip3*. W komórkach z knock-outem genu NF- κ B, E2F-1 wiąże promotor *bnip3* nawet w warunkach fizjologicznych. Oznacza to, że zapobieganie ekspresji BNIP3 poprzez NF- κ B jest mechanizmem chroniącym komórki przed nieuzasadnioną aktywacją białka proapoptocytynego. W prawidłowych komórkach derepresja promotora *bnip3* i wiązanie czynnika E2F-1 następuje dopiero po obniżeniu poziomu tlenu [18].

Opisano także inny mechanizm hamowania ekspresji *bnip3* przez NF- κ B. Czynnik ten ma zdolność rekrutacji deacetyazy histonów, która modyfikując strukturę chromatyny utrudnia dostęp czynników transkrypcyjnych do DNA. Proces ten jest zależny od podjednostki p65 NF- κ B oraz elementu odpowiedzi na NF- κ B w promotorze genu *bnip3*. Sytuacja ta jest nietypowa, ponieważ NF- κ B jest na ogół aktywatorem, a nie represorem transkrypcji. Ponadto, *bnip3* jest jedynym znanym genem proapoptocytynym, w którego promotorze występuje element odpowiedzi na NF- κ B, co dowodzi jego znaczenia jako czynnika regulującego śmierć komórki [19]. Szlak NF- κ B, a tym samym

ekspresja BNIP3, są regulowane przez kinazę Akt, której konstytutywna aktywność powoduje obniżenie transkrypcji genu *bnip3* [18].

2. REGULACJA TRANSKRYPCJI NIEZALEŻNA OD HIPOKSJI

PLAGL-2

BNIP3 może ulegać ekspresji również w niektórych prawidłowo unaczynionych guzach i komórkach nienarażonych na hipoksję. Zidentyfikowano kilka czynników indukujących transkrypcję jego genu w warunkach normoksji; jednym z nich jest PLAGL-2 (pleiomorphic adenoma gene-like 2) [15], który indukuje śmierć fibroblastów i komórek neuroblastomy poprzez promowanie ekspresji białka BNIP3 [2] na drodze niezależnej od elementu HRE [12].

Tlenek azotu

Również egzo- i endogenne tlenek azotu (NO) reguluje aktywność promotora i ekspresję genu *bnip3*. NO, produkt aktywności enzymu iNOS (inducible nitric oxide synthase) [26], może zarówno indukować, jak i hamować śmierć komórkową, w zależności od stężenia oraz typu komórki [2]. NO jest supresorem ekspresji BNIP3 w hepatocytach, przez co chroni je przed śmiercią [26]. Odwrotna sytuacja występuje w przypadku enterocytów [5] i makrofagów, gdzie pod działaniem NO indukowana jest ekspresja genu *bnip3* i śmierć komórki. BNIP3 jest zatem mediatorem śmierci komórkowej wywołanej przez reaktywne formy azotu po zwiększeniu aktywności syntazy tlenu azotu (iNOS) [26].

Badania na makrofagach wykazały, że indukcja ekspresji BNIP3 przez NO jest zależna od białka Ras i szlaku Raf/MEK/ERK, którego aktywacja prowadzi ostatecznie do ekspresji i stabilizacji HIF-1 [2] na drodze niezależnej od hipoksji [12]. Jest to przykład sytuacji, w której aktywność Ras prowadzi do śmierci komórki, a nie jej podziału. Następująca w konsekwencji tego ekspresja genu *bnip3* jest zatem zależna od elementu HRE – elementy odpowiedzi na inne czynniki transkrypcyjne nie są konieczne [2]. Ponadto, w pozycji -281 w stosunku do promotora genu *bnip3* znajduje się element niezbędny do inicjacji jego transkrypcji przez NO [24]. Tlenek azotu aktywuje HIF-1 zarówno w komórkach prawidłowych, jak i nowotworowych. Oprócz tego może on aktywować program śmierci z udziałem p53 lub innych czynników transkrypcyjnych, co oznacza, że śmierć komórek w odpowiedzi na NO jest skutkiem interakcji różnych szlaków [2].

3. REGULACJA POTRANSKRYPCYJNA

Modyfikacje potranslacyjne służą regulacji aktywności białek i dają komórce możliwość natychmiastowej odpowiedzi na bodziec z udziałem danego białka. Za pomocą modyfikacji białko może być zarówno aktywowane, jak i utrzymywane w stanie nieaktywnym do momentu, w którym jego aktywność jest konieczna. Pozwalają one także przyspieszyć degradację białka w razie potrzeby. Białka grupy BOP mogą podlegać różnego rodzaju modyfikacjom potranslacyjnym, np.: fosforylacji (białko Bad może być fosforylowane w różnych miejscach, w zależności od tego, który szlak został aktywowany), cięciu proteolitycznemu (Bid ulega aktywacji poprzez cięcie przez kaspazę

8) lub wiązaniu ze strukturami komórkowymi (Bim ulega sekwestracji po skomplexowaniu z dyneiną, białkiem związanym z mikrotubulami) [8].

Fosforylacja

Pierwszą z ważnych modyfikacji białka BNIP3 jest opisana wcześniej dimeryzacja (patrz część I, podrozdział 2.2). Stosując elektroforezę w warunkach denaturujących najczęściej wykrywa się dwie formy BNIP3: około 31 i 60 kDa, co odpowiada najprawdopodobniej formie mono- i dimerycznej. Oprócz tego w lisatach z kardiomiocytów poddanych działaniu hipoksji można wykryć przynajmniej 4 szybciej migrujące formy, z których najszybciej migrująca osiąga wartość około 21 kDa, co odpowiada obliczonej masie molekularnej tego białka. Podobny efekt daje traktowanie miocytów fosfatazą CIP (calf intestinal alkaline phosphatase). Powstawanie szybciej migrujących form białka BNIP3 w czasie hipoksji ulega zahamowaniu po podaniu wanadianu sodu, będącego inhibitorem fosfataz, jak i po traktowaniu komórek inhibitorem fosfatazy PP2a – kwasem okadaikowym. Sugeruje to, że fosforylacja jest przynajmniej częściowo odpowiedzialna za zmianę szybkości migracji BNIP3 w żelu poliakrylamidowym. Fosforylacja białka BNIP3 została potwierdzona z zastosowaniem kolumny powinowactwa białek fosforylowanych [9].

Wyniki te dowodzą, że monomeryczny BNIP3 ulega w komórce fosforylacji, nie jest jednak jasne, jakie ma to znaczenie dla jego aktywności. Traktowanie kardiomiocytów jonoforem wapnia A23187 prowadzi do akumulacji BNIP3 na drodze zależnej od kinazy białkowej C (protein kinase C-PKC), co może oznaczać, że fosforylacja przez PKC stabilizuje BNIP3 [9]. Wydaje się również bardzo prawdopodobne, że fosforylacja BNIP3 ma na celu znakowanie białka do degradacji proteasomalnej lub że BNIP3 jest degradowany przez proteazy zależne od kinaz [9]. BNIP3 zawiera domenę PEST odpowiedzialną za kierowanie białka do degradacji [5], która może być fosforylowana przez kinazę CK2 (casein kinase 2). Ponadto dowiedziono, że fosforylacja BNIP3 zależna od CK2 zapobiega uszkodzeniom mitochondriów w kardiomiocytach oraz ich śmierci w warunkach hipoksji [17]. Nie można zatem wykluczyć, że degradacja białka jest jedną z przyczyn pojawiania się w żelu szybciej migrujących form [9].

Według dostępnych obecnie danych wiadomo, że fosforylacja BNIP3 może powodować zarówno stabilizację białka, jak i przyczyniać się do jego degradacji. Efekt fosforylacji BNIP3 zależy najprawdopodobniej od miejsca przyłączenia grupy fosforanowej, które z kolei jest uwarunkowane tym, która kinaza odpowiada za modyfikację.

Glikozylacja

BNIP3 może podlegać glikozylacji, co zostało zaobserwowane w komórkach raka gruczołu sutkowego. Przyłączenie acetyloglikozaminy powoduje zmianę lokalizacji BNIP3 w komórce, supresję jego aktywności i w konsekwencji opóźnia śmierć komórki w odpowiedzi na hipoksję. Oprócz tego, wydaje się, że glikozylacja jest związana również z tzw. tropizmem narządowym, tj. wpływa na wybór organu, w którym preferencyjnie powstają guzy wtórne. Wzmocniona glikozylacja z udziałem acetyloglikozaminy

jest rezultatem wzrostu udziału oddychania beztlenowego w metabolizmie komórki, zjawiska powszechnego w warunkach niedoboru tlenu. Intensywną glikolizę obserwuje się często w komórkach nowotworowych, ze względu na silną hipoksję wewnątrz guzów litych. Komórki, które zdołają przystosować się do hipoksji, zyskują przewagę selekcyjną nad komórkami prawidłowymi [13].

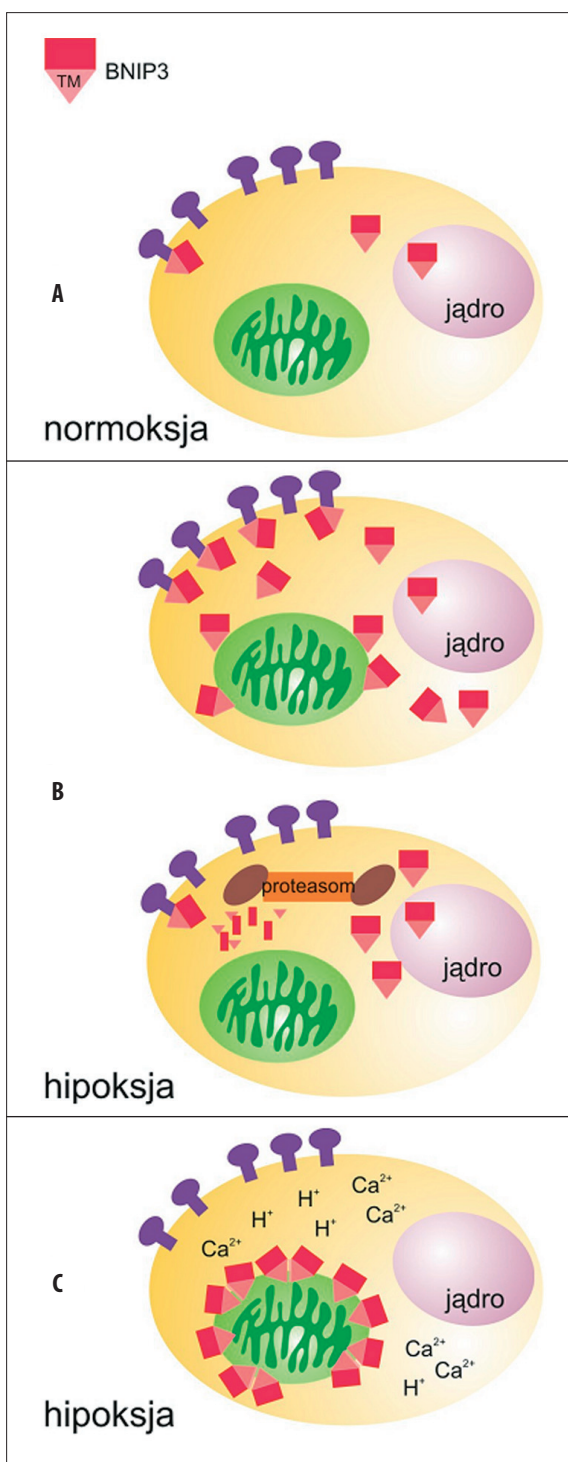
Spadek pH i wzrost poziomu jonów wapnia wywołane hipoksją

Liczne badania potwierdzają, że hipoksja w wielu przypadkach nie jest czynnikiem wystarczającym do aktywacji białka BNIP3. Wprawdzie powoduje ona ekspresję i akumulację BNIP3 w cytoplazmie lub w postaci luźno związanej z błonami, to jednak dopiero zakwaszenie cytoplazmy pozwala na jego aktywację i indukcję programowanej śmierci komórki. Zakwaszenie wynika bezpośrednio ze zmiany metabolizmu tlenowego na glikolizę, która podnosi zużycie glukozy i powoduje nadmierne wytwarzanie kwasu mlekowego, a w konsekwencji spadek pH. W tych warunkach BNIP3 ulega translokacji na mitochondria i wbudowaniu do błony mitochondrialnej [4]. Według innych autorów zakwaszenie jest czynnikiem potrzebnym już na etapie akumulacji białka. Wykazano, że poziom mRNA BNIP3 wzrasta porównywalnie w czasie hipoksji w komórkach ulegających zakwaszeniu, jak i w komórkach, w których pH zostało zneutralizowane. Jednak białko akumuluje znacznie szybciej w komórkach zakwaszonych, co oznacza, że spadek pH stabilizuje BNIP3. Podobnie, śmierć komórek zależna od BNIP3 następuje tylko w komórkach zakwaszonych [22]. Stabilizacja BNIP3 odbywa się poprzez zapewnienie oporności na degradację proteolityczną, jednak dotyczy to tylko formy monomerycznej. Poza zmianą lokalizacji subkomórkowej, nabycie oporności na degradację może się odbywać w wyniku zmiany konformacji białka [14].

Również inne czynniki mogą powodować akumulację białka BNIP3 w komórce, w tym wzrost poziomu jonów wapnia, który występuje w czasie uszkodzeń związanych z niedotlenieniem i reguluje wiele białek rodziny Bcl-2. Jonofor wapnia A-23187 powoduje podniesienie poziomu BNIP3 w warunkach hipoksji, ale także normoksji, przy około 10-krotnie wyższym stężeniu. Inhibitor kinazy białkowej C – kalfostin C – blokuje indukcję BNIP3 przez jony wapnia, z kolei aktywator PKC (PMA) stymuluje akumulację BNIP3 w czasie hipoksji. Sugeruje to, że wzrost poziomu cytosolowego wapnia aktywuje PKC, która z kolei powoduje akumulację BNIP3 niezależnie od zakwaszenia. Porównywalny efekt wywiera reoksygenacja. Szybki wzrost poziomu BNIP3 (2–4 godzin) po przywróceniu prawidłowego ciśnienia tlenu wskazuje, podobnie jak w przypadku zakwaszenia, na posttranskrypcyjny mechanizm regulacji [9] (ryc. 2).

Interakcje z innymi białkami

Aktywność BNIP3 może być modulowana np. poprzez interakcje z Bcl-2 i Bcl-XL, które konkurują o wiązanie z jego domeną transmembranową (TM), uniemożliwiając dimeryzację BNIP3 [5]. Nadekspresja tych białek antyapoptotycznych chroni makrofagi przed śmiercią indukowaną tlenkiem azotu, który jest przez nie wytwarzany w czasie



Ryc. 2. Etapy aktywacji BNIP3 w odpowiedzi na hipoksję. **A** – przy prawidłowym ciśnieniu tlenu poziom BNIP3 w większości komórek jest niski; **B** – hipoksja powoduje akumulację białka w cytoplazmie, w postaci luźno związanej z błonami cytoplazmatycznymi lub z białkami błonowymi, a nawet w jądrze komórkowym. Alternatywnie, po obniżeniu poziomu tlenu następuje nasilenie transkrypcji genu *bnip3*, jednak białko jest niestabilne i ulega degradacji; **C** – skutki przedłużającego się niedoboru tlenu, tj. zakwaszenie cytoplazmy oraz wzrost cytosolowego poziomu jonów wapnia, prowadzą do akumulacji BNIP3, jego translokacji na mitochondria i wbudowania się w błonę mitochondrialną, co inicjuje program śmierci komórki

reakcji zapalnej [24]. Również zachodząca w błonach interakcja między domenami TM białek BNIP3 i BNIP3L skutkuje supresją aktywności proapoptotycznej BNIP3 [20].

Sekwestracja

Aktywność białka BNIP3 może być także hamowana w wyniku jego sekwestracji w jądrze (np. w astrocytach czy komórkach linii U251 pochodzącej z glejaka), która uniemożliwia jego dostęp do mitochondriów w czasie normoksji. W warunkach niedoboru tlenu BNIP3 w komórkach prawidłowych (astrocytach) ulega translokacji na mitochondria, gdzie indukuje PCD (programmed cell death). Co zaskakujące, wymuszona nadekspresja białka BNIP3 w komórkach glejowych nie powoduje przyspieszonej śmierci komórek, a wprost przeciwnie – sprawia, że stają się one odporne na hipoksję [7]. Niedawno wykazano, że BNIP3 działa w jądrze komórki jako represor transkrypcji genu proapoptotycznego (AIF; patrz część I, rozdział 3), przez co może wspomagać komórki w nabywaniu oporności na śmierć indukowaną hipoksją czy chemioterapeutykami [5].

4. ROLA BNIP3 W PROGRESJI CHOROBY NOWOTWOROWEJ

Rola BNIP3 w rozwoju choroby nowotworowej jest bardzo złożona. Jego poziom jest zróżnicowany w różnych typach nowotworów. Wydaje się ponadto, że białko to może mieć odmiennie znaczenie dla komórek nowotworowych w zależności od stadium choroby. Wyższa ekspresja BNIP3 w inwazyjnym stadium raka gruczołu sutkowego podnosi szanse przeżycia pacjentki, co może mieć związek ze wzrostem wrażliwości komórek na indukację programowanej śmierci. Z drugiej strony, im wyższa aktywność BNIP3 w stadium preinwazyjnym nowotworu, tym gorsze prognozy [3]. Podniesienie poziomu BNIP3 w komórkach nowotworowych jest związane przede wszystkim z powszechnym występowaniem regionów hipoksji wewnątrz guzów litych [5]. Hipoksja może prowadzić do śmierci komórek nowotworowych, ale może także pośrednio podnosić częstość mutacji, przyczyniając się do wytworzenia oporności na terapie przeciwnowotworowe oraz zdolności do przerzutowania. Hipoksja jest zatem uznawana za czynnik podnoszący stopień złożoności nowotworu. Badania ekspresji BNIP3 w komórkach poddanych działaniu hipoksji wykazały znaczny wzrost jego poziomu, m.in. w liniach nabłonkowych, śródbłonkowych i makrofagowych, przy czym w wielu przypadkach wzrost był wyraźniejszy w komórkach nowotworowych niż w odpowiadających im komórkach prawidłowych pobranych od tego samego pacjenta. Jest to zaskakujące, ponieważ w komórkach nowotworowych białka proapoptotyczne są najczęściej eliminowane. Podejrzewa się, że podniesienie poziomu BNIP3 w początkowym stadium hipoksji w guzie powoduje pozytywną selekcję komórek opornych na apoptozę, co prowadzi do bardziej agresywnego fenotypu w późniejszym stadium [12]. Jeśli BNIP3 indukuje lub stymuluje autofagię, może w ten sposób dostarczać dodatkowych składników odżywczych komórkom nowotworowym, promując ich proliferację [3]. Wyjątkiem od tej reguły są mysie komórki raka sutka, u których dopiero zahamowanie ekspresji BNIP3 powoduje nabycie zdolności przerzutowania do płuc, wątroby i kości [13].

Wyciszenie ekspresji lub aktywności BNIP3 odgrywa ważną rolę w progresji wielu typów nowotworów [12], szczególnie w późniejszych stadiach [3]. Komórki nowotworo-

we wykształciły kilka strategii pozwalających na ochronę przed śmiercią indukowaną BNIP3. Może to być opisany wcześniej epigenetyczny mechanizm metylacji promotora genu *bnip3* lub nadekspresja białka Bcl-2, które wiąże i dezaktywuje BNIP3. Zauważono również, że traktowanie komórek nowotworowych czynnikiem EGF (epidermal growth factor) chroni je przed śmiercią zależną od BNIP3 [5]. Nadekspresja receptora EGF może zatem również stanowić mechanizm obronny komórek nowotworowych. Ponadto, obserwuje się, że BNIP3 w komórkach nowotworowych może być zlokalizowany nie na mitochondriach, ale w jądrze, np. w komórkach glejaka wielopostaciowego. W odpowiadających im komórkach prawidłowych, w których BNIP3 również ulega sekwestracji w jądrze, hipoksja powoduje translokację białka na mitochondria i indukację programowanej śmierci [7]. Komórki nowotworowe mogą nabyć oporność na śmierć indukowaną hipoksją, blokując mechanizm translokacji BNIP3 z jądra do mitochondriów, czego dowodzi istnienie linii glejaka opornych na anoksję [10]. Dodatkowo, komórki glejaka wykorzystują aktywność BNIP3 jako represora transkrypcji genu czynnika proapoptotycznego AIF, co zapewnia im oporność na chemioterapeutyki działające za jego pośrednictwem [5].

W komórkach raka płuc zaobserwowano, że nadekspresja supresora nowotworów p53 koreluje ze wzrostem poziomu mRNA i białka BNIP3 oraz ze wzrostem apoptozy. Efekt ten jest wyraźniejszy w komórkach wysokoprzerzutujących, ponieważ apoptoza w liniach wysoko- i niskoprzerzutujących jest prawdopodobnie zależna od różnych szlaków sygnałowych. Nadekspresja BNIP3 również przyspiesza apoptozę linii wysokoprzerzutujących zależną od p53. p53 ma zdolność wiązania wielu białek rodziny Bcl-2, regulując w ten sposób równowagę między białkami pro- i antyapoptotycznymi [23].

5. PODSUMOWANIE

BNIP3 jest jedynym znanym białkiem proapoptotycznym, które ulega ekspresji w warunkach hipoksji, dzięki obecności w promotorze jego genu elementu odpowiedzi na czynnik transkrypcyjny HIF-1. Dodatkowo, transkrypcja genu *bnip3* zależna od hipoksji może być inicjowana przez czynnik E2F-1, który podlega negatywnej regulacji ze strony NF- κ B i białka Rb. Istnieją pewne doniesienia na temat wzajemnych zależności między tymi dwoma mechanizmami [21], jednak są one wciąż bardzo niejasne. Niemniej jednak, istnienie alternatywnego mechanizmu indukcji ekspresji białka BNIP3 w czasie hipoksji w razie defektu szlaku HIF-1 dowodzi znaczenia białka BNIP3 w odpowiedzi na niedobór tlenu.

Mimo powszechności poglądu, że regulacja transkrypcji genu *bnip3* jest podstawowym mechanizmem regulującym funkcjonowanie białka, nie sposób pominąć znaczenia jego regulacji potranskrypcyjnej. Wyniki badań wskazują, że hipoksja często nie jest czynnikiem wystarczającym do aktywacji BNIP3, a dopiero jej wtórne efekty, m.in. zakwaszenie, są przyczyną indukcji programu śmierci na drodze zależnej od tego białka. Wskazuje to na istotny udział modyfikacji potranslacyjnych w regulacji funkcji BNIP3, jednak ich znaczenie ciągle nie zostało wyjaśnione. Wydaje się, że fosforylacja może mieć co najmniej dwa przeciwstawne znaczenia, w zależności od miejsca ufosforylowa-

nia: modyfikacja z udziałem kinazy białkowej C powoduje akumulację BNIP3, podczas gdy fosforylacja zależna od CK2 prawdopodobnie sprzyja jego degradacji.

Zaburzenia procesów inicjacji i egzekucji programowanej śmierci komórki są przyczyną wielu chorób, które są często związane z występowaniem w tkankach rejonów hipoksji. Poznanie funkcji białka BNIP3 oraz mechanizmów regulujących jego ekspresję i aktywację może zatem wskazać

nowe cele molekularne, istotne w terapii przeciwnowotworowej, jak i terapii chorób niedokrwienych mięśnia sercowego czy mózgu.

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

PIŚMIENICTWO

- [1] Abe T., Toyota M., Suzuki H., Murai M., Akino K., Ueno M., Nojima M., Yawata A., Miyakawa H., Suga T., Ito H., Endo T., Tokino T., Hinoda Y., Imai K.: Upregulation of BNIP3 by 5-aza-2'-deoxycytidine sensitizes pancreatic cancer cells to hypoxia-mediated cell death. *J. Gastroenterol.*, 2005; 40: 504–510
- [2] An H.J., Maeng O., Kang K.H., Lee J.O., Kim Y.S., Paik S.G., Lee H.: Activation of Ras up-regulates pro-apoptotic BNIP3 in nitric oxide-induced cell death. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 33939–33948
- [3] 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
- [4] 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
- [5] 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
- [6] 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
- [7] 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 glial cells: Implications for glioblastoma multiforme tumor cell survival under hypoxia. *Int. J. Cancer*, 2006; 118: 1660–1669
- [8] Fernandez-Luna J.L.: Regulation of pro-apoptotic BH3-only proteins and its contribution to cancer progression and chemoresistance. *Cell. Signal.*, 2008; 20: 1921–1926
- [9] Graham R.M., Thompson J.W., Wei J., Bishopric N.H., Webster K.A.: Regulation of Bnip3 death pathways by calcium, phosphorylation, and hypoxia-reoxygenation. *Antioxid. Redox Signal.*, 2007; 9: 1309–1315
- [10] Hetschko H., Voss V., Senft C., Seifert V., Prehn J.H., Kögel D.: BH3 mimetics reactivate autophagic cell death in anoxia-resistant malignant glioma cells. *Neoplasia*, 2008; 10: 873–885
- [11] Ikeda R., Tajitsu Y., Iwashita K., Che X.F., Yoshida K., Ushiyama M., Furukawa T., Komatsu M., Yamaguchi T., Shibayama Y., Yamamoto M., Zhao H.Y., Arima J., Takeda Y., Akiyama S., Yamada K.: Thymidine phosphorylase inhibits the expression of proapoptotic protein BNIP3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008; 370: 220–224
- [12] Lee H., Paik S.G.: Regulation of BNIP3 in normal and cancer cells. *Mol. Cells*, 2006; 21: 1–6
- [13] Manka D., Millhorn D.E.: A potential molecular link between aerobic glycolysis and cancer. *Cell Cycle*, 2006; 5: 343–344
- [14] 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
- [15] Mizutani A., Furukawa T., Adachi Y., Ikehara S., Taketani S.: A zinc-finger protein, PLAGL2, induces the expression of a proapoptotic protein Nip3, leading to cellular apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 15851–15858
- [16] 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
- [17] Shaw J., Baetz D., Yurkova N., Aguilar F., Zhang T., Kirshenbaum L.A.: Casein kinase 2 dependent regulation of the death protein Bnip3 promotes cell survival of ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2008; 44: 784 (abstr. 174)
- [18] Shaw J., Yurkova N., Zhang T., Gang H., Aguilar F., Weidman D., Scramstad C., Weisman H., Kirshenbaum L.A.: Antagonism of E2F-1 regulated Bnip3 transcription by NF-κB is essential for basal cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 20734–20739
- [19] Shaw J., Zhang T., Rzeszutek M., Yurkova N., Baetz D., Davie J.R., Kirshenbaum L.A.: Transcriptional silencing of the death gene BNIP3 by cooperative action of NF-κB and histone deacetylase 1 in ventricular myocytes. *Circ. Res.*, 2006; 99: 1347–1354
- [20] 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
- [21] Tracy K., Dibling B.C., Spike B.T., Knabb J.R., Schumacker P., Macleod K.F.: BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol. Cell. Biol.*, 2007; 27: 6229–6242
- [22] 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
- [23] 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
- [24] Yook Y.H., Kang K.H., Maeng O., Kim T.R., Lee J.O., Kang K.I., Kim Y.S., Paik S.G., Lee H.: Nitric oxide induces BNIP3 expression that causes cell death in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 321: 298–305
- [25] Yurkova N., Shaw J., Blackie K., Weidman D., Jayas R., Flynn B., Kirshenbaum L.A.: The cell cycle factor E2F-1 activates Bnip3 and the intrinsic death pathway in ventricular myocytes. *Circ. Res.*, 2008; 102: 472–479
- [26] Zamora R., Vodovotz Y., Betten B., Wong C., Zuckerbraun B., Gibson K.F., Ford H.R.: Intestinal and hepatic expression of BNIP3 in necrotizing enterocolitis: regulation by nitric oxide and peroxynitrite. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2005; 289: G822–G830
- [27] 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
- [28] Zhang J., Ney P.A.: Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ.*, 2009; 16: 939–946

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.