

Received: 07.08.2018
Accepted: 30.04.2019
Published: 9.12.2019

Bax inhibitor 1 (BI-1) jako konserwatywny regulator programowanej śmierci komórki

Bax Inhibitor 1 (BI-1) as a conservative regulator of Programmed Cell Death

Mirosław Godlewski, Agnieszka Kobylińska

Katedra Ekofizjologii Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Streszczenie

Programowana śmierć komórki (PCD) jest fizjologicznym procesem, w którym zainfekowane lub niepotrzebne komórki, dzięki zdolności do samobójczej śmierci, mogą być selektywnie eliminowane. W indukcji oraz hamowaniu tego procesu istotną rolę odgrywają białka pro- i antyapoptotyczne.

W artykule scharakteryzowano inhibitor Bax -1 (BI-1) oraz jego cytoochronną rolę w regulacji procesów komórkowych. Przedstawiono przegląd badań, w których wykazano, że: 1) BI-1 jest małym (u człowieka 36 kDa, 237-aminokwasowym) białkiem i ma u zwierząt 6, a u roślin 7 α -helikalnych transbłonowych domen, 2) BI-1 ulega ekspresji w większości tkanek u wszystkich organizmów, a jego poziom zależy od stanu funkcjonalnego komórki i zaangażowania w rozwój czy reakcję na stresy biotyczne i abiotyczne, 3) BI-1 tworzy pH-zależny kanał Ca^{2+} umożliwiający uwolnienie tych jonów z ER, 4) cytoochronne działanie BI-1 wymaga całego, niezmienionego C-końca, 5) BI-1 może wchodzić w bezpośrednią interakcję z licznymi innymi białkami. Białko BI-1 wpływa na liczne procesy komórkowe, w tym: przeciwdziałania stresowi ER, oksydacyjnemu, utracie komórkowej homeostazy Ca^{2+} , wpływa też na metabolizm sfingolipidów, proces autofagii, polimeryzację aktyny, aktywność lizosomów, a także proliferację komórek. Badania mechanizmu działania BI-1 umożliwią szersze jego wykorzystanie w terapii u ludzi i w zwiększeniu tolerancji roślin uprawnych na stresy środowiskowe.

Słowa kluczowe:

apoptoza • Bax inhibitor (BI-1) • homeostaza Ca^{2+} • programowana śmierć komórek (PCD) • retikulum endoplazmatyczne (ER) • stres oksydacyjny

Summary

Programmed cell death (PCD) is a physiological process in which infected or unnecessary cells due to their suicidal death capability can be selectively eliminated. Pro- and antiapoptotic proteins play an important role in the induction or inhibition of this process.

Presented article shows property of Bax-1 (BI-1) inhibitor which is one of the conservative protein associated with the endoplasmic reticulum (ER) as well as its cytoprotective role in the regulation of cellular processes. It was shown that: 1) BI-1 is a small protein consisting of 237 amino acids (human protein - 36 kDa) and has 6 (in animals) and 7 (in plants) α -helical transmembrane domains, 2) BI-1 is expressed in all organisms and in most tissues, moreover its level depends on the functional condition of cells and it is involved in the development or

	<p>reaction to biotic and abiotic stresses, 3) BI-1 forms a pH-dependent Ca²⁺ channel enabling release of these ions from the ER, 4) cytoprotective effects of BI-1 requires a whole, unchanged C-terminus, 5) BI-1 can interact directly with numerous other proteins, BI-1 protein affects numerous cellular processes, including: counteracting ER stress, oxidative stress, loss of cellular Ca²⁺ homeostasis as well as this protein influences on sphingolipid metabolism, autophagy, actin polymerization, lysosomal activity and cell proliferation. Studies of BI-1 functions will allow understanding the mechanisms of anticancer therapy or increases the knowledge of crop tolerance to environmental stresses.</p>
Keywords:	apoptosis • Bax inhibitor 1 (BI-1) • Ca²⁺ homeostasis • endoplasmic reticulum (ER) • oxidative stress • programmed cell death
GICID	01.3001.0013.6294
DOI:	10.5604/01.3001.0013.6294
Word count:	14414
Tables:	1
Figures:	3
References:	115

Adres autorki: dr Agnieszka Kobylńska, Katedra Ekofizjologii Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. S. Banacha 12/16; 90-237 Łódź; e-mail: agnieszka.kobylinska@biol.uni.lodz.pl

Wykaz skrótów: **aa** – aminokwas (amino acid), **ABP** – białka wiążące aktynę (actin binding proteins), **AIF** – czynnik indukcji apoptozy (apoptosis inducing factor), **Akt** – kinaza białkowa B (protein kinase B), **AP2** – białko aktywatorowe 2 (activator protein 2), **APX** – peroksydaza askorbinianowa (ascorbate peroxidase), **ATF6** – czynnik transkrypcyjny (activating transcription factor 6), **BH** – domena homologii (Bcl-2 homology), **BI-1** – inhibitor – 1 Bax (Bax Inhibitor-1), **CaM** – kalmodulina (calmodulin), **cb5** – cytochrom b5 (cytochrome b5), **Cdk** – kinaza cyklinozależna (cyclin-dependent kinase), **Cdk2, Cdk4** – kinaza cyklinozależna 2 i 4 (cyclin-dependent kinases 2 and 4), **CPB** – białko wiążące Ca²⁺ (Ca²⁺-binding protein), **CYP83A1** – cytochrom P450 83A1 (cytochrome P450 83A1), **endo G** – endonukleaza G (endonuclease G), **ER** – retikulum endoplazmatyczne (endoplasmic reticulum), **ERAD** – białko degradacji związane z ER (ER associated degradation), **ERK** – kinaza regulowana przez czynniki zewnątrzkomórkowe (extracellular-signal regulated kinase), **FAH** – hydroksylaza kwasów tłuszczowych (fatty acid hydroxylase), **FAK** – kinaza białkowa (focal adhesion kinase), **Fe-SOD** – dysmutaza nadrodnikowa (superoxide dismutase), **GA** – aparat Golgiego (Golgi apparatus), **GFP** – białko zielonej fluorescencji (green fluorescence protein), **GST** – transferaza s glutationowa (glutathione S-transferase), **HO-1** – oksigenaza hemowa (heme oxygenase-1), **HR** – reakcja nadwrażliwości (hypersensitive response), **IAPs** – białka inhibitorowe apoptozy (inhibitors of apoptosis proteins), **IP₃ 1,4,5** – trifosforan inozytoli (inositol 1,4,5-trisphosphate), **IP₃R** – receptor 1,4,5 – trifosforan inozytoli (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor), **IRE1α** – kinaza serynowo-treoninowa (inositol-requiring enzyme 1α), **JNK** – kinaza fosforylująca N-koniec czynnika transkrypcyjnego Jun (Jun N-terminal kinase), **LCB** – zasady sfingoidowe (long-chain bases), **MAM** – mikrodomeny (mitochondria-associated microdomains), **MAPK** – kinaza białkowa aktywowana mitogenem (mitogen-activated protein kinase), **MLO** – gen oporności (mildew locus O), **MMO** – monooksygenaza mikrosomalna (microsomal monooxygenase), **NFAT** – jądrowy czynnik aktywowanych komórek T (nuclear factor of activated T cells), **NF-κB** – czynnik transkrypcyjny κB (nuclear factor-κB), **NHE** – wymiennicz sodowo-protonowy sodium hydrogen exchanger), **NPR** – reduktaza NADPH:cytochrom P450 (NADPH-dependent cytochrome P450 oxidoreductase), **Nrf-2** – czynnik transkrypcyjny (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), **ORF** – otwarta ramka odczytu (open reading frame), **P450** – cytochrom P450 (cytochrome P450), **PCD** – programowana śmierć komórki (programmed cell death), **PERK** – kinaza białkowa (protein kinase-like ER kinase), **PHGP** – peroksydaza glutationowa wodoronadtlenków fosfolipidów (phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase), **PR** – białko związane z patogenezą (pathogenesis-related protein), **PTP** – megakanal mitochondrialny (permeability transition pore), **Rb** – białko siatkówczaka, kodowane przez gen supresorowy (retinoblastoma tumor suppressor protein), **RNAi** – interferencja RNA (RNA interference), **ROS** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species), **SERCA** – Ca-ATP-aza (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase), **siRNA** – małe interferujące RNA (small inter-

fering RNA), **SLD** – desaturaza $\Delta 8$ (sphingolipid $\Delta 8$ desaturase), **Smac/DIABLO** – mitochondrialny czynnik 2 aktywujący kaspazy (second mitochondrial derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with a low pI), **SOCE** – pojemnościowy napływ jonów wapnia (store-operated Ca^{2+} entry), **TEGT** – inhibitor Bax 1 (testis enhanced gene transcript), **TMBIM** – rodzina integralnych białek błonowych (transmembrane BAX inhibitor motif containing), **TMD** – domena transbłonowa (transmembrane domain), **UPR** – odpowiedź na białka niesfałdowane (unfolded protein response), **VDAC** – poryna (voltage dependent anion channel), **VLCFA** – bardzo długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (very-long-chain fatty acid), **XBP-1** – białko wiążące kasetę X1 (X-box-binding protein 1).

WSTĘP

Programowana śmierć komórki (PCD – programmed cell death) jest fizjologicznym procesem. Dzięki zdolności komórek do samobójczej śmierci mogą być selektywnie eliminowane komórki zbędne i uszkodzone, pozwalając na utrzymanie fizjologicznej homeostazy organizmów wielokomórkowych. U zwierząt i roślin PCD zachodzi podczas całej ontogenezy, uczestniczy bowiem w histogenezie i formowaniu organów (PCD związana z rozwojem), a także w adaptacji do warunków środowiska i podczas reakcji na abiotyczny i biotyczny stres środowiskowy. Podczas PCD następuje destrukcja składników komórki przez syntetyzowane i/lub aktywowane wewnątrzkomórkowe hydrolazy.

U zwierząt i roślin opisano co najmniej kilka rodzajów PCD, z których najlepiej poznaną postacią jest występująca u ssaków apoptoza [32]. Ogólnie apoptoza jest definiowana jako szlak zależnego od kaspazy obumierania komórki. Podczas tego procesu następuje m.in. uszkodzenie struktury i funkcji mitochondriów, kondensacja i marginalizacja chromatyny w jądrze, fragmentacja DNA z międzynukleosomowym rozcinaniem DNA (tworzeniem „drabinek” DNA), a jądro ulega fragmentacji. W końcowej części tego procesu (w fazie zniszczenia) następuje fragmentacja komórki z tworzeniem tzw. ciała apoptotycznych, eliminowanych zazwyczaj przez monocyty i makrofagi. Wprawdzie przebieg PCD u roślin w pewnych aspektach jest podobny do PCD u zwierząt, to różnice wynikające z odmiennej drogi ewolucyjnej tych dwóch królestw – m.in. różnice w budowie komórek i brak homologów niektórych białek zaangażowanych w apoptozę – powodują, że nie można nazwać apoptozą zachodzącą u roślin PCD [33]. PCD jest złożonym, ściśle genetycznie regulowanym procesem wymagającym ekspresji licznych genów. U zwierząt w regulacji indukcji i hamowania apoptozy istotną rolę pełnią anty- i proapoptotyczne białka rodziny Bcl-2. Białka należące do tej rodziny zawierają od jednej do czterech krótkich domen BH (BH – Bcl-2 homology) [37]. Wśród co najmniej 15 białek należących do tej rodziny wyróżniono trzy podrodziny:

- Bcl-2 o antyapoptotycznej roli (m.in. Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 i A1), której białka zawierają cztery domeny BH (1-4) i domenę transbłonową (TMD), dzięki której mogą się umiejscawiać w błonach,
- Bax o proapoptotycznej funkcji (m.in. Bax, Bak i Bok), które są białkami zawierającymi trzy domeny BH (1-3) i domenę TMD oraz

- „BH3-only”, do której należą białka proapoptotyczne (m.in. Bad, Bid, BNIP3 i BimL), mające tylko jedną domenę BH i brak domeny TMD [23].

Podczas indukcji apoptozy aktywowane białka BH3-only mogą się wiązać z proapoptotycznymi białkami podrodziny Bax (Bax i Bak), które wiążą się z N-terminalnym α -helikalnym segmentem VDAC (voltage dependent anion channel), a to prowadzi do otwarcia kanałów PTP (permeability transition pore). Przez otwarte PTP z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów do cytoplazmy uwalniany jest cytochrom c i inne proapoptotyczne białka, takie jak: endo G (endonuclease G), AIF – apoptosis inducing factor, Smac/Diablo (second mitochondrial derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with a low pI) (IAPs – inhibitors of apoptosis proteins) i proteaza serynowa Omi/HtrA2. Cytochrom c w cytoplazmie wchodzi w skład apoptosomu, w którym zachodzi autoaktywacja prokaspazy-9 [23]. Białka antyapoptotyczne rodziny Bcl-2 mogą zapobiegać otwieraniu kanałów PTP dzięki bezpośredniej hamującej interakcji z białkami proapoptotycznymi [23]. Obecność białek rodziny Bcl-2 wykazano tylko u *Metazoa*, natomiast genomy drożdży i roślin nie mają genów kodujących te białka [2, 3]. Wprawdzie nie zidentyfikowano jeszcze homologów białek należących do rodziny Bcl-2, istnieją jednak badania wskazujące na występowanie u roślin białek Bax- i Bcl-2-podobnych [25, A. Kobylńska, Ł. Balcerzak i M. Godlewski, niepubl.]. Genomy zwierząt i roślin zawierają liczne geny pro-PCD i nie mniej liczne geny anty-PCD. Obecność wielu różnych genów o antyapoptotycznym działaniu wskazuje na ich istotną rolę w utrzymaniu żywotności komórki, a także że komórki mogą wykorzystywać różne mechanizmy przeciwdziałania PCD [25].

Jest istotne, że chociaż drożdże nie syntetyzują ani białek Bax, ani Bcl-2, to transformacja drożdży genem Bax ssaków powoduje obumieranie ich komórek, natomiast ich kotransformacja genem Bcl-2 przeciwdziała letalnemu działaniu Bax. Podobne wyniki uzyskiwano u Bax- i Bcl-2-transformowanych roślin (m.in. u tytoniu i *Arabidopsis*) [67, 84]. Przebieg procesu obumierania komórek u Bax-transformowanych roślin jest podobny do PCD indukowanego przez inne czynniki, np. Bax indukuje szybkie, HR-podobne (hypersensitive response) obumieranie komórek, tak jak u roślin zaatakowanych przez patogeny [67, 110]. Tak więc, wyniki uzyskane u transformowanych drożdży i roślin wskazują, że białka Bax i Bcl-2

ssaków u drożdży i roślin, podobnie jak u zwierząt, mogą wpływać na procesy prowadzące do obumierania komórek i przeciwdziałające kierowaniu komórek na ścieżkę PCD. Drożdże transformowane pro- i antyapoptotycznymi genami ssaków są dogodnym modelem badawczym do identyfikacji pro- i anty-PCD genów zwierząt i roślin. Funkcjonalny przesiew genów z bibliotek cDNA różnych organizmów i ocena wpływu ich ekspresji na żywotność komórek drożdży umożliwiły wykrycie genów zaangażowanych w regulację i przebieg PCD [33]. Stosując takie podejście badawcze w bibliotekach cDNA ssaków i innych zwierząt, a także u różnych gatunków roślin, zidentyfikowano geny, których ekspresja, tak jak Bax, powodowała obumieranie komórek oraz geny przeciwdziałające indukcji PCD u Bax-transformowanych drożdży [33]. Xu i Reed [108], stosując funkcjonalny przesiew biblioteki cDNA człowieka (a następnie ryżu i *Arabidopsis*) w drożdżach transformowanych genem Bax ssaków, wykazali, że letalnemu działaniu Bax może przeciwdziałać białko, które nie należy do białek rodziny Bcl-2 i które bezpośrednio nie oddziałuje z Bax [108]. Autorzy nazwali to białko BAX inhibitor-1 (BI-1 – Bax inhibitor-1). Obecność białka BI-1 wykazano następnie u zwierząt, roślin, grzybów i innych organizmów (Tabela 1).

BUDOWA I WŁAŚCIWOŚCI BIAŁKA BI-1

Białko, obecnie znane jako BI-1, zostało wcześniej zidentyfikowane w jądrach myszy i szczurów i nazwane TEGT (testis enhanced gene transcript). Transkrypty TEGT wykryto też u innych kręgowców (żaby, bydła i ludzi) i w innych narządach (śledzionie, mózgu, wątrobie, nerkach, grasicy, płucach, jajnikach i sercu) [100]. Gen oraz jego produkt BI-1, które po raz pierwszy zidentyfikowali Xu i Reed [108], w odróżnieniu od białek rodziny Bcl-2, zawierających tylko *Metazoa*, jest obecny u wszystkich organizmów [17, 39, 46]. Niedawno zidentyfikowano sześć białek o BI-1-podobnej budowie i aktywności, które tworzą rodzinę białek TMBIM (transmembrane BAX inhibitor motif containing) (1-6) i do której jako TMBIM6 należy białko BI-1 [115]. Wykazano, że białko BI-1 jest umiejscowione w błonie ER oraz błonie łączącej ER (endoplasmic reticulum) z otoczką jądrową [10, 39, 108]. Po transformacji konstruktem BI-1:GFP (green fluorescence protein) sygnał lokalizacji BI-1 obserwowano też w oczyszczonej frakcji błony komórkowej [69], a także przegrodzie pierwotnej w komórkach kultur komórkowych tytoniu (BY-2) [57].

CZĄSTECZKI BI-1

Białko BI-1, u wszystkich badanych organizmów, jest małym integralnym białkiem błonowym o masie cząsteczkowej 25-27 kDa i składającym się u ssaków z około 237 reszt aminokwasowych [10, 46, 57, 108]. U wszystkich organizmów białka BI-1 mają nie tylko takie samo umiejscowienie w komórce, ale też podobną topologię. U ssaków mają przeważnie 6, a u roślin 7 transbłonowych domen o α -helikalnej konformacji, które umiejscawiają je w błonie oraz stosunkowo krótkie hydrofilowe końce

N i C [10, 46, 108]. Wykazano, że delecja C-końca nie wpływa na ich umiejscowienie w błonie [106]. Transbłonowe hydrofobowe domeny są połączone krótkimi regionami hydrofilowymi poza błoną. Analiza pierwszorzędowej struktury cząsteczki BI-1 u *Triticum aestivum* (TaBI-1) wykazała, że rozmieszczenie tych siedmiu transbłonowych regionów jest następujące: 36–58, 62–81, 88–110, 115–137, 144–163, 173–190 i 211–230 [102]. Stwierdzono też możliwość tworzenia na C-końcu dodatkowej hydrofobowej domeny utworzonej przez powracającą pętlę przypominającą podjednostkę α kanałów jonowych [39].

Powszechnie uważa się, że koniec C jest umiejscowiony od strony cytozolu [10, 17, 39], natomiast jest dyskutowana lokalizacja N-końca. Wskazywano na jego umiejscowienie od strony światła ER [10, 39], a także, że koniec N u roślin ma wewnętrzną, a u zwierząt cytozolową lokalizację [10]. Obecnie przeważa pogląd, że oba końce (C i N) mogą być umiejscowione od strony cytozolu [13, 39]. Na cytozolową lokalizację C-końca wskazują badania prowadzone m.in. na tytoniu transformowanym konstruktem BI-1:GFP, w których trawienie digitoniną (która przenika przez PM, a nie przenika przez endomembrany) usuwa sygnał GFP przyłączony do C-końca BI-1 [56]. Możliwość cytozolowej lokalizacji N-końca sugerują badania wiązania BI-1 z białkiem NleH, które po infekcji przez enteropatogeniczną *Escherichia coli* jest wydzielane do komórki żywiciela (np. Hela) i przeciwdziała obumieraniu jego komórek [38]. Białko NleH przeciwdziała obumieraniu komórek gospodarza tylko po związaniu z końcem N jego białka BI-1. Po delekcji tego końca nie był tworzony kompleks BI-1-NleH, a NleH nie hamowało aktywacji kaspazy i nie przejawiało cytoochronnego działania. NleH jest białkiem cytozolowym, mogło się więc wiązać z N-końcem BI-1 od strony cytozolu.

Dla cytoochronnej funkcji białka BI-1 jest niezbędny cały niezmienny koniec C, który składa się z aminokwasów polarnych (zasadowych – Lys i Arg i kwaśnych – Glu i Asp), hamujących PCD wywołaną przez stres oksydacyjny [57]. Wykazano, że dla anty-PCD funkcji BI-1 konieczna jest 9-aminokwasowa sekwencja EKDKKKEKK obecna w końcu C, która tworzy strukturę coiled-coil [17]. Zastąpienie tych reszt resztami, które nie tworzą struktury coiled-coil pozbawiało takie BI-1 zdolności do hamowania obumierania komórki [57]. Takiej zdolności nie mają też mutanty z delecją końca C (BI-1 Δ C), a także mutanty, w których 9 aminokwasów końca C zamieniono na alaniny (BI-1 C9A) [17]. Koniec C białka BI-1 u różnych organizmów wykazuje znaczne podobieństwo struktury i funkcji, o czym świadczą badania, w których koniec C AtBI-1 (z *Arabidopsis*) zastąpiono 9-aminokwasowym końcem C BI-1 człowieka (ryc. 1). Taki chimeryczny gen, podobnie jak AtBI-1, hamował obumieranie komórek drożdży indukowane przez Bax [57]. C-koniec zawiera też miejsca wiązania różnych białek, które mogą uczestniczyć w cytoochronnej funkcji BI-1 [17, 57, 111]. Końce C białek BI-1 u różnych organizmów wykazują znaczną identyczność sekwencji aminokwasowej i funkcji, natomiast końce N, które są wyraźnie dłuższe od końca

Tabela 1. Białka BI-1 u różnych organizmów. Porównanie liczby reszt aminokwasowych (aa), identyczności (ident.) i podobieństwa (podob.) sekwencji aminokwasowych (aa), masy cząsteczkowej (m.cz.) i liczby domen transbłonowych (TMD). aBI-1 – BI-1 u zwierząt; mBI-1 – BI-1 u ssaków; pBI-1 – BI-1 u roślin

Organizm	Gen /białko	Liczba aminokwasów	Identyczność (podobieństwo) sekwencji aminokwasów	M.c. kDa	TMD	Piśmiennictwo
Kręgowce						
<i>Homo sapiens</i>	HsBI-1	237	– ident. z HsBI-1 – 90% (95% podob.); – ident. z MmBI-1 – 92% (95% podob.); – ident. z CeBI-1 – 21% (37% podob.); – ident. z AtBI-1 – 29% (45% podob.); – (podob. do HvBI-1 – 53%); – ident. z PfBI-1 – 29%; – ident. z CpBI-1 – 35%; – ident. z BsYetJ – 35%; – znaczna homologia z SsBI-1.	26	6	[22, 24, 65, 67]
<i>Rattus norvegicus</i>	RnBI-1	236	– ident. z HsBI-1 – 90% (95% podob.);		6	[73]
<i>Mus musculus</i>	MmBI-1	237	– ident. z HsBI-1 – 92% (95% podob.).		6	[73]
<i>Paralichthys olivaceus</i>	PoBI-1	237				[22]
Bezkręgowce						
<i>Drosophila melanogaster</i>	DmBI-1	245				[22]
<i>Procambarus clarkia</i>	PcBI-1					[40]
<i>Caenorhabditis elegans</i>	CeBI-1	241	– ident. z HsBI-1 – 21% (37% podob.);			[73, 115]
<i>Hydra vulgaris</i>	HvBI-1		– (podob. do HsBI – 145,5%).		7	
Rośliny						
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtBI-1	247	– ident. z HsBI-1 – 29% (45% podob.); – ident. z mBI-1 – ~41%.	28	7	[11, 73, 75, 80]
<i>Brassica napus</i>	BnBI-1	247	– ident. z pBI-1 – 73–95%; – ident. z aBI-1 – 26–42%; – ident. z AtBI-1 – 93%; – ident. z OsBI-1 – 67%; – ident. z HvBI-1 – 66–68%.	27,5	7	[11]
<i>Capsicum annuum</i>	CaBI-1	248	– ident. z SIBI-1 – 92,8%; – ident. z NtBI-1 – 88,1%; – ident. z BoBI-1 – 81,6%; – ident. z AtBI-1 – 81,6%.		7	[72]
<i>Cucumis sativus</i>	CsBI-1	250	– ident. z AtBI-1 – 77,7% (91% podob.); – ident. z pBI-1 – 69–77%.		5	[26]
<i>Hordeum vulgare</i>	HvBI-1	247	– (podob. do HsBI-1 – 53%); – ident. z OsBI-1 – 98% (98% podob.); – ident. z AtBI-1 – 75%.	~25	7	[65]
<i>Nicotiana tabacum</i>	NtBI-1	249	– ident. z pBI-1 – 73–95%; – ident. z aBI-1 – 26–42%; – ident. z AtBI-1 – 75%; – ident. z OsBI-1 – 66–68%; – iden. z HvBI-1 – 66–68%.	27,6	7	[9, 11, 22]
<i>Oryza sativa</i>	OsBI-1	248	– ident. z mBI-1 – ~ 41,5%; – ident. z AtBI-1 – 70,3%.	25,9	7	[80]
<i>Triticum aestivum</i>	TaBI-1		– ident. z CsBI-1 – 37%; – ident. z HvBI-1 – 97,6%; – ident. z AtBI-1 – 66,7%.		7	[62]
<i>Zea mays</i>	ZmBI-1	253	– ident. z CsBI-1 – 69 %		7	[62]
Grzyby						
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ynl305c	297	– ident. z pBI-1 – 26–28%		6	[22]

Organizm	Gen /białko	Liczba aminokwasów	Identyczność (podobieństwo) sekwencji aminokwasów	M.c. kDa	TMD	Piśmiennictwo
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	SsBI-1		– znaczna homologia z HsBI-1, AtBI-1 i BI-1 innych organizmów		6	[75]
Jednokomórkowe Eukaryota						
<i>Plasmodium falciparum</i>	PfBI-1		– ident. z HsBI-1 – 29%			[67]
<i>Cryptosporidium parvum</i>	CpBI-1		– ident. z HsBI-1 – 35%			[67]
Bakterie						
<i>Bacillus subtilis</i>	BsYetJ		– ident. z HsBI-1 – 35%		7	[24]
<i>Escherichia coli</i>	YCCA		– (podob. do aBI-1 i pBI-1)			[22, 67]

C i u poszczególnych organizmów mogą się różnić sekwencją aminokwasową. Takie zróżnicowanie sugeruje, że koniec N może nie uczestniczyć w cytoochronnej funkcji białka BI-1 [10, 102]. Delecja N-końca nie miała też wpływu na anty-PCD działanie BI-1 [57].

O wysokiej konserwatywności białka BI-1 świadczy nie tylko identyfikacja tego białka u różnych organizmów, jego anty-PCD działanie u drożdży kotransformowanych genem Bax ssaków wraz z genem BI-1 pochodzących z różnych organizmów, ale także efekt anty-PCD uzyskiwany po transformacji genem BI-1 pochodzącym z innego gatunku zwierzęcia lub rośliny, w tym także genów z roślin w komórkach zwierząt i odwrotnie. Na przykład okazało się, że BI-1 z *Arabidopsis* (AtBI-1) może przeciwdziałać indukowanemu przez Bax i H₂O₂ obumieraniu komórek drożdży, zwierząt i roślin [18, 57]. Transformacja genem AtBI-1 może chronić komórki w zawieszonych kulturach tytoniu (BY-2) przed działaniem H₂O₂ i menadionu [57], a w kulturach komórek ryżu przeciwdziałać HR (hypersensitive response), indukowanej przez elicytor ścian patogennego grzyba *Magnaporthe grisea* oraz obumieraniu komórek roślin indukowanemu przez kwas salicylowy [83]. Nadekspresja TaBI-1 (z *Triticum aestivum*) blokuje obumieranie komórek *Nicotiana tabacum* transformowanych genem Bax [102], natomiast transformacja roślin BI-1 z *Solanum lycopersicum* (SlBI-1) i *Capsicum annuum* (CaBI-1) ma cytoochronne działanie obserwowane w liściach i w kulturach komórek tytoniu (BY-2), poddanych działaniu stresom abiotycznym (temperatury i zasolenia) 17 BI-1 z *Nicotiana tabacum* (NtBI-1) i *Brassica napus* (BnBI-1) może w ludzkich komórkach HEK293 przeciwdziałać apoptozie indukowanej przez Bax [10].

W przypadku komórek włókniakomięsaka HT1080 stwierdzono też proapoptotyczne działanie AtBI-1, któremu może zapobiegać kotransfekcja genem BI-1 człowieka [111]. Sugeruje to, że AtBI-1 może powodować obumieranie komórek HT1080 przez kompetycję z ludzkim BI-1. AtBI-1 ma 41% aminokwasową identyczność z BI-1 ssaków, jednak ich koniec karboksylowy jest nieco dłuższy niż u ssaków [55].

BI-1 POWSZECHNIE OBECNE U RÓŻNYCH ORGANIZMÓW

Obecność białka BI-1 (i jego potencjalnych homologów) wykazano u licznych organizmów. Białka te zidentyfikowano na podstawie anty-PCD działania w funkcjonalnym przesiewie bibliotek cDNA różnych gatunków organizmów w drożdżach transformowanych genem Bax ssaków. Dane z piśmiennictwa wskazują, że obecność BI-1 wykryto u:

- ssaków: m.in. u człowieka (*Homo sapiens*, HsBI-1), myszy (*Mus musculus*, MmBI-1), szczura (*Rattus norvegicus*, RnBI-1), a także u świni, owcy i bydła oraz u innych kręgowców: ryb halibuta (*Paralichthys olivaceus*, PoBI-1), danio pręgowatego (*Danio rerio*), rozdymki (*Takifugu obscurus*, PfBI-1); żaby szponiastej (*Xenopus laevis*, XlBI-1);
- bezkręgowców: *Drosophila melanogaster* (DmBI-1), raka luizjańskiego (*Procambarus clarkii*, PcBI-1) i *Hydra vulgaris* (HvBI-1);
- roślin, w tym u: *Arabidopsis thaliana* (AtBI-1), *Brassica napus* (BnBI-1), *Brassica oleracea* (BoBI-1), *Capsicum annuum* (CaBI-1), *Cucumis sativus* (CsBI-1), *Hordeum vulgare* (HvBI-1), *Nicotiana tabacum* (NtBI-1), *Oryza sativa* (OsBI-1), *Ricinus communis* (RcBI-1), *Sorghum bicolor* (SbBI-1), *Solanum lycopersicum* (SlBI-1), *Triticum aestivum* (TaBI-1) i *Zea mays* (ZmBI-1);
- grzybów: BI-1 zidentyfikowano u drożdży pączkujących (*Saccharomyces cerevisiae*, białko Bxi1p (Ynl305c), pasożyta ludzi *Emericella nidulans* (*Aspergillus nidulans*) i pasożyta roślin *Sclerotinia sclerotiorum* (białko ScBI-1);
- bakterii, m.in. *Escherichia coli* (YCCA), *Bacillus subtilis* (BsYetJ), *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. syringae*, *Shigella flexneri* i *Salmonella typhimurium*;
- sekwencje kodujące BI-1-podobne do białka wykryto u wirusów, m.in. ospy krowiej, wielbłąda i małp, cytomegalowirusów ludzkich i szympansa oraz wirusa opryszczki u ludzi.

Przeprowadzone analizy wykazały, że BI-1 w wielokomórkowych organizmach może ulegać powszechnej ekspresji w komórkach całego organizmu, przy czym jego poziom może być organo- i tkankowo zależny. Podwyższony poziom mRNA i białka BI-1 stwierdzano zazwyczaj

<i>O. sativa</i>	1	MDAFYSTSSA	YGAAASGWGY	DSLKNFRQIS	PAVQSHLKLW	YLTLGVALAA	SAVGAYLHVA	60
<i>A. thaliana</i>	1	MDAF-SSSFFD	SQPGSRSSWSY	DSLKNFRQIS	PAMQNHLLRV	YLTLGCAVA	SAPGAYLHVL	59
Człowiek	1	M-----	-NIFDRKINF	DALLKFSHIT	PSTQOHLKKV	YASFALCMFV	AAAGAYVHMV	50
Szczur	1	M-----	-NIFDRKINF	DALLKFSHIT	PSTQOHLKKV	YASFALCMFV	AAAGAYVHV	50
<i>O. sativa</i>	61	LN--IGGMLT	MLGCVGSIAN	LPSVPL--VFE	BRKRFGILLA	AALLEGASVG	PLIKLAVDFD	116
<i>A. thaliana</i>	60	WN--IGGILT	TIGCIQTMIN	LLSCP--PYE	HQKRLSLLFV	SAVLEGASVG	PLIKVAIDVD	115
Człowiek	51	THFIQAGLLS	ALGSLILMIN	LMATPHSHET	EQRRLGLLAG	PAFRTGVVGLG	PALEFCIAVN	110
Szczur	51	TRFIQAGLLS	ALGALALMIC	LMATPHSHET	EQRRLGLLAV	-AFLTGVVGLG	PALELCIAIN	109
<i>O. sativa</i>	117	SSILVTAFFVG	TAIAFGCPTC	AAIVAKRREY	LYLGGLSSG	LSILLWLOFA	ASIFGHSTGS	176
<i>A. thaliana</i>	116	PSILITAFVVG	TAIAFVCFSA	AAMLARRREY	LYLGRLLSSG	LSMLWLOFA	SSIFGGSASI	175
Człowiek	111	PSILPTAFMG	TAMIFTCTFL	SALYARRRSY	LFLGGILMSA	LSLLLSSSLG	NVFFG-SIWL	169
Szczur	110	PSILPTAFMG	TAMIFTCTSL	SALYARRRSY	LFLGGILMSA	MSLMFVSSLG	NLFFG-SIWL	168
<i>O. sativa</i>	177	FMFEVYFGLL	IFLGYMVDYD	QETTERAHHG	DMDYKHALT	LPTDFVAVLV	RILVIMLKNA	236
<i>A. thaliana</i>	176	FKFELYFGLL	IFVGYMVDYD	QELTEKAHLG	DMDYVKHSLT	LPTDFVAVFV	RILVIMLKNS	235
Człowiek	170	FQANLYVGLV	VMCGFVLFDT	QLLIEKAHEG	DKDYIWHCID	LFLDFITVFR	KLMMILAMNE	219
Szczur	169	FQANLYMGLL	VMCGFVLFDT	QLLIEKAHEG	DKDYIWHCID	LFLDFVTLFR	KIMLILAFNE	218
<i>O. sativa</i>	237	SIKSEKKRKK	KRS	249				
<i>A. thaliana</i>	236	AIK-EEKKKK	RRN	247				
Człowiek	220	KIKKKEKK		227				
Szczur	219	KIKKKEKK		226				

Ryc. 1. Porównanie sekwencji aminokwasowej białka BI-1 u *O. sativa*, *A. thaliana*, człowieka i szczura; reszty identyczne są zacienione, myślnik wskazuje przerwy wprowadzone w celu maksymalnego wyrównania (wg [80], zmodyfikowano)

czaj podczas organogenezy i starzenia, a więc podczas zwiększonej umieralności komórek. U ssaków analiza RNA-blot wykazała ekspresję BI-1 m.in.: w sercu, mózgu, łożysku, płucach, wątrobie, mięśniach szkieletowych, nerce, trzustce i łożysku [108], u ryby rozdymki (*Takifugu obscurus*) najwyższy poziom białka Pf-BI-1 wykryto we krwi, mózgu i skrzelach [22], a u raka łuzjańskiego (*Procambarus clarkii*) transkrypty PcBI-1 wykryto w hemocytach, sercu, wątrobotrzustce, skrzelach, żołądku i jelicie [26]. Poziom ekspresji białka Bi-1 może być wyraźnie zależny od rozwoju, np. w jądrach był najwyższy w postmeiotycznych spermatocytach, a w płucach był skorelowany z wysokim stopniem apoptotycznego obumierania komórek (szczególnie komórek mezenchymatycznych) w okresie okołoporodowym [39].

Podobnie jak u zwierząt, u roślin geny BI-1 ulegają ekspresji w tkankach różnych narządów (liściach, korzeniach, łodygach, kwiatach, owocach itd.). Poziom ich ekspresji jest zazwyczaj podwyższony podczas starzenia i w warunkach stresowych, co wskazuje na ich działanie podczas kontroli fizjologicznego obumierania komórki i/lub reakcji na stres abiotyczny i atak patogenów [4, 10, 17, 49, 83, 93, 103]. Poziom transkrypty u *Capsicum annuum* (CaBI-1) był znacznie wyższy w łodygach i korzeniach, co jest prawdopodobnie związane z różnicowaniem ksylemu w tych organach [49]. U pszenicy ekspresja TaBI-1 była najwyższa w liściach, łodygach i korzeniach, a najniższa w pęcicach i ościach owoców [102].

GENY BI-1

Z genomowej analizy DNA-blot wynika, że genomy ssaków i innych organizmów zawierają zazwyczaj jeden locus genu BI-1 [10]. Dwa loci tego genu może mieć *Brassica napus* (BnBI-1) [10] i prawdopodobnie *Capsicum annuum* (CaBI-1) [49]. U *Arabidopsis*, oprócz AtBI-1, zidentyfikowano dwa pokrewne jego homologi (AtBI-2 i AtBI-3) [68]. U kilku gatunków ssaków przeprowadzono mapowanie chromosomów i stwierdzono, że gen BI-1 u szczura jest umiejscowiony w chromosomie 7, u myszy w chromosomie 15, u świni w chromosomie 5, a u człowieka w chromosomie 12q12-q13 [61, 100].

Jean i wsp. [54], badając proces transkrypcji BI-1 u szczura, wykazali, że gen *RnBI-1* zawiera dwa różne promotory TATA-less (P1 i P2) i transkrypty mogą mieć dwa alternatywne miejsca poliadenylacji na końcu 3'. Transkrypty genu BI-1 mogą się różnić rozmiarami, jednak niezależnie od promotora wykorzystanego podczas transkrypcji, syntetyzowane białko jest identyczne, ponieważ kodon start jest umiejscowiony w drugim eksonie. Ekspresja z dystalnego promotora (P2) zachodzi powszechnie w organizmie, stwierdzono ją we wszystkich badanych tkankach (płucach, sercu, wątrobie, nerkach, śledzionie i jądrach). Jest więc regulowana rozwojowo, natomiast z proksymalnego promotora (P1) jest swoista dla jąder. Ta tkankowozależna ekspresja genu BI-1 może być spowodowana wiązaniem różnych czynników transkrypcji: oba promotory mają miejsca wią-

zania dla NF-κB (nuclear factor-κB) i SP1, a tylko P1 zawiera miejsca wiązania dla AP2 (activating protein 2) i CAAT-NF1, natomiast P2 sekwencje wiązania ATF i CAAT-CP2 [54].

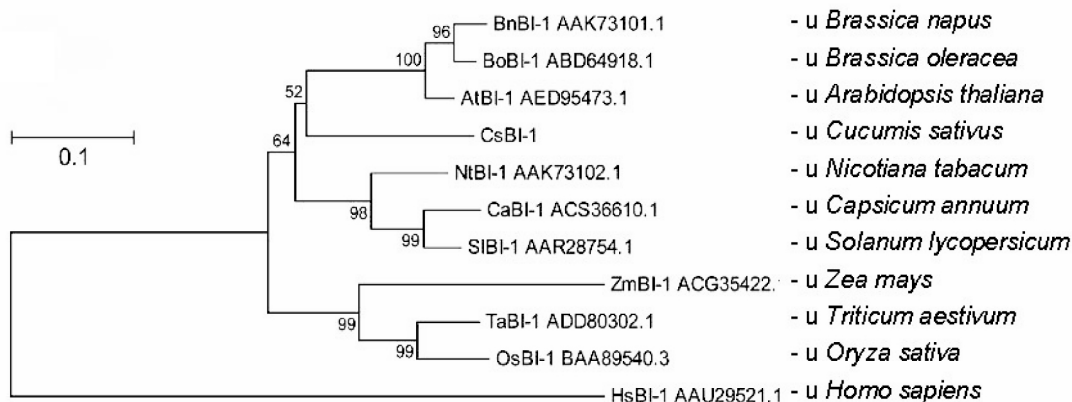
U kilku gatunków roślin scharakteryzowano gen *BI-1*, produkt transkrypcji i kodowane białko. Gen *BI-1* u *Arabidopsis* (*AtBI-1*) zawiera pięć intronów i sześć eksonów. U *Brassica napus* gen (*BnBI-1*) (cały klon cDNA) składa się z 1010 bp, jego ORF (open reading frame) z 741-bp, która koduje 247-aminokwasowe białko o m.cz. 27,5 kDa. Podobnie u *Nicotiana tabacum* gen *NtBI-1* składa się z 1293 bp, jego ORF zawiera 747-bp, która koduje 249-aminokwasowe białko o m.cz. 27,6 kDa [10], a u *Cucumis sativus* gen *CsBI-1* ma ORF zawierający 1142 bp (kodujący 250-aminokwasowe białko), 42-bp 5' region, który nie ulega translacji i 347-bp 3' nieulegający translacji region flankujący ORF [21]. U *Capsicum annuum* gen *CaBI-1* zawiera 57-b 5' region nieulegający translacji i nieulegający translacji region 260-b 3', który flankuje ORF kodujące 248-aminokwasowe białko [49]. Gen i transkrypt *BI-1* scharakteryzowano też u zwierząt, np. u ryby rozdymki (*Takifugu obscurus*) gen *Pf-BI-1* (cały cDNA) zawiera 1387 bp, który obejmuje 5'-UTR - 82 bp, 3'-UTR - 591 bp i ORF - 714 bp kodujący 237-aminokwasowy polipeptyd [22].

Białka *BI-1* u różnych organizmów są bardzo podobne; w Tabeli 1 porównano białka *BI-1* u kręgowców, bezkręgowców, roślin, grzybów, jednokomórkowych Eukaryota i bakterii, a mianowicie: liczbę reszt aminokwasowych tworzących cząsteczki, podobieństwo sekwencji (%), masy molowe i liczbę domen transbłonowych. Z tego zestawienia wynika, że:

- liczba reszt aminokwasów, tworzących cząsteczkę jest mniejsza u ssaków (zazwyczaj 237 aa), zaś większa u bezkręgowców (241-245 aa) i roślin (247-253 aa), a może być wyraźnie większa u grzybów,

- identyczność/podobieństwo sekwencji aminokwasowej uległo zmniejszeniu wraz ze zmniejszaniem pokrewieństwa między taksonami i są stosunkowo najniższe u jednokomórkowych Eukaryota w porównaniu z *HsBI-1* i
- *BI-1* ssaków i badanych grzybów ma 6, a u roślin zazwyczaj 7 domen transbłonowych.

Na pokrewieństwo białek *BI-1* u różnych organizmów może wskazać drzewo filogenetyczne, w którym porównano aminokwasowe sekwencje całych cząsteczek *BI-1*. Rycina 2 przedstawia drzewo filogenetyczne obejmujące *BI-1* kilkunastu gatunków roślin oraz *BI-1* człowieka (*HsBI-1*). Pokrewieństwo między *HsBI-1* i *BI-1* roślin jest dalekie, a wśród roślin widać wyraźne grupowanie się roślin jednoliściennych oraz roślin dwuliściennych, wśród których bliżej spokrewnione są *BI-1* w rodzinie *Solanaceae* oraz *BI-1* w rodzinie *Brassicaceae* [10, 21, 102]. Drzewo filogenetyczne białek *BI-1* odpowiada ewolucyjnej klasyfikacji organizmów. Białka rodziny *TMBIM* tworzą zazwyczaj homooligomery, chociaż odnotowano powstawanie heterooligodimerów *TMBiM6* i *TMBiM3* (które mogą tworzyć kompleksy *TMBiM6-TMBiM3*) [91]. Oligomery są tworzone przez bezpośrednią interakcję między cząsteczkami *BI-1* [1]. Poziom oligomeryzacji jest pH-zależny. W *BI-1* oligomeryzacja była najwyższa w niefizjologicznych warunkach, w pH 5,0. Tak więc większość cząsteczek *BI-1* pozostaje w formie monomerów i chociaż oligomeryzacja może usprawniać transport Ca^{2+} przez błonę, to kanałowa i antyporterowa funkcja *BI-1* może być skutecznie pełniona przez monomery *BI-1* [1]. Poszczególne białka rodziny *TMBIM* mogą się różnić mechanizmem tworzenia dimerów. Wskazują na to badania prowadzone na białku *TMBiM4* (*GAAP*), które jest głównie umiejscowione w błonach AG. Saraiva i wsp. [96] porównali oligomeryzację ludzkiego *TMBiM4* (*hGAAP*) i *TMBiM4* wirusa (*vGAAP*) (z *CMLV*, *Camelpox virus*) i wykazali, że do tworzenia dimerów przez *vGAAP* niezbędna jest obecność



Ryc. 2. Drzewo filogenetyczne białek *BI-1* różnych gatunków roślin w porównaniu z *BI-1* człowieka skonstruowane z użyciem całych cząsteczek białka i metody przyłączania sąsiadów (neighbor joining; wg [26], zmodyfikowano)

cystein umiejscowionych blisko N-końca (Cys9 i Cys60), które są konieczne do tworzenia dwusiarczkowych wiązań między cząsteczkami tego białka. Analogicznie usytuowanych reszt cysteiny nie mają białka BI-1 i hGAAP i tworzenie dimerów u tych białek zachodzi bez tworzenia wiązań dwusiarczkowych [96].

CZĄSTECZKI BI-1 TWORZĄ pH – ZALEŻNY KANAŁ DO UWALNIANIA Ca^{2+} Z ER

W cytoochronnej funkcji BI-1 istotna jego rola polega na wpływie na utrzymanie homeostazy Ca^{2+} . BI-1 może wpływać na homeostazę Ca^{2+} w różny sposób, może działać jako antyporter Ca^{2+}/H^+ [18, 60, 70], może też zwiększać wrażliwość IP_3R na IP_3 (IP_3R - inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP_3 - inositol 1,4,5-trisphosphate) [63], poza tym istotna jest możliwość uwalniania jonów Ca^{2+} z ER przez kanały Ca^{2+} tworzone przez cząsteczki BI-1. Chang i wsp. [19] prowadzili badania *in vitro* na bakteryjnym (z *Bacillus subtilis*) homologue BI-1 (BsYetJ) i wykazali, że to białko tworzy kanał umożliwiający wypływ Ca^{2+} z ER, przy czym zależnie od pH może on mieć konformację zamkniętą lub otwartą (Ryc. 3). Kanał jest tworzony przez odpowiednie ułożenie α -helikalnych transbłonowych domen BI-1. BsYetJ ma siedem takich domen (TMD1-7). Przy wyższym pH (8,0) tworzą zwartą, podobną do beczułki, zamkniętą konformację, natomiast przy niższym pH (6,0), dzięki przemieszczeniu TMD2, mają konformację otwartą, która tworzy por przez dwuwarstwę lipidową. W utworzeniu konformacji otwartej (w pH 6,0) uczestniczą ogólnie trzy składniki cząsteczki BI-1: TMD1 do TMD3, TMD4 do TMD6 i TMD7, przy czym TMD1 do TMD3 i TMD4 do TMD6 podobnie tworzą potrójne struktury kanapki: TMD3 jest ograniczony przez heliks-pętla-heliks TMD1 i 2; a TMD6 jest ograniczony przez heliks-pętla-heliks TMD4 i 5. Centralną strukturą jest C-końcowy TMD7, który jest równoległy do TMD3 i przeciwrównoległy do TMD6. Te trzy heliksy razem tworzą centralną warstwę otoczoną przez cztery peryferyjne heliksy TMD1, 2, 4 i 5. W konformacji zamkniętej (w pH 8,0) TMD2 i cytoplazmatyczne pętle L2,3 (łącznie TMD2-TMD3) mają wiele wiązań wodorowych, które są rozrywane podczas tworzenia konformacji otwartej (w pH 6,0). W konformacji zamkniętej podstawowa jest interakcja Arg60 z jednostką diaspartylową Asp171-Asp195. W pH 8,0 tworzone są podwójne wodorowe wiązania między Arg60 i Asp171, które są rozrywane w pH 6,0 i ponownie tworzone w pH 8,0 [19]. Funkcjonowanie kanału Ca^{2+} utworzonego przez BI-1, jest więc pH-zależne. Sensorem pH zidentyfikowanym w C-końcowym regionie BI-1 jest motyw bogaty w lizynę (EKDKK-KEKK) [60]. O znaczeniu Asp-213 w tworzeniu kanału świadczy utrata tej zdolności po zamianie tego aminokwasu na argininę. Ca^{2+} wypływa przez kanały utworzone przez BI-1 niezależnie od innych kanałów transportu Ca^{2+} (IP_3Rs , RyRs, translokonów i presenilin) [13]. Chociaż przeciwdziałanie obumieraniu komórek przez BI-1 może zależeć od innych transporterów Ca^{2+} , AtBI-1 nie przeciwdziałał śmierci komórki u mutantów drożdży pozbawionych Pmr1 i Spf1, które są białkami homologicznymi z pompami SERCA (sacroplasmic/endoplasmic reticulum

Ca^{2+} -ATPase), umiejscowionymi, odpowiednio w błonach GA i ER [94]. Utworzenie kanału przepuszczającego Ca^{2+} , wymaga zaangażowania dwóch reszt Asp (D188 i D213), które zawierają zwierzęce BI-1, natomiast analogicznie usytuowanych reszt Asp nie ma w BI-1 roślin i drożdży i u tych organizmów BI-1 nie tworzy kanałów transportu Ca^{2+} [13]. Tak więc antyapoptotyczne działanie BI-1, przynajmniej u zwierząt, może polegać na bezpośrednim udziale tego białka w uwalnianiu Ca^{2+} z ER.

BI-1 MOŻE BEZPOŚREDNIO FIZYCZNIE WIĄZAĆ SIĘ Z INNYMI BIAŁKAMI

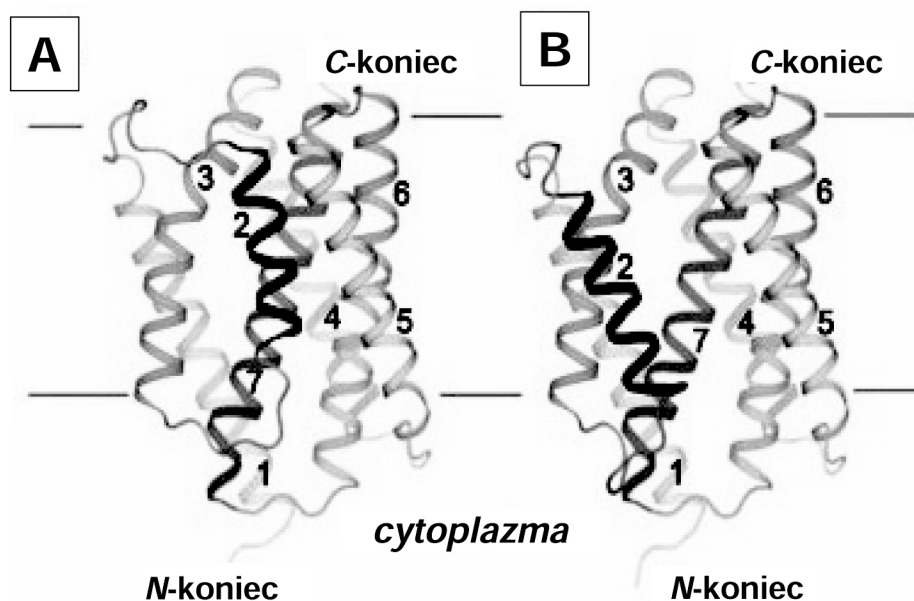
Na mechanizm działania BI-1 może wskazywać zdolność do tworzenia kompleksów z białkami uczestniczącymi w szlakach regulacji różnych procesów komórkowych. W badaniach przeprowadzonych na *Arabidopsis thaliana* infekowanych grzybem *Erysiphe cruciferarum* stwierdzono koimmunoprecypitację BI-1 z 95 białkami [105]. BI-1 może się wiązać z integralnymi białkami błon, a także z białkami obecnymi w cytozolu. Wykazano, że białko BI-1 może wchodzić w bezpośrednią, fizyczną interakcję i tworzyć kompleks z: antyapoptotycznym białkiem Bcl-2, aktyną, CaM (calmodulin), cytochromem b5 (cb5), NPR (NADPH-dependent cytochrome P450 oxidoreductase), CYP83A1 (cytochrome P450 83A1), IRE1 α (inositol-requiring enzyme 1 α), IP_3R (inositol-requiring enzyme 1 α , receptor) i NleH, które jest antyapoptotycznym białkiem wydzielanym przez patogenne bakterie.

Interakcja BI-1 z białkiem Bcl-2

Na bezpośrednie oddziaływanie między BI-1 z antyapoptotycznym białkiem Bcl-2 wskazują badania prowadzone na subkomórkowych frakcjach, ponieważ oba te białka mogą być umiejscowione w błonach tych samych organeli. Testowanie mutantów Bcl-2 z delecją różnych fragmentów tego białka i mutantów białka BI-1 z delecją C-końca wykazało, że wiązanie Bcl-2 z BI-1 wymaga motywu BH4 białka Bcl-2. BI-1 tworzy kompleks tylko z antyapoptotycznymi białkami rodziny Bcl-2 (Bcl-2 i Bcl-X_L), które mają motyw BH4, natomiast nie wiąże się proapoptotycznymi białkami (np. Bax), które nie mają tego motywu [108]. Wiązanie BI-1 z Bcl-2 może zwiększać antyapoptotyczne działanie białka Bcl-2 [17, 108].

Interakcja BI-1 z aktyną

BI-1 może wiązać cząsteczki G-aktyny, ułatwiać jej polimeryzację, zwiększać ruchliwość i adhezję komórki [69]. Wykazano, że polimeryzacja aktyny i adhezja komórek z nieaktywnym genem BI-1(-/-) i transformowanych swoistym małym interferencyjnym RNA (siRNA – small interfering RNA) jest zmniejszona w porównaniu z komórkami kontroli [69]. Także mutacja z delecją C-końca BI-1 (Δ C-BI-1) zmniejsza stosunek F-aktyny do G-aktyny. BI-1 oddziałuje z G-aktyną poprzez leucynę 221 i 225 [39, 69]. BI-1, przez wpływ na polimeryzację aktyny i adhezję komórek, może odgrywać ważną rolę w tworzeniu przerzutów przez liczne nowotwory.



Ryc. 3. Struktura analogicznego do BI-1 białka bakterii (BsYetU); A - w pH 8 (kanał Ca^{2+} zamknięty), B - w pH 6 (kanał Ca^{2+} otwarty). Numerowane wstążki – kolejne α -helikalne transbłonowe domeny połączone pętlami zlokalizowanymi poza błonę. Koniec C – przy domenie 7; koniec N – przy domenie 1 (wg [24], zmodyfikowano)

Interakcja BI-1 z CaM

Antyapoptotyczna rola BI-1 może być związana z wpływem na sygnalizację Ca^{2+} , w tym na zdolność wiązania tych jonów przez kalmodulinę (CaM), która po związaniu z licznymi białkami efektorowymi, takimi jak: czynniki transkrypcyjne, kinazy proteinowe, enzymy metabolizmu, kanały jonowe, przenośniki i białka cytoszkieletu, pośredniczy w przekazywaniu sygnału Ca^{2+} [48, 56]. U *Arabidopsis*, której genom zawiera siedem genów CaM, AtBI-1 może wiązać AtCaM7, AtCaM3 i AtCaM6. Wykazano też, że AtBI-1 może wiązać HvCaM3 z żyta [48]. Dla interakcji BI-1 z CaM konieczny jest C-koniec białka BI-1, co wskazuje, że ten koniec zawiera region jej wiązania. Zdolności wiązania CaM nie ma mutant pozbawiony C-końca, a także substytucja w końcu C reszt aminokwasów zasadowych przez aminokwasy obojętne [56].

Interakcja BI-1 z Cb5

Białko BI-1 może się wiązać z cytochromem b5, który następnie wiąże FAH (fatty acid hydroxylase) – enzym katalizujący syntezę prekursorów sfingolipidu i w ten sposób BI-1 uczestniczy w syntezie kwasów tłuszczowych [85]. U drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) AtBI-1 wiąże się bezpośrednio ScFAH1 (FAH1 – fatty acid hydroxylase 1), która w końcu N ma domenę Cb5-podobną. Takiej domeny nie mają AtFAH1 i AtFAH2 (funkcjonalne homologi ScFAH1) i łączą się z AtBI-1 poprzez Cb5. AtBI-1 może więc funkcjonować jako platforma dla interakcji między AtCb5 i AtFAH [85]. U zwierząt i roślin Cb5 jest umiejscowiony

głównie w błonach ER i przenosi elektrony między NPR i reduktazą NADH-cytochromu b5 [97]. U *Arabidopsis* zidentyfikowano cztery izoformy Cb5 (AtCb5B-E) i wszystkie mogą być wiązane przez BI-1 [82, 85]. Zidentyfikowano też umiejscowione w cytoplazmie desaturazy sfingolipidów, tj.: białka AtSLD1 i AtSLD2, które (podobnie jak ScFAH drożdży) także mają domenę Cb5-podobną (Cb5LD) i które mogą bezpośrednio oddziaływać z BI-1 [85].

Interakcja BI-1 z NPR

BI-1 może fizycznie oddziaływać z NADPH-zależną oksydoreduktazą cytochromu (fotochlorofilidu) P450 (NPR). To białko jest wiązane przez C-terminalną domenę BI-1 [107]. Cytochromy P450 są dużą grupą białek hemowych, które są wykorzystywane podczas oksydacji substratów endogennych (takich jak sterole) i związków egzogennych (np. leki, toksyny i prokarcynogeny) [21]. BI-1 po związaniu z NPR może indukować jego dysocjację od cytochromu P450 2E1 i w ten sposób redukuje transfer elektronów między tymi białkami, hamując akumulację ROS (reactive oxygen species) tworzonego w ER [59]. W hepatocytach myszy BI-1^{-/-} ekspresja P450 2E1 i peroksydacja lipidów błony ER była wyraźnie większa niż u myszy dzikich (BI-1^{+/+}) [73].

Interakcja BI-1 z CYP83A1

BI-1, chociaż z mniejszym powinowactwem niż z NPR, wiąże się z izoenzymem 2E1 cytochromu P450 (CYP2E1) [59, 105]. Te białka na błonie ER są wiązane przez C-końcowy region BI-1. W komórkach linii 293T kotransformowanych zmuto-

wanym genem BI-1 (z delecją C-końca, CDBI-1) i genem NPR lub P450 2E1 oraz po stosowaniu przeciwciał anty-C-końcowemu regionowi BI-1, nie stwierdzono redukcji akumulacji ROS przez BI-1. W ER głównym źródłem ROS jest system MMO (microsomal monooxygenase) składający się z cytochromu P450 (P450), NPR i fosfolipidów. Chociaż główną funkcją MMO jest utlenianie egzogennych substancji (ksenobiotyków) i endogennych substratów, to prowadzi to też do uwalniania znacznych ilości ROS [59]. Podczas stresu ER nadekspresja BI-1, przez wiązanie z P450 2E1, redukuje interakcję NPR z P450 2E1, obniża katalityczną aktywność P450 2E1 i hamuje przepływ elektronów z NPR do P450 2E1, zmniejszając wytwarzanie ROS na błonie ER [59].

Interakcja BI-1 z IRE1 α

BI-1 może także bezpośrednio fizycznie oddziaływać z IRE1 α , który znajduje się w błonie ER i jest głównym sensorem stresu ER przenoszącym sygnał stresu ER do jądra i cytoplazmy [80]. Związanie IRE1 α w kompleksie BI-1/IRE1 α hamuje aktywację IRE1 α , jego autofosforylację i endorybonukleazową aktywność dla cięcia mRNA XBP. Białko XBP-1 (X-box-binding protein 1) zwiększa ekspresję genów przeciwdziałających gromadzeniu się w ER źle sfałdowanych białek (chaperonów i proteaz, które rozpraszają agregaty białek). BI-1, wpływając na szlak IRE1 α -XBP-UPR, może przeciwdziałać indukcji obumierania komórek indukowany przez stres ER [80]. BI-1 przez kontrolę aktywności IRE1 α hamuje też autofagię [16, 80]. Aktywność IRE1 α jest hamowana po bezpośrednim związaniu z C-końcową domeną BI-1.

Interakcja BI-1 z IP₃R

BI-1 bezpośrednio może oddziaływać z receptorami IP₃R, które są regulowane przez aktywowany wtórny przekaźnik IP₃ (inositol 1,4,5-trisphosphate). IP₃R w błonie ER tworzą kanały, przez które jony Ca²⁺ są gromadzone w świetle ER i pośredniczą w transporcie Ca²⁺ z ER do mitochondriów [63, 95]. Stwierdzono, że koimmunoprecypitacja BI-1 jest skorelowana z IP₃R i następuje wiązanie domeny porowej kanału Ca²⁺ IP₃R z domeną tworzącą kanał Ca²⁺ w BI-1 (w HsBI-1 aminokwasy 198-217). Tak więc BI-1 może wpływać na homeostazę Ca²⁺ w komórkach także przez bezpośrednie wiązanie C-końcowej domeny BI-1 z kanałami IP₃R [13]. Aktywność kanałów IP₃R jest też modyfikowana przez bezpośrednie wiązanie antyapoptotycznego białka z rodziny Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X_L) [20, 92].

EKSPRESJA BI-1 PODCZAS ROZWOJU ORGANIZMÓW

Hormony i regulatory wzrostu u zwierząt oraz fitohormony u roślin tworzą w organizmach złożoną sieć sygnalizacyjną, która reguluje procesy wzrostu i różnicowania, starzenia i śmierci organizmu, a także uczestniczy w odpowiedzi na stres abiotyczny i biotyczny. Realizacja planu morfogenetycznego organizmu podczas ontogenezy, która obejmuje też PCD, wymaga zróżnicowanej ekspresji stymulatorów i inhibitorów wzrostu, a także zróżnicowanego poziomu białek pro- i antyapoptotycznych. U ssa-

ków wyższym poziomem ekspresji BI-1 charakteryzowało się serce, mózg, płuca, wątroba, mięśnie szkieletowe, nerki, trzustka i łożysko [108]. Przykładem wyraźnie zależnego od rozwoju poziomu tego białka w jądrach jest najwyższa jego ekspresja w postmeiotycznych spermatocytach, a w płucach była skorelowana z wysokim stopniem apoptotycznego obumierania komórek (szczególnie komórek mezenchymatycznych) w okresie okołoporodowym [39]. U roślin, podobnie jak u zwierząt, geny *BI-1* ulegają ekspresji w tkankach różnych narządów, przy czym jest ona zazwyczaj podwyższona podczas starzenia i w warunkach stresowych, może się też zmieniać podczas rozwoju organizmu i zależeć od rozwoju [17, 49, 93, 103]. Znacznie wyższy poziom BI-1 w łodygach i korzeniach jest prawdopodobnie związany z różnicowaniem ksylemu w tych organach [49].

Wśród fitohormonów są regulatory wzrostu, które przejawiają zazwyczaj inhibitorowe działanie szczególnie w warunkach stresu. Te substancje funkcjonują jako „hormony stresu”, do których zaliczono: kwas salicylowy (SA), jasmonian metylu (JA-Me), etylen (ET), kwas abscysynowy (ABA), a także wyższe stężenia cytokin (CK), które także mogą przyspieszać starzenie i indukować PCD [9, 49, 57, 102]. Ze skutkami starzenia i obumierania komórek, które są indukowane przez „hormony stresu” może być związany ich wpływ na ekspresję BI-1. Pomiar poziomu BI-1 w tkankach oraz po egzogennym stosowaniu różnych stężeń tych substancji wykazały, że mogą zwiększać poziom BI-1.

Kwas salicylowy (SA)

Może indukować PCD, co przejawia się zwiększoną umieralnością komórek w procesie HR podczas stresu biotycznego, odgrywa też główną rolę w nabytej odporności systemicznej. Wyższe stężenia egzogennego SA (1 mM) powodują w korzeniach pomidora szybkie (po 6 godz.) zwiększenie wypływu elektrolitów, zwiększenie aktywności proteolitycznej (swoistych proteaz cysteinowych), a także obniżenie poziomu inhibitorów proteaz (SlPI2 i SLTC), co powoduje zmniejszenie zawartości białek w komórkach [65]. W roślinach i kulturach komórkowych poddanych działaniu SA stwierdzono wyraźne zwiększenie akumulacji mRNA i białka BI-1 [57, 102]. Nadekspresja BI-1 znacznie zmniejsza wrażliwość komórek na SA [57, 102]. Anty-SA działanie BI-1 wymaga obecności całej cząsteczki tego białka wraz C-końcem [57].

Jasmonian metylu (JA-Me)

W starzejących się liściach poziom JA-Me może się zwiększać nawet 4-krotnie. Działanie JA-Me jest związane z aktywacją Ca²⁺-zależnej kinazy MPK6. Mutacja genu *mpk6* opóźnia starzenie indukowane przez JA-Me [112]. Konstytutywna ekspresja *AtBI-1* opóźnia starzenie, natomiast u *Arabidopsis* ze zmutowanym genem *atbi-1* obserwowano przedwczesne starzenie liści. Przejściowe zwiększenie poziomu BI-1 stwierdzono m.in. podczas starzenia liści *Brassica oleracea* i *Ipomoea petals* [18, 109].

Nadekspresja AtBI-1 obniża poziom Ca^{2+} w cytozolu i opóźnia indukcję starzenia przez Ja-Me poprzez hamowanie Ca^{2+} -zależnej aktywacji MPK6 [112].

Etylen (ET)

Może wpływać na morfogenezę roślin, przy czym najbardziej znanym jego działaniem jest stymulacja starzenia roślin (liści i płatków kwiatów) oraz dojrzewania owoców). Objawy PCD obserwowano m.in. w owocach ogórka (*Cucumis datus*) poddanych działaniu ciągłej ekspozycji na etylen. W badaniach prowadzonych na kulturach komórek tytoniu (BY-2) stwierdzono, że ET indukuje PCD w G2/M cyklu komórkowego [40]. ET może indukować syntezę BI-1. Znaczne (około 2-krotne) i szybkie zwiększenie ekspresji TaBI-1 stwierdzono m.in. w liściach siewek *Triticum aestivum* poddanych działaniu ET [102].

Kwas abscysynowy (ABA)

Jest fitohormonem, który zazwyczaj ma inhibitorowe działanie podczas rozwoju roślin przejawiające się m.in. indukcją spoczynku nasion i hamowaniem procesu ich kiełkowania, hamowaniem wzrostu roślin, a także indukcją starzenia i odrzucania organów. Jego poziom zwiększa się w reakcji na stres abiotyczny (chłodu, suszy, stresu osmotycznego, podtopienia roślin itp.). W badaniach prowadzonych na siewkach *Capsicum annum* i *Triticum aestivum* stwierdzono, że egzogenny ABA (w stężeniu 100 μ M) już po 1 h silnie indukuje ekspresję, odpowiednio CaBI-1 i TaBI-1 [49, 102].

Cytokiny (CK)

Są strukturalnie zróżnicowaną grupą pochodnych N6-puryn. Tradycyjnie są uważane za hormony anty-PCD, ponieważ u roślin promują proliferację i różnicowanie komórek, a także opóźniają starzenie. Wykazano jednak, że wyższe stężenia CK mogą indukować PCD w roślinach i w kulturach komórkowych (np. *Arabidopsis thaliana*, *Daucus carota* i *Nicotiana tabacum*) [14]. Badania Bolduc i wsp. [9] prowadzone na kulturach komórek tytoniu wykazały, że wpływ egzogennych CK na syntezę BI-1 jest zależny od ich stężenia – skutek stymulacji ekspresji tego białka stwierdzono tylko po stosowaniu niższych stężeń CK 0,1–10 μ M), nie stwierdzono natomiast wpływu CK na poziom BI-1 po stosowaniu wyższych, toksycznych stężeń (25–50 μ M), które powodowały indukcję PCD. Przy niższych stężeniach CK zwiększała się akumulacja białka BI-1 bez wpływu na zawartość mRNA BI-1, natomiast po ekspozycji na wyższe stężenia CK nie stwierdzono podwyższenia poziomu białka, chociaż poziom BI-1 mRNA ulegał zwiększeniu. Akumulacja białka BI-1 w komórkach poddanych działaniu CK nie jest bezpośrednio zależna od Ca^{2+} [9]. Badania prowadzone na roślinach wskazują, że wraz ze zwiększeniem poziomu substancji, które podczas ontogenezy zwiększają umieralność komórek, następuje nasilenie ekspresji antyapoptotycznego białka BI-1. Jest istotne, że SA, adenina i pochodne adenozyny o CK aktywności, opisywane jako hormony roślinne, mogą hamować

proliferaację i indukować obumieranie komórek zwierzęcych (w tym komórek nowotworowych) [30, 50], chociaż nie wiadomo, czy ich działanie jest także związane z wpływem na poziom BI-1.

WPŁYW BI-1 NA PROCESY KOMÓRKOWE

Różne czynniki endogenne i środowiskowe mogą powodować dysfunkcje komórek i zmniejszać ich żywotność. W przeżyciu komórek istotną rolę pełni białko antyapoptotyczne, w tym białko BI-1. W mechanizmie prożyciowego działania BI-1 istotne znaczenie ma wiązanie przez jego C-koniec różnych białek uczestniczących w licznych procesach i szlakach sygnalizacyjnych [91].

ROLA BI-1 PODCZAS STRESU ER

Retikulum endoplazmatyczne jest bardzo dynamiczną organellą, która pełni co najmniej kilka ważnych swoich funkcji: uczestniczy w syntezie określonych białek, ich potranslacyjnym modyfikacjom, translokacji, transporcie pęcherzyków do innych organelli, jest też magazynem Ca^{2+} i ma istotne znaczenie w utrzymaniu homeostazy Ca^{2+} . Zakłócenia w funkcjonowaniu ER mogą powodować nagromadzenie w świetle tych organelli białek nieprawidłowych, źle sfałdowanych, co prowadzi do stresu ER. Akumulacja takich nieprawidłowych białek w ER może uaktywnić UPR (unfolded protein response), która głównie pełni naprawczą, adaptacyjną rolę i może spowodować odzyskanie homeostazy ER. Reakcja na stres ER jest inicjowana wówczas, gdy ilość nieprawidłowych białek przekracza zdolność opiekuńczego działania chaperonów ER (BiP/Grp78) [71].

U ssaków sensorami w UPR, które przenoszą sygnał stanu sfałdowania białek do cytozolu i jądra, są trzy białka umiejscowione w błonach ER, tj. IRE1 α , ATF6 (activating transcription factor 6) i PERK (PERK – protein kinase-like ER kinase), z których najbardziej konserwatywnym (i jedynym u drożdży) sensorem stresu ER jest IRE1 α . IRE1 α jest serynowo/treoninową kinazą/endonukleazą, która po dimeryzacji i autofosforylacji, dzięki aktywności endonukleazowej rozcina mRNA XBP-1. Białko XBP-1 jest czynnikiem transkrypcyjnym, który aktywuje docelowe geny aktywowane przez UPR, w tym: chaperonów ER, proteaz rozpraszających agregaty białek oraz genów ERAD (ER associated degradation) [43, 80]. Produkty tych genów umożliwiają zmniejszanie ilości źle i niesfałdowanych białek w ER, co może powodować odzyskanie homeostazy ER, jednak skuteczność tego przeciwdziałania stresowi ER jest ograniczona i długo trwający stres prowadzi do indukcji PCD. Aktywacja i inaktywacja sygnału IRE1 α jest modulowana przez różne substancje tworzące na ER kompleks zwany UPR-osomem [43]. IRE1 α na błonie ER tworzy sygnalizacyjną platformę, może bowiem wiązać białka adaptorowe kontrolujące aktywację szlaków JNK (c-Jun N-terminal kinase), ERK (extracellular-signal regulated kinase) i NF- κ B [42].

Stres ER podwyższa poziom białka BI-1 [7, 18, 104]. Mechanizm działania BI-1 polega na jego bezpośredniej interakcji z cytoplazmatyczną domeną IRE α , co w konsekwencji hamuje aktywność tego sensora stresu ER i zmniejsza tworzenie mRNA XBP-1. U myszy pozbawionych BI-1 stwierdzono hiperaktywację szlaku IRE1 α [80] i nasilenie obumierania komórek poddanych działaniu stresu ER. BI-1 przez wiązanie IRE α może podczas stresu ER wpływać także na inne procesy. Wiązanie BI-1 z IRE α może hamować autofagię, ponieważ aktywna IRE α może wiązać adapterowe białko TRAF2, a to wpływa na sygnał JNK [16], która fosforyluje Bcl-2 i uwalnia beklinę-1, która jest niezbędnym aktywatorem autofagii [87]. BI-1 przez hamowanie aktywności IRE α hamuje autofagię, wiadomo jednak, że białko BI-1 może też nasilać autofagię podczas głodzenia pokarmowego. To drugie działanie może być związane z wpływem BI-1 na ogólną bioenergetykę komórki, z obniżeniem poziomu ATP i wykorzystania O₂ przez mitochondria, co może zależeć od transportu Ca²⁺ do mitochondriów przez IP₃R. Stwierdzono też, że interakcja BI-1 z IRE1 α wpływa *in vivo* na metabolizm glukozy. U otyłych myszy, u których była spowodowana dieta lub warunkowana genetycznie, w wątrobie i mięśniach stwierdzono obniżony poziom BI-1. Nadekspresja BI-1 (po transformacji genem adenowirusa) u otyłych myszy poprawia metabolizm glukozy, co jest związane z hamowaniem sygnału IRE1 α przez tworzenie kompleksu BI-1-IRE α [41].

W reakcji na stres ER uczestniczą białka rodziny Bcl-2. Proapoptotyczne białka rodziny Bcl-2 (Bax i Bak) oraz białka podrodziny BH3-only (BIM i PUMA) przez fizyczne wiązanie mogą stymulować aktywność IRE1 α [41, 90]. Białka te mogą rywalizować z BI-1 w wiązaniu z UPR-somami [80]. UPR może powodować nadekspresję białek podrodziny BH3-only (BIM i PUMA). Podczas stresu ER w komórkach pozbawionych BIM i PUMA następuje wczesna inaktywacja sygnału IRE α , redukcja splicingu XBP-1 i zmniejszenie ekspresji genów aktywowanych przez XBP-1 [90]. Badania Chonghaile i wsp. [24] wskazują, że białko Bcl-2 może regulować amplitudę sygnału UPR. Jego nadekspresja może zwiększać aktywność IRE α i podtrzymywać tworzenie XBP-1, jednak prawdopodobnie nie polega to na bezpośrednim wiązaniu się z IRE α , natomiast to białko może działać pośrednio przez wiązanie się z BI-1 [24]. Wiadomo też, że pro-PCD działanie stresu ER jest związane ze zwiększeniem tworzenia ROS i zakłóceniem homeostazy Ca²⁺, którym przeciwdziała podwyższenie poziomu BI-1 [39, 59].

BIĄTKO BI-1 PRZECIWDZIAŁA UTRACIE KOMÓRKOWEJ HOMEOSTAZY Ca²⁺

Jony Ca²⁺ są jednym z głównych wtórnych przekaźników, powszechnie uczestniczącym u eukariontów w regulacji procesów wzrostu i rozwoju, a także w reakcji na stres biotyczny i abiotyczny. Utrzymanie homeostazy Ca²⁺ warunkuje prawidłowy przebieg licznych procesów komórkowych i przeciwdziałania PCD. Sygnatura wapniowa jest związana z mechanizmami szybkiej zmiany stężenia jonów wapnia w cytozolu. Zawartość Ca²⁺ w cytozolu jest

utrzymywana na niskim poziomie (około 100 nM), natomiast jest wielokrotnie wyższa (0,3–0,5 mM) w miejscach gromadzenia Ca²⁺ (ER, GA, a u roślin także w wakuoli). W generowanie czasowo-przestrzennego cytoplazmatycznego sygnału Ca²⁺ (sygnatury wapniowej) indukowanego przez liczne czynniki rozwojowe i środowiskowe są zaangażowane liczne kanały wapniowe, kanały IP₃R, które współdziałając z pompami wapniowymi (Ca²⁺-ATP-azy) oraz kotransporterami wapniowymi (Ca²⁺/H⁺) mogą powodować, zależne od siły i czasu działania bodźca, lokalne lub obejmujące całą komórkę swoiste zwiększenie poziomu Ca²⁺ w cytozolu [35]. Wysoki poziom Ca²⁺ w ER powoduje zwiększenie poziomu Ca²⁺ w cytozolu co szybko zwiększa Ca²⁺ w mitochondriach, gdzie po przekroczeniu określonego progu jest nieodwracalnym sygnałem inicjowania apoptozy. Chociaż pobieranie Ca²⁺ przez mitochondria może aktywować ich metabolizm, to znaczne podwyższenie zawartości Ca²⁺ zakłóca funkcję tych organeli polegając m.in. na depolaryzacji błon, utracie ATP, tworzeniu ROS i uwalnianiu cytochromu c (i innych proapoptotycznych białek) z przestrzeni międzybłonowej przez PTP. Nadmierne gromadzenie Ca²⁺ w ER powoduje więc obumieranie komórki, prowadzi bowiem do aktywacji Bax i Bak oraz zwiększenia przepuszczalności PTP dla czynników proapoptotycznych, natomiast obniżenie poziomu Ca²⁺ w ER przez antyapoptotyczne białka (BI-1, Bcl-2, Bcl-X_l) jest sygnałem przeżycia [19]. Tak więc uwalnianie Ca²⁺ z ER może indukować PCD, natomiast substancje przeciwdziałające wpływowi Ca²⁺ z miejsc ich gromadzenia mogą działać cytoochronnie.

Przeciwdziałanie przez BI-1 utracie komórkowej homeostazy Ca²⁺ jest przede wszystkim związane z ich wpływem na zawartość Ca²⁺ w ER i wpływem tych jonów z ER. Białko BI-1 jest umiejscowione głównie w błonie ER może więc uczestniczyć w regulacji transportu Ca²⁺ przez ich błony i w ten sposób wpływać na homeostazę Ca²⁺ i przeciwdziałać indukcji PCD. W licznych badaniach wykazano, że BI-1 wpływa na poziom Ca²⁺ w ER i ich transport do cytozolu [9, 60, 106, 107]. Stwierdzano bowiem, że nadekspresja BI-1 powoduje obniżenie poziomu Ca²⁺ w ER, natomiast komórki bez tego białka (BI-1^{-/-}) mają zwiększony poziom Ca²⁺ w tych organelach [18]. Anty-PCD działanie BI-1 może więc zachodzić przez wpływ na homeostazę Ca²⁺ i polegać na obniżeniu zawartości Ca²⁺ w ER, uwalnianiu Ca²⁺ do cytoplazmy, co zmniejsza akumulację Ca²⁺ w mitochondriach, przeciwdziałając otwieraniu porów PTP i aktywacji kaspaz [18, 107]. Rojas-Rivera i Hetz [91], omawiając wpływ BI-1 na homeostazę Ca²⁺, wyróżnili trzy główne mechanizmy wyjaśniające jego działanie:

- BI-1 może mieć właściwości kanałów Ca²⁺ [13, 19, 60],
- może działać jako antyporter Ca²⁺/H⁺ [18, 60, 70] oraz
- może funkcjonować jako białko zwiększające wrażliwość IP₃R [63].

Istotne znaczenie we wpływie BI-1 na homeostazę Ca^{2+} może mieć bezpośrednie uwalnianie jonów Ca^{2+} z ER przez kanały tworzone przez cząsteczki BI-1 [13, 15, 19]. Te kanały funkcjonują niezależnie od innych kanałów i innych mechanizmów transportu Ca^{2+} (translokonów i presenilin) [13]. Tworzenie takich kanałów i ich pH-zależne otwieranie/zamykanie związane ze zmianami struktury cząsteczki BI-1 opisano wyżej.

Utworzenie kanału wypływu Ca^{2+} , wymaga zaangażowania dwóch reszt Asp (D188 i D213), które zawierają zwierzęce BI-1, natomiast analogicznie usytuowanych reszt Asp nie ma w BI-1 roślin i drożdży i u tych organizmów BI-1 nie tworzy kanałów transportu Ca^{2+} [13]. Tak więc antyapoptotyczne działanie BI-1, przynajmniej u zwierząt, może polegać na bezpośrednim udziale tego białka w uwalnianiu Ca^{2+} z ER.

Funkcje sygnałowe w komórce pełnią jony wapnia, ale odpowiedź na różnorodne bodźce jest przenoszona na elementy efektorowe przez specjalne białka sensorowe (CPB – Ca^{2+} -binding protein), takie jak: kalmodulina (CaM), białka podobne do kalcyneuryny B (CBL), czy kinazy zależne od wapnia (CDPK) [35]. Te sensory po związaniu Ca^{2+} przenożą sygnał Ca^{2+} do białek docelowych, które współdziałając z innymi szlakami sygnalizacyjnymi, regulują liczne procesy komórkowe. CaM jest białkiem powszechnie występującym w komórkach eukariontów i uczestniczy w regulacji aktywności licznych białek zaangażowanych w przebieg różnych procesów komórkowych. Białko BI-1 wpływa na wapniowy szlak sygnalizacyjny nie tylko przez udział w uwalnianiu Ca^{2+} z ER, ale także przez wpływ na transdukcję sygnału Ca^{2+} przez kalmodulinę. Wykazano, że C-koniec białka BI-1 bezpośrednio oddziałuje z kalmoduliną [48] i ta interakcja może być jednym z głównych czynników regulujących żywotność komórki [48], a jego odcięcie pozbawia zdolności do interakcji z CaM [57]. W anty-PCD działaniu BI-1 istotne znaczenie ma wpływ tego białka na homeostazę Ca^{2+} , a także przez interakcję z CaM i transdukcję sygnału Ca^{2+} [48].

Oprócz białka BI-1 (i innych białek rodziny TMBIM), w komórkach zwierząt analogiczny wpływ na żywotność komórki, w tym utrzymanie homeostazy Ca^{2+} , obniżanie poziomu Ca^{2+} w ER i regulację wypływu Ca^{2+} z ER mają antyapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X_l) [107], co może wynikać z bezpośredniej fizycznej interakcji między białkami BI-1 i Bcl-2 [18, 107], przy czym w komórkach pozbawionych BI-1 redukcja poziomu Ca^{2+} w ER przez Bcl-2 jest wyraźnie zmniejszona. Wskazuje to, że BI-1 jest niezbędny do obniżania poziomu Ca^{2+} w ER przez Bcl-2 i że BI-1 funkcjonuje w szlaku poniżej Bcl-2 [18, 107].

WPŁYW BI-1 NA STRES OKSYDACYJNY

Reaktywne formy tlenu (ROS), takie jak: $\text{O}_2^{\cdot-}$, HO_2^{\cdot} , HO^{\cdot} , RO^{\cdot} , $^1\text{O}_2$, O_3 , H_2O_2 , powstają fizjologicznie podczas metabolizmu komórkowego. ROS są tworzone u zwierząt i roślin głównie w mitochondriach, a także w ER pod-

czas stresu ER. W komórkach poddanych różnym stresom może następować znaczne podwyższenie poziomu ROS, co zakłóca komórkową homeostazę redoks i może prowadzić do indukcji PCD. Podwyższony poziom ROS działa toksycznie, ponieważ może wywołać oksydację lipidów, węglowodanów, białek, DNA i obumieranie komórki. Komórki mogą przeciwdziałać skutkom nadmiaru ROS i utrzymywać prawidłową równowagę redoks dzięki szybkiemu ich metabolizowaniu z udziałem efektywnych enzymatycznych i nieenzymatycznych systemów antyoksydacyjnych.

Wykazano, że u roślin nadmiar ROS powstaje w odpowiedzi na stres abiotyczny m.in.: wysoką i niską temperaturę, zasolenie, intensywne oświetlenie, promieniowanie UV, ksenobiotyki, metale ciężkie, ozon oraz stres biotyczny, np. po infekcji roślin przez patogenne grzyby [57]. Także pro-PCD działanie takich substancji jak Bax u ssaków oraz drożdży i roślin transformowanych genem Bax, jest związane ze stresem oksydacyjnym, z tworzeniem znacznych ilości ROS [5, 110]. W wytwarzaniu ROS podczas stresu ER są zaangażowane białka systemu MMO, który zawiera cytochrom P450 (P450), reduktazę NADPH-P450 (NPR) i fosfolipidy. Główna funkcja MMO polega na oksygenacji substancji egzogennej (ksenobiotyków) i hydrofobowych substratów endogennych. Podczas tej oksygenacji są uwalniane znaczne ilości ROS.

BI-1 może przeciwdziałać indukcji PCD przez stres oksydacyjny. Na takie cytoochronne działanie BI-1 wskazuje przeciwdziałanie stresowi ER, który może indukować znaczną akumulację ROS, a także działanie anty-Bax oraz indukcję PCD przez egzogenne H_2O_2 i kwas salicylowy [17, 57]. BI-1 może zapobiegać stresowi oksydacyjnemu, wpływając na syntezę ROS oraz zwiększenie ekspresji HO-1 (heme oxygenase-1) i działanie enzymatycznych i nieenzymatycznych systemów antyoksydacyjnych. Mechanizm zmniejszenia tworzenia ROS przez BI-1 podczas stresu ER polega na jego bezpośrednim wiązaniu z NPR, co powoduje jego oddysocjowanie od cytochromu P450 2E1, a przerwanie transferu elektronów między tymi białkami zapobiega wytwarzaniu ROS [59, 73]. W kulturach komórek ssaków wykazano, że nadekspresja BI-1 może redukować poziom ROS tworzonego podczas stresu ER także przez zwiększenie ekspresji HO-1. HO-1 jest umiejscowiona głównie w błonie ER (na C-końcu ma pojedynczy region TMD) [58], a jej ekspresja jest regulowana przez czynnik transkrypcyjny Nrf-2 [99], który działa jako przekaźnik sygnału BI-1. Zwiększenie aktywności Nrf-2 przez BI-1 może być jednym z istotnych mechanizmów wpływu BI-1 na ekspresję HO-1 i antyoksydacyjne działanie BI-1 podczas stresu ER [58, 72].

Indukcja PCD u różnych organizmów jest zazwyczaj związana z oksydacyjnym uszkodzeniem komórek [39, 72] spowodowanym akumulacją ROS, a cytoochronne działanie BI-1 może polegać na przeciwdziałaniu wytwarzaniu ROS.

Stwierdzono jednak, że chociaż ROS mogą zwiększać ekspresję BI-1 to zmiany ekspresji białka BI-1 mogą nie wpływać na poziom ROS [57, 103]. Te obserwacje potwierdzają badania, w których silne antyoksydanty nie przeciwdziałały obumieraniu komórek indukowanemu nadekspresją proapoptotycznego białka Bax [5].

Wskazuje to, że BI-1 może przeciwdziałać wpływowi Bax np. na wypływ Ca^{2+} z ER prowadzącemu do otwieraniu porów w błonie mitochondriów. Jest jednak istotne, że enzymy zmiatające ROS, takie jak: Fe-SOD (superoxide dismutase), GST (glutathione S-transferase), APX (ascorbate peroxidase) i PHGP (phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase) mogą być „inhibitorami Bax” w Bax-transformowanych drożdżach [33]. Anty-PCD działanie BI-1 może też polegać na jego wpływie na recykling błon uszkodzonych przez stres oksydacyjny (peroksydację lipidów i oksydację białek). Recykling błon może mieć istotne znaczenie w tolerancji na stres oksydacyjny [5].

WPŁYW BI-1 NA METABOLIZM SFINGOLIPIDÓW

U zwierząt, roślin i drożdży metabolizm kwasów tłuszczowych sfingolipidów może uczestniczyć w szlaku obumierania komórki. Sfingolipidy są ważnymi składnikami lipidów błon, szczególnie znaczną ich ilość zawierają mikrodomeny błony komórkowej (znane jako lipid rafts), które pełnią istotną rolę podczas przekazywania sygnału przez błonę i są segregującą platformą w regulacji ruchu białek docelowych [51, 98]. Mikrodomeny, oprócz sfingolipidów, zawierają sterole i białka [16]. W badaniach prowadzonych na roślinach stwierdzono, że nadekspresja BI-1 moduluje skład mikrodomen – zmniejsza gromadzenie podstawowych białek uczestniczących w obumieraniu komórek [51].

AtBI-1 może wpływać na metabolizm sfingolipidów, na co wskazują badania z użyciem fumonizyny B1, która przez hamowanie ich syntezy może u roślin prowadzić do indukcji PCD. Ekspresja AtBI-1 zwiększa tolerancję na tę mikotoksynę [103]. Stwierdzono też, że AtBI-1 może działać jako supresor obumierania komórki przez bezpośrednią interakcję na błonie ER z kompleksem AtCb5-FAH1, który uczestniczy w 2-hydroksylacji sfingolipidów [85]. W warunkach stresu nadekspresja AtBI-1 może zwiększać aktywność AtCb5-AtFAH, podczas gdy przeciwne działanie obserwowano przy braku BI-1 (u mutantów *atbi-1*). BI-1 może przeciwdziałać indukcji PCD przez stymulację syntezy sfingolipidów, ponieważ może aktywować FAH, która jest 2-hydrolazą VLCFA (very-long-chain fatty acid) sfingolipidu [85].

Sfingolipidy są dużą rodziną lipidów powszechnie obecnych u *Eukaryota* (teoretycznie lipidom zwierząt zawiera ponad 100 000 rodzajów sfingolipidów). Ich różnorodność wynika z modyfikacji (m.in. desaturacji, hydroksylacji) szkieletu zawierającego LCB (long-chain bases) i kwasu tłuszczowego. U *Arabidopsis* LCB ulega desaturacji przez AtSLD1 i AtSLD2 w pozycji $\Delta 8$. AtBI-1 może na błonie ER tworzyć kompleks z SLD (sphingolipid

$\Delta 8$ desaturase), przy czym u *Arabidopsis* (AtBI-1) tworzenie tego kompleksu z AtFAH odbywa się za pośrednictwem cytochromu AtCb5, natomiast u *Saccharomyces cerevisiae* FAH (ScFAH1) ma domenę Cb5, przez którą może się wiązać z BI-1. Taki trójczłonowy kompleks u *Arabidopsis*, przez zwiększenie poziomu sfingolipidów, może przeciwdziałać obumieraniu komórek indukowanemu przez różne stesy, m.in. przez stres oksydacyjny [85] i stres chłodu, w których główną rolę odgrywa desaturacja LCB sfingolipidów. Zawartość sfingolipidów zwiększa się przy niskiej temperaturze, natomiast mutanty *sld1* i podwójne mutanty *sld1sld2* są nadwrażliwe na niską temperaturę. Na znaczenie sfingolipidów w indukcji PCD wskazują badania, w których wykazano, że ekspresja AtBI-1 może nie przeciwdziałać obumieraniu komórek indukowanemu przez Bax u mutantów drożdży pozbawionych FAH1 [93].

BI-1 MOŻE ZWIĘKSZAĆ AKTYWNOŚĆ LIZOSOMÓW

Cytoochronna rola BI-1 może obejmować wpływ na degradację białek, które uczestniczą w procesie prowadzącym do obumierania komórki. Stres ER powoduje akumulację ROS, natomiast BI-1 dzięki dysocjacji P450 2E1 od NPR i degradacji P450 2E1 zapobiega wytwarzaniu ROS. Lee i wsp. [73] w badaniach prowadzonych na hepatocytach i tkance wątroby myszy sprawdzili, czy degradacja tego białka jest związana ze zwiększeniem aktywności lizosomów czy proteasomów. Autorzy wykazali, że w komórkach traktowanych bafilomycyną (inhibitorem lizosomów) BI-1 przeciwdziała redukcji ekspresji P450 2E1, natomiast po zastosowaniu MG132 (inhibitora proteasomów) poziom BI-1 nie wpływał na działanie tego inhibitora, nie wpływał na ekspresję P450 2E1. BI-1 powodowało też zwiększenie aktywności lizosomowej V-ATPazy i lizosomowej katepsyny B, pobierania H^+ oraz objętości lizosomów [71, 73]. Tak więc nadekspresja BI-1 zwiększa aktywność lizosomów, natomiast brak BI-1 zmniejsza aktywność tych organeli [73].

ROLA BI-1 W REGULACJI PROLIFERACJI KOMÓREK

Wzrost i rozwój organizmów wymaga ściśle kontrolowanej proliferacji komórek oraz selektywnego eliminowania zbędnych komórek. Jest istotne, że w regulację obu tych procesów mogą być zaangażowane te same białka regulacyjne. Wiadomo, że główna rola białek rodziny Bcl-2 jest związana z regulacją procesu apoptozy, ale wykazano, że mogą one niezależnie wpływać na przebieg cyklu proliferacji komórek [11]. Podobnie, oprócz cytoochronnej roli białka BI-1, mogą odgrywać istotną rolę w inicjacji i regulacji przebiegu cyklu komórkowego [6].

Wątroba ma bardzo dużą zdolność do regeneracji i proliferujące komórki po częściowej hepatektomii są dobrym modelem do badań wejścia spoczynkowych hepatocytów w cykl komórkowy i przebiegu ich cyklu podziałowego. Bailly-Maitre i wsp. [6] w badaniach prowadzonych na regenerującej wątrobie wykazali, że u myszy pozbawionych BI-1 (*bi-1^{-/-}*) proces regeneracji wątroby odbywa się

szybciej niż u myszy typu dzikiego (*bi-1^{+/+}*). Stwierdzili też, że u myszy typu dzikiego poziom mRNA Bi-1 ulega obniżeniu, co wskazuje, że wejście w cykl komórkowy spoczynkowych komórek jest związane z redukcją ekspresji tego białka. Stwierdzono, że u myszy brak Bi-1 (*bi-1^{-/-}*) przyspiesza regenerację wątroby, co jest związane z:

- szybszym wejściem spoczynkowych hepatocytów w cykl komórkowy,
- szybszym rozpoczęciem syntezy DNA w fazie S,
- wcześniejszym zwiększeniem poziomu białek cykliny D1, cykliny D3, Cdk2 i Cdk4,
- szybszą hiperfosforylacją Rb oraz
- szybszą degradacją białka p27, które jest inhibitorem Cdk [6].

Jest ważne, że białka rodziny Bcl-2 nie tylko regulują wejście komórek na ścieżkę apoptozy, ale także mogą niezależnie wpływać na proliferację komórek. Wykazano, że w komórkach pozbawionych antyapoptotycznego białka Bcl-2 cykl komórkowy przebiega szybciej, natomiast nadekspresja Bcl-2 hamuje przejście z G0 do fazy S [78], co jest skorelowane ze zwiększeniem poziomu inhibitora Cdk (białka p27), natomiast zmniejszeniem aktywności NFAT (nuclear factor of activated T cells). Podobne działania obserwowano w badaniach innego antyapoptotycznego białka Bcl-X_L, które także powodowało podwyższenie poziomu p27 i hamowanie Cdk potrzebne do przejścia fazy G1 [34, 86]. Przeciwnie działania obserwowano w przypadku proapoptotycznych białek Bax i Bad [52, 86], stwierdzono bowiem, że ich nadekspresja promuje wejście w fazę S, co było związane z obniżeniem poziomu p27 [12]. Tak więc anty- i proapoptotyczne białka rodziny Bcl-2 działają przeciwnie na cykl komórkowy przynajmniej na kontrolę poziomu p27. Na możliwości niezależnego wpływu Bcl-2 na apoptozę i cykl komórkowy wskazują badania, w których wykazano, że mutacje tyrozyny w domenie BH4 antyapoptotycznych białek Bcl-2, Bcl-X_L i Bcl-W nie wpływają na zdolność do wiązania się z białkami proapoptotycznymi (m.in. Bax) i przeciwdziałanie apoptozie, natomiast znosi ich wpływ na cykl komórkowy [45]. Bi-1 i antyapoptotyczne białka rodziny Bcl-2 mogą podobnie wpływać na wejście spoczynkowych komórek w cykl komórkowy i przebieg ich cyklu podziałowego. Te podobieństwa mogą wynikać z prożyciowego ich działania, umiejscowieniu w błonach ER i wpływu na homeostazę Ca²⁺. Podobieństwo działania Bi-1 i Bcl-2 może też wynikać z bezpośredniego fizycznego oddziaływania między tymi białkami, co umożliwiło im współzależny wpływ na procesy komórkowe.

ROLA BIAŁKA BI-1 W PATOLOGII

Zakłócenia w prawidłowym funkcjonowaniu komórek przez czynniki endogenne, a także abiotyczne i biotyczne czynniki środowiska mogą wywoływać różne choroby człowieka, zwierząt i roślin. Silnie działające czynniki, szczególnie stresu abiotycznego, mogą powodować nekrotyczną śmierć komórek, natomiast jeśli działanie stresu nie przekracza progę zdolności komórek

do reagowania na ich patologiczne działanie, to mogą być aktywowane mechanizmy obronne. Mechanizm obronny może mieć prożyciowy, naprawczy, adaptacyjny charakter, ale może też polegać na kierowaniu komórki na ścieżkę PCD i w ten sposób eliminować z organizmu uszkodzone komórki.

W regulacji mechanizmów obronnych uczestniczą białka antyapoptotyczne, w tym białko Bi-1. Na zaangażowanie tego białka w przebiegu różnych chorób wskazuje znaczna zmiana jego poziomu w uszkodzonych komórkach. Obserwowano ją m.in. podczas rozwoju choroby nowotworowej, podczas uszkodzenia komórek przez niedotlenienie-reperfuzję, cukrzycę, otyłość, podczas regeneracji wątroby i infekcji przez drobnoustroje [88, 89].

BI-1 W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Komórki nowotworowe mają upośledzoną fizjologiczną regulację procesu apoptozy. Wśród licznych genów, których ekspresja ulega zmianie w tych komórkach, rozwój choroby nowotworowej może być związany ze zmianą ekspresji genu kodującego antyapoptotyczne białko Bi-1. W komórkach nowotworowych, podobnie jak w innych komórkach, jego nadekspresja może przeciwdziałać indukcji mitochondrialnego szlaku apoptozy, natomiast obniżenie ekspresji Bi-1 może sprzyjać obumieraniu takich nieprawidłowych komórek. Na zaangażowanie antyapoptotycznej aktywności tego białka wskazuje znaczne podwyższenie jego poziomu, zwłaszcza w komórkach nowotworów złośliwych tworzących przerzuty. Nadekspresję Bi-1 wykazano w nowotworach m.in.: stercza, płuc, nosowogardłowego, macicy, szyjki macicy, jajników, pęcherza, glejaka, ostrej białaczce szpikowej i piersi [33, 46, 69, 88, 114]. W kilku nowotworach stwierdzono obniżenie ekspresji Bi-1, w tym w nowotworze żołądka, okrężnicy, nerki, płuc i odbytnicy [35]. Obniżenie poziomu Bi-1 w komórkach niektórych nowotworów wskazuje, że zależność między jego poziomem a rozwojem choroby nowotworowej nie jest więc jednoznaczna. Różnice mogą być związane z oddziaływaniem białka Bi-1 na funkcjonowanie komórek nowotworowych, na różne procesy, których nasilenie może mieć swoisty tkankowo charakter. Liczne dane wskazują jednak, że intensywny rozwój nowotworu jest związany ze zwiększeniem ekspresji białka Bi-1, z jego cytoochronnym działaniem. Znaczenie Bi-1 w rozwoju tej choroby potwierdzono w badaniach, w których eksperymentalnie obniżano poziom Bi-1. Aktywację kaspazy-3 i znaczne zwiększenie liczby spontanicznych apoptoz obserwowano po transfekcji swoistego interferującego RNA (RNAi) do komórek nowotworowych stercza, piersi, płuc i nowotworu nosowogardłowego [35, 36, 114], przy czym mogło to być tkankowozależne. W nowotworze piersi obniżenie ekspresji Bi-1 (z użyciem siRNA) powodowało zwiększenie liczby spontanicznych apoptoz komórek estrogenozależnych, a prawie nie wpływało na obumieranie komórek estrogeniezależnych [35]. Obniżenie poziomu Bi-1 w komórkach nowotworowych i zwiększenie

szenie liczby spontanicznych apoptoz uzyskano też po transformacji genem antysens BI-1 i genem kodującym BI-1 białko pozbawione C-końca (CΔBI-1) [69, 108].

Wykazano, że BI-1 może powodować rozwój nowotworów i ich inwazyjność m.in. przez:

- zmianę metabolizmu glukozy, skierowanie jej w stronę glikolizy i zmniejszenie aktywności dehydrogenazy pirogronianowej [69],
- redukcję pozakomórkowego pH [69],
- aktywację NHE (sodium hydrogen exchanger) [39],
- redukcję wytwarzania ROS przez bezpośrednią interakcję z reduktazą NADPH-P450 [59], oraz
- interakcję z G-aktyną i stymulację polimeryzacji aktyny, co zwiększa ruchliwość i adhezję komórek [69].

W utrzymaniu żywotności komórek nowotworowych może też uczestniczyć autofagia, zwłaszcza gdy ich zapotrzebowanie na pokarm przewyższa ilości dostarczane przez naczynia. Rozwojowi nowotworów sprzyja powstanie patofizjologicznego mikrośrodowiska, które charakteryzuje się warunkami niedotlenienia, niedoboru pokarmu i zakwaszeniem. Zakwaszenie środowiska jest regulowane przez aktywność kanałów jonowych i transporterów, np. Na^+/H^+ (NHE) lub Cl/HCO_3^- [75]. Przy nadekspresji BI-1 zakwaszenie może zwiększać wzmożone pobieranie glukozy, a obniżenie aktywności dehydrogenazy pirogronianowej nasila glikolizę, prowadząc do nagromadzenia mleczanu [75].

Analiza proteomu nowotworu piersi wykazała podwyższony poziom białek antyapoptotycznych, w tym: BI-1, Bcl-2, Bcl-X_L i IAPs, z czym można wiązać chemioodporność nowotworu [35]. Wrażliwość na czynniki terapeutyczne uzyskano w badaniach prowadzonych z interferencyjnymi RNA Bcl-2 i XIAP, a w komórkach MD-MBA-231 i nowotworu stercza z BI-1, gdzie obserwowano spontaniczne apoptozy [35, 77]. Badana jest możliwość terapeutycznego wykorzystania BI-1 jego nadekspresji jako markera obecności komórek nowotworowych albo zwiększania liczby spontanicznych apoptoz po eksperymentalnym obniżaniu poziomu BI-1 [36]. W chemioterapii nowotworów (m.in. białaczce i chłoniaku) stosowane są daunorubicyna i doksorubicyna, które są antracyklinami pochodzącymi ze *Streptomyces*. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że mogą one swoiście wiązać się z BI-1, hamować jego aktywność i znosić zdolność BI-1 do przeciwdziałania obumieraniu komórek indukowanemu także przez stres ER [113].

BI-1 W ETIOLOGII INNYCH CHOROÓB

Zaangażowanie białka BI-1 i jego cytoochronnej aktywności badano także w niektórych innych chorobach. Wykazano m.in. znaczenie tego białka BI-1 podczas regeneracji wątroby, splenomegalii, a także niedokrwienia-reperfuzji, cukrzycy i otyłości oraz depresji i anhedonii [7, 62]. Stwierdzono, że nadekspresja BI-1, przez zmniejszenie stresu ER, chroni przed ostrym uszkodze-

niem mózgu [66]. Wyniki uzyskane przez Kim i wsp. [62] w badaniach prowadzonych na myszach wskazują, że nadekspresja BI-1 wpływa na reakcję autoimmunologiczną, powoduje bowiem podtrzymanie aktywności ERK i redukuje tworzenie ROS, a to hamuje obumieranie komórek indukowane podczas reakcji autoimmunologicznej. Myszy bez BI-1 (BI-1^{-/-}) cierpiące na leukopenię i erytrocytozę mają w marginalnej strefie śledziony zwiększoną liczbę komórek B, większą zawartość i zwiększoną translokację do jądra czynnika NF- κ B, co jest skorelowane z podwyższeniem poziomu Ca^{2+} w cytozolu i w ER [79]. Wykazano też, że BI-1 przez redukcję aktywności CYP2E1 i tworzenia ROS przeciwdziała otyłości indukowanej przez dietę wysokotłuszczową. Akumulacja tłuszczu w wątrobie jest ściśle związana z opornością na insulinę. Brak BI-1 przy diecie wysokotłuszczowej powoduje hiperglikemię związaną ze zmniejszeniem tolerancji glukozy i odpornością na insulinę, natomiast ekspresja BI-1 zwiększa metabolizm glukozy i wrażliwość na ten hormon. BI-1, także w hepatocytach HepG2 redukuje stres ER indukowany przez palmitynian i zależne od CYP2E1 wytwarzanie ROS [74].

BI-1 PODCZAS STRESU ŚRODOWISKOWEGO

Czynniki środowiskowe wywołujące stres abiotyczny i biotyczny mogą powodować obumieranie komórek w procesie nekrozy lub PCD. Skutkiem działania tych czynników stresowych może przeciwdziałać białko BI-1. Stwierdzono, że podwyższony poziom BI-1 zwiększa u roślin tolerancję na stres abiotyczny, w tym na: wysoką i niską temperaturę, suszę, wysokie zasolenie, zalewanie i zranienie, a także na stres spowodowany przez metale ciężkie i chemiczne czynniki indukujące stres oksydacyjny. Pomiar poziomu transkryptu/białka BI-1 wykazały, że te stresory znacznie zwiększają zawartość białka BI-1 w komórkach [17, 27, 49, 93, 103]. W badaniach prowadzonych na *Capsicum annuum* obserwowano indukcję syntezy BI-1 już w pierwszej godzinie działania stresora i po okresie zmniejszenia, następowało wyraźne zwiększenie syntezy tego białka [49]. Potwierdzenie anty-PCD działania BI-1 u roślin poddanych działaniu czynnikom stresu abiotycznego uzyskano w badaniach, w których eksperymentalnie podwyższano lub obniżano ekspresję tego białka w komórkach. Nadekspresja BI-1 (po ich transformacji roślinnymi genami BI-1) powodowała zmniejszenie obumierania komórek indukowanego przez abiotyczne stresory [17, 49, 103], natomiast rośliny po transformacji zmutowanym genem Bi-1 (np. *atbi1-1*), konstruktem antysens BI-1 lub swoistym siRNA, miały zmniejszoną tolerancję na stres przejawiającą się m.in. zwiększoną umieralnością komórek [8, 27]. Badania prowadzone na komórkach zawieszinowych tytoniu linii BY-2 wykazały, że egzogenna melatonina zwiększa ekspresję BI-1 chroniąc tym samym przed PCD komórki ekspozowane na ołów [64]. Wśród stresów środowiskowych szczególne zainteresowanie dotyczy stresu biotycznego, ponieważ atak patogennych mikroorganizmów (grzybów, bakterii, wirusów i wiroidów) powoduje choroby człowieka, zwierząt i roślin. Dzięki różnym mechani-

zmom obronnym organizmy nie są kolonizowane przez większość potencjalnych patogenów. Może też istnieć wyraźna zależność między gatunkiem a nawet postacią pasożyta, gatunkiem rośliny-żywiciele. Dla przykładu, biotroficzny grzyb *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* infekuje żyto, natomiast nie rozwija się na pszenicy, którą skutecznie atakuje *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* [29, 34].

Infekcje przez wirusy i bakterie

Namnażanie wirusów i bakterii może zachodzić w żywych komórkach, a więc strategia rozwoju tych pasożytów obejmuje przeciwdziałanie obumieraniu komórek żywiciela. Ilustracją prożywiowego i proapoptotycznego wpływu wirusowego białka na komórki bakterii-żywiciele są holiny i antyholiny, które podczas cyklu rozwojowego bakteriofagów kontrolują liczbę komórek bakterii [101]. Przeciwdziałanie obumieraniu komórek żywiciela może polegać na kodowaniu BI-1-podobnych białek lub wprowadzaniu do komórek gospodarza substancji, które wzmacniają ich antyapoptotyczne działanie białka BI-1. Opisano przynajmniej kilka przypadków zaangażowania białek BI-1-podobnych w przebieg infekcji przez wirusy. Przegląd BLAST wykazał znaczną homologię TMBIM (rodziny białek BI-1) ludzi z 10 białkami wirusa HCMV (cytomegalowirusa) tworzącymi rodzinę US12 (US12-21) [76]. Białka tej rodziny mają topologię podobną do TMBIM (zawierają 7 TMD), prawdopodobnie umiejscawiają się w błonach wewnątrzkomórkowych organelli komórki gospodarza i odgrywają istotną rolę w wirulencji (m.in. wpływając na homeostazę Ca^{2+}). Wirusy, takie jak CMLV (Camelpox virus), CPXV (Cowpox virus) i niektóre VACV (Vaccinia viruses) kodują TMBIM4-podobne białka (vTMBIM4) [15]. Po infekcji, vTMBIM4 w komórkach gospodarza przemieszcza się do ER i GA, przeciwdziała PCD, co sprzyja replikacji wirusa bez zabijania komórki gospodarza. vTMBIM4, tak jak hTMBIM4, uczestniczą w regulacji homeostazy Ca^{2+} [96]. W badaniach prowadzonych na *Arabidopsis* i *Nicotiana benthamiana* infekowanych potywirusem i potekswirusem stwierdzono, że białka 6K2 potywirusa i TGB3 potekswirusa umiejscawiają się w ER, kotwiczą wirusową replikazę, hamują przemieszczanie kompleksu tych białek i przez wpływ na szlak IRE1/bZIP60 i BI-1 hamują systemową akumulację wirusów, zwiększając tolerancję na te patogeny [31]. U *Escherichia coli* (szcep K12) zidentyfikowano trzy białka BI-1-podobne: YccaA, YbhL i YbhM, a u *Bacillus subtilis* białko BsY-etj [81]. Cytoochronna rola tych białek została opisana tylko częściowo, ale uzyskano dane wskazujące na ich znaczenie podczas stresu środowiskowego (w tym szoku niskiej i wysokiej temperatury).

Patogenne bakterie mogą też wydzielać do komórek gospodarza różne substancje, które hamują proces apoptozy, m.in. przez rozcinanie proapoptotycznego białka z rodziny BH3-only, blokowanie aktywacji kaspazy lub aktywację kinazy białkowej Akt (protein kinase B) [38]. Istotny jest mechanizm, w którym bakterie mogą wykorzystywać cytoochronny system komórki gospodarza. Po infekcji komórek (np. Hela) przez patogenne bakte-

rie *Escherichia coli* EPEC (enteropathogenic) i EHEC (enterohemorrhagic) [38] wydzielają (przez system sekrecji typu II) do komórki-żywiciele efektorowe białko NleH, które wiąże się N-końcem BI-1. Utworzenie kompleksu NleH-TMBIM6/BI-1 zwiększa antyapoptotyczną aktywność białka BI-1, natomiast mutacje N-końca lub brak BI-1 powodują utratę antyapoptotycznej aktywności NleH [38]. Prawdopodobnie homologi NleH wydziela też *Salmonella*, chociaż nie wiadomo, czy one także hamują apoptozę przez wiązanie się z BI-1.

Interakcja rośliny-grzyby patogenne

Dla licznych patogennych mikroorganizmów (wirusów, bakterii i grzybów) żywicielami są rośliny, ich atak powoduje choroby roślin zwane: wirozami, bakteriozami i mikożami. Większość chorób roślin jest spowodowana infekcją przez pasożytnicze grzyby. Opisane różne aspekty interakcji pasożytniczy grzyb-roślina żywiciel. Kolonizacja roślin przez patogenne grzyby zwiększa poziom białka BI-1 w komórkach żywiciela, przy czym jego rola może być różna, zależnie od biologii patogena, od sposobu pozyskiwania przez nie pokarmu. U biotrofów, które pobierają pokarm z żywych komórek, szybkie obumieranie komórek gospodarza odcina patogen od źródła pokarmu, co przeciwdziała jego rozprzestrzenieniu się, natomiast u nekrotrofów, które czerpią pokarm z martwych (uprzednio zabitych komórek) obumieranie komórek sprzyja wzrostowi patogena. Hemibiotrofy początkowo odżywiają się jak biotrofy, a następnie jako nekrotrofy. Tak więc, zgodnie z oczekiwaniami, podwyższony poziom białka BI-1 zwiększa wrażliwość na biotrofy, a ogranicza rozwój nekrotrofów.

Zgodnie z hipotezą „gen-do-genu” uruchomienie mechanizmów obronnych u roślin następuje przy zgodności genu *R* u rośliny z czynnikiem *Avr* patogena. U roślin geny *R* ulegają ekspresji głównie podczas indukcji odporności na uszkodzenia, uczestniczą w rozpoznaniu patogenów [44] i przez aktywację kaspazopodobnych proteaz prowadzą do HR będącej jednym z typów śmierci komórki.

Infekcja jęczmienia przez biotroficzny grzyb *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* powoduje indukcję ekspresji genu HvBI-1 zarówno podczas interakcji kompatybilnej, jak i niekompatybilnej [4, 28], chociaż może się różnić u odpornych i wrażliwych odmian jęczmienia. Nadekspresja BI-1 w miejscu interakcji z *B. graminis* f. sp. *hordei* z komórkami epidermy gospodarza lokalnie hamuje tworzenie ROS [28, 47], a także może przywracać odporność po utracie MLO (mildew locus), który jest negatywnym regulatorem obumierania komórki i reakcji obronnej [4]. U jęczmienia ze zmutowanymi allelami genu *Mlo* obserwowano spontaniczne obumieranie komórek i szeroki zakres odporności na *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, natomiast genotypy *Mlo* są bardzo wrażliwe na hemibiotroficzny patogen *Magnaporthe grisea* i na indukcję nekrozy przez filtrat kultur *Bipolaris sorokiniana* [53]. U biotroficznych patogenów profil ekspresji BI-1 jest bardzo podobny do ekspresji genu *Mlo*. Ponie-

waż nadekspresja BI-1 indukuje wrażliwość na penetrację *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* nawet u mutantów *mlo*, BI-1 podobnie jak MLO, może wspierać szlak przeżycia i zastępować MLO w represji odporności. BI-1 może więc pośredniczyć we wrażliwości na ten patogen niezależnie lub w szlaku poniżej MLO.

PODSUMOWANIE

Utrzymanie funkcjonalnej homeostazy w organizmie wielokomórkowym wymaga usuwania komórek zbędnych i uszkodzonych. Ich eliminowanie odbywa się dzięki genetycznie warunkowanej zdolności komórek do samobójczej śmierci zwanej śmiercią programowaną (PCD). Proces PCD jest indukowany przez sygnały pozakomórkowe i sygnały wynikające z monitorowania prawidłowości funkcjonowania komórki. PCD zachodzi podczas całej ontogenezy, uczestniczy bowiem w histogenezie i formowaniu organów, a także w adaptacji do warunków środowiska i w reakcji na abiotyczny i biotyczny stres środowiskowy. Procesy PCD zwierząt i roślin są podobne, a różnice w sposobie obumierania komórek

mogą wynikać z odmiennej drogi ewolucyjnej organizmów tych dwóch królestw po dywergencji z jednokomórkowego przodka. Genomy zwierząt i roślin zawierają liczne geny pro-PCD i nie mniej liczne geny przeciwdziałające kierowaniu komórek na drogę samobójczej śmierci.

Wśród białek regulujących PCD wykryto inhibitor Bax 1 (BI-1). Białko to początkowo zidentyfikowano jako inhibitor indukowanej przez BAX apoptozy w komórkach drożdży. Badania przeprowadzone na wielu gatunkach należących do różnych królestw wskazują, że BI-1 jest ewolucyjnie konserwatywnym regulatorem PCD. BI-1 oddziałuje z regulatorami apoptozy z rodziny Bcl-2. Jego wpływ na śmierć komórki obejmuje zmiany wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} oraz w obrębie szlaków sygnałowych ER m.in. przez IRE1 α . BI-1 wpływa też na metabolizm sfingolipidów, regulację autofagii, polimeryzację aktyny, aktywność lizosomów, a także proliferację komórek. Skutkiem działania anty-PCD przez BI-1 jest możliwość początkowego przystosowania się komórki do stresu. Poznanie mechanizmu działania BI-1 może przynieść znaczące korzyści terapeutyczne ludziom.

PIŚMIENICTWO

- [1] Ahn T., Yun C.H., Kim H.R., Chae H.J.: Cardiolipin phosphatidylserine, and BH4 domain of Bcl-2 family regulate Ca^{2+}/H^{+} antiporter activity of human Bax inhibitor-1. *Cell Calcium*, 2010; 47: 387–396
- [2] Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 2000; 408: 796–815
- [3] Aravind L., Dixit V.M., Koonin E.V.: Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons. *Science*, 2001; 291: 1279–1284
- [4] Babaeizad V., Imani J., Kogel K.H., Eichmann R., Hückelhoven R.: Over-expression of the cell death regulator BAX inhibitor-1 in barley confers reduced or enhanced susceptibility to distinct fungal pathogens. *Theor. Appl. Genet.*, 2009; 118: 455–463
- [5] Baek D., Nam J., Koo Y.D., Kim D.H., Lee J., Jeong J.C., Kwak S.S., Chung W.S., Lim C.O., Bahk J.D., Hong J.C., Lee S.Y., Kawai-Yamada M., Uchimiya H., Yun D.J.: Bax-induced cell death of *Arabidopsis* is mediated through reactive oxygen-dependent and independent processes. *Plant Mol. Biol.*, 2004, 56: 15–27
- [6] Bailly-Maitre B., Bard-Chapeau E., Luciano F., Droin N., Bruey J.M., Faustin B., Kress C., Zapata J.M., Reed J.C.: Mice lacking *bi-1* gene show accelerated liver regeneration. *Cancer Res.*, 2007; 67: 1442–1450
- [7] Bailly-Maitre B., Fondevila C., Kaldas F., Droin N., Luciano F., Ricci J.E., Croxton R., Krajewska M., Zapata J.M., Kupiec-Weglinski J.W., Farmer D., Reed J.C.: Cytoprotective gene BI-1 is required for intrinsic protection from endoplasmic reticulum stress and ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 2809–2814
- [8] Bolduc N., Brisson L.F.: Antisense down regulation of NtBI-1 in tobacco BY-2 cells induces accelerated cell death upon carbon starvation. *FEBS Lett.*, 2002; 532: 111–114
- [9] Bolduc N., Lamb G.N., Cessna S.G., Brisson L.F.: Modulation of Bax Inhibitor-1 and cytosolic Ca^{2+} by cytokinins in *Nicotiana tabacum* cells. *Biochimie*, 2007; 89: 961–971
- [10] Bolduc N., Ouellet M., Pitre F., Brisson L.F.: Molecular characterization of two plant BI-1 homologues which suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells. *Planta*, 2003; 216: 377–386
- [11] Bonnefoy-Berard N., Aouacheria A., Vershelde C., Quemeneur L., Marçais A., Marvel J.: Control of proliferation by Bcl-2 family members. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1644: 159–168
- [12] Brady H.J., Gil-Gómez G., Kirberg J., Berns A.J.: Bax alpha perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells. *EMBO J.*, 1996; 15: 6991–7001
- [13] Bultynck G., Kiviluoto S., Henke N., Ivanova H., Schneider L., Rybalchenko V., Luyten T., Nuyts K., De Borggraeve W., Bezprozvanny I., Parys J.B., De Smedt H., Missiaen L., Methner A.: The C terminus of Bax inhibitor-1 forms a Ca^{2+} -permeable channel pore. *J. Biol. Chem.*, 2012; 287: 2544–2557
- [14] Carimi F., Zottini M., Formentin E., Terzi M., Lo Schiavo F.: Cytokinin: new apoptotic inducers in plants. *Planta*, 2003; 216: 413–421
- [15] Carrara G., Saraiva N., Parsons M., Byrne B., Prole D.L., Taylor C.W., Smith G.L.: Golgi anti-apoptotic proteins are highly conserved ion channels that affect apoptosis and cell migration. *J. Biol. Chem.*, 2015; 290: 11785–11801
- [16] Castillo K., Rojas-Rivera D., Lisbona F., Caballero B., Nassif M., Court F.A., Schuck S., Ibar C., Walter P., Sierralta J., Glavic A., Hetz C.: BAX inhibitor-1 regulates autophagy by controlling the IRE1 α branch of the unfolded protein response. *EMBO J.*, 2011; 30: 4465–4478
- [17] Chae H.J., Ke N., Kim H.R., Chen S., Godzik A., Dickman M., Reed J.C.: Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast. *Gene*, 2003; 323: 101–113
- [18] Chae H.J., Kim H.R., Xu C., Bailly-Maitre B., Krajewska M., Krajewski S., Banares S., Cui J., Digicaylioglu M., Ke N., Kitada S., Monosov E., Thomas M., Kress C.L., Babendure J.R. i wsp.: BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell*, 2004; 15: 355–366
- [19] Chang Y., Bruni R., Kloss B., Assur Z., Kloppmann E., Rost B., Hendrickson W.A., Liu Q.: Structural basis for a pH-sensitive calcium leak across membranes. *Science*, 2014; 344: 1131–1135
- [20] Chen R., Valencia I., Zhong F., McColl K.S., Roderick H.L., Bootman M.D., Berridge M.J., Conway S.J., Holmes A.B., Mignery G.A., Velez P., Distelhorst C.W.: Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *J. Cell Biol.*, 2004; 166: 193–203

- [21] Chen X.H., Yu H., Deng H.J., Chen J.X., Mi H.B., Mao L.C.: Cucumber BAX inhibitor-1, a conserved cell death suppressor and a negative programmed cell death regulator under cold stress. *Biol. Plant.*, 2013; 57: 684–690
- [22] Cheng C.H., Luo S.W., Wang A.L., Guo Z.X.: Molecular and immune response characterizations of a novel Bax inhibitor-1 gene in pufferfish, *Takifugu obscurus*. *Fish Physiol. Biochem.*, 2017; 43: 965–975
- [23] Chipuk J.E., Moldoveanu T., Llambi F., Parsons M.J., Green D.R.: The BCL-2 family reunion. *Mol. Cell*, 2010; 37: 299–310
- [24] Chonghaile T.N., Gupta S., John M., Szegezdi E., Logue S.E., Samali A.: BCL-2 modulates the unfolded protein response by enhancing splicing of X-box binding protein-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2015; 466: 40–45
- [25] Dion M., Chamberland H., St-Michel C., Plante M., Darveau A., Lafontaine J.G., Brisson L.F.: Detection of a homologue of bcl-2 in plant cells. *Biochem. Cell Biol.*, 1997; 75: 457–461
- [26] Du Z.Q., Lan J.F., Weng Y.D., Zhao X.F., Wang J.X.: BAX inhibitor-1 silencing suppresses white spot syndrome virus replication in red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immunol.*, 2013; 35: 46–53
- [27] Duan Y., Zhang W., Li B., Wang Y., Li K., Sodmergen H., Zhang Y., Li X.: An endoplasmic reticulum response pathway mediates programmed cell death of root tip induced by water stress in *Arabidopsis*. *New Phytol.*, 2010; 186: 681–695
- [28] Eichmann R., Bischof M., Weis C., Shaw J., Lacomme C., Schweizer P., Duchkov D., Hensel G., Kumlehn J., Hückelhoven R.: BAX inhibitor-1 is required for full susceptibility of barley to powdery mildew. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2010; 23: 1217–1227
- [29] Eichmann R., Schultheiss H., Kogel K.H., Hückelhoven R.: The barley apoptosis suppressor homologue BAX inhibitor-1 compromises nonhost penetration resistance of barley to the inappropriate pathogen *Blumeria graminis* f. sp. tritici. *Mol. Plant – Microbe Interact.*, 2004; 17: 484–490
- [30] Fingrut O., Flescher E.: Plant stress hormones suppress the proliferation and induce apoptosis in human cancer cells. *Leukemia*, 2002; 16: 608–616
- [31] Gaguancela O.A., Zúñiga L.P., Arias A.V., Halterman D., Flores F.J., Johansen I.E., Wang A., Yamaji Y., Verchot J.: The IRE1/bZIP60 pathway and Bax inhibitor 1 suppress systemic accumulation of potyviruses and potexviruses in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* plants. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2016; 29: 750–766
- [32] Galluzzi L., Vitale I., Abrams J.M., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., Dawson T.M., Dawson V.L., El-Deiry W.S., Fulda S., Gottlieb E., Green D.R., Hengartner M.O., Kepp O., Knight R.A. et al.: Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.*, 2012; 19: 107–120
- [33] Godlewski M., Kobylińska A.: Programowana śmierć komórek – strategia utrzymania komórkowej homeostazy organizmu. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2016; 70: 1229–1244
- [34] Greider C.A., Chattopadhyay C., Parkhurst C., Yang E.: BCL-x₂ and BCL2 delay Myc-induced cell cycle entry through elevation of p27 and inhibition of G1 cyclin-dependent kinases. *Oncogene*, 2002; 21: 7765–7775
- [35] Grzmil M., Kaulfuss S., Thelen P., Hemmerlein B., Schweyer S., Obenaus S., Kang T.W., Burfeind P.: Expression and functional analysis of Bax inhibitor-1 in human breast cancer cells. *J. Pathol.*, 2006; 208: 340–349
- [36] Grzmil M., Thelen P., Hemmerlein B., Schweyer S., Voigt S., Mury D., Burfeind P.: Bax inhibitor-1 is overexpressed in prostate cancer and its specific down-regulation by RNA interference leads to cell death in human prostate carcinoma cells. *Am. J. Pathol.*, 2003; 163: 543–552
- [37] Hanada M., Aimé-Sempé C., Sato T., Reed J.C.: Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 11962–11969
- [38] Hemrajani C., Berger C.N., Robinson K.S., Marchès O., Mousnier A., Frankel G.: NleH effectors interact with Bax inhibitor-1 to block apoptosis during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 3129–3134
- [39] Henke N., Lisak D.A., Schneider L., Habicht J., Pergande M., Methner A.: The ancient cell death suppressor BAX inhibitor-1. *Cell Calcium*, 2011; 50: 251–260
- [40] Herbert R.J., Vilhar B., Evett C., Orchard C.B., Rogers H.J., Davies M.S., Francis D.: Ethylene induces cell death at particular phases of the cell cycle in the tobacco TBV-2 cell line. *J. Exp. Bot.*, 2001; 52: 1615–1623
- [41] Hetz C., Bernasconi P., Fisher J., Lee A.H., Bassik M.C., Antonsson B., Brandt G.S., Iwakoshi N.N., Schinzel A., Glimcher L.H., Korsmeyer S.J.: Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1 α . *Science*, 2006; 312: 572–576
- [42] Hetz C., Glimcher L.H.: XBP-1 and the UP-osome: mastering secretory cell function. *Curr. Immunol. Rev.*, 2008; 4: 1–10
- [43] Hetz C., Glimcher L.H.: Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1 α interactome. *Mol. Cell*, 2009; 35: 551–561
- [44] Hoerberichts F.A., Woltering E.J.: Multiple mediators of plant programmed cell death: Interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bioessays*, 2003; 25: 47–57
- [45] Huang D.C., O'Reilly L.A., Strasser A., Cory S.: The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *EMBO J.*, 1997; 16: 4628–4638
- [46] Hückelhoven R.: BAX inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. *Apoptosis*, 2004; 9: 299–307
- [47] Hückelhoven R., Fodor, J., Preis C., Kogel K.H.: Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol.*, 1999; 119: 1251–1260
- [48] Ihara-Ohori Y., Nagano M., Muto S., Uchimiya H., Kawai-Yamada M.: Cell death suppressor Arabidopsis Bax inhibitor-1 is associated with calmodulin binding and ion homeostasis. *Plant Physiol.*, 2007; 143: 650–660
- [49] Isbat M., Zeba N., Kim S.R., Hong C.B.: A BAX inhibitor-1 gene in *Capsicum annuum* is induced under various abiotic stresses and endows multi-tolerance in transgenic tobacco. *J. Plant Physiol.*, 2009; 166: 1685–1693
- [50] Ishii Y., Hori Y., Sakai S., Honma Y.: Control of differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cells by cytokinins and cytokinin nucleosides, plant redifferentiation-inducing hormones. *Cell Growth Differ.*, 2002; 13: 19–26
- [51] Ishikawa T., Aki T., Yanagisawa S., Uchimiya H., Kawai-Yamada M.: Overexpression of BAX inhibitor-1 links plasma membrane microdomain proteins to stress. *Plant Physiol.*, 2015; 169: 1333–1343
- [52] Janumyan Y.M., Sansam C.G., Chattopadhyay A., Cheng N., So-ucie E.L., Penn L.Z., Andrews D., Knudson C.M., Yang E.: Bcl-xL/Bcl-2 coordinately regulates apoptosis, cell cycle arrest and cell cycle entry. *EMBO J.*, 2003; 22: 5459–5470
- [53] Jarosch B., Kogel K.H., Schaffrath U.: The ambivalence of the barley *Mlo* locus: mutations conferring resistance against powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) enhance susceptibility to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant – Microbe Interact.*, 1999; 12: 508–514
- [54] Jean J.C., Oakes S.M., Joyce-Brady M.: The Bax inhibitor-1 gene is differentially regulated in adult testis and developing lung by two alternative TATA-less promoters. *Genomics*, 1999; 57: 201–208
- [55] Kawai M., Pan L., Reed J.C., Uchimiya H.: Evolutionally conserved plant homologue of the Bax inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast. *FEBS Lett.*, 1999; 464: 143–147

- [56] Kawai-Yamada M., Hori Z., Ogawa T., Ihara-Ohori Y., Tamura K., Nagano M., Ishikawa T., Uchimiya H.: Loss of calmodulin binding to Bax inhibitor-1 affects *Pseudomonas*-mediated hypersensitive response-associated cell death in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 27998–28003
- [57] Kawai-Yamada M., Ohori Y., Uchimiya H.: Dissection of *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death. *Plant Cell*, 2004; 16: 21–32
- [58] Kim H.P., Pae H.O., Back S.H., Chung S.W., Woo J.M., Son Y., Chung H.T.: Heme oxygenase-1 comes back to endoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011; 404: 1–5
- [59] Kim H.R., Lee G.H., Cho E.Y., Chae S.W., Ahn T., Chae H.J.: Bax inhibitor-1 regulates ER stress-induced ROS accumulation through the regulation of cytochrome P450 2E1. *J. Cell Sci.*, 2009; 122: 1126–1133
- [60] Kim H.R., Lee G.H., Ha K.C., Ahn T., Moon J.Y., Lee B.J., Cho S.G., Kim S., Seo Y.R., Shin Y.J., Chae S.W., Reed J.C., Chae H.J.: Bax inhibitor-1 is a pH-dependent regulator of Ca²⁺ channel activity in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 15946–15955
- [61] Kim J.G., Nonneman D., Vallet J.L., Christenson R.K.: Linkage mapping of the porcine testis enhanced gene transcript (TEGT) gene to chromosome 5. *Anim. Genet.*, 2003; 34: 152–153
- [62] Kim J.H., Lee E.R., Jeon K., Choi H.Y., Lim H., Kim S.J., Chae H.J., Park S.H., Kim S., Seo Y.R., Kim J.H., Cho S.G.: Role of BI-1 (TEGT)-mediated ERK1/2 activation in mitochondria-mediated apoptosis and splenomegaly in BI-1 transgenic mice. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1823: 876–888
- [63] Kiviluoto S., Schneider L., Luyten T., Vervliet T., Missiaen L., De Smedt H., Parys J.B., Methner A., Bultynck G.: Bax inhibitor-1 is a novel IP₃ receptor-interacting and -sensitizing protein. *Cell Death Dis.*, 2012; 3: e367
- [64] Kobylińska A., Posmyk M.M.: Melatonin restricts Pb-induced PCD by enhancing BI-1 expression in tobacco suspension cells. *Bio-metals*, 2016; 29: 1059–1074
- [65] Kovács J., Poór P., Szepesi Á., Tari I.: Salicylic acid induced cysteine protease activity during programmed cell death in tomato plants. *Acta Biol. Hung.*, 2016; 67: 148–158
- [66] Krajewska M., Xu L., Xu W., Krajewski S., Kress C.L., Cui J., Yang L., Irie F., Yamaguchi Y., Lipton S.A., Reed J.C.: Endoplasmic reticulum protein BI-1 modulates unfolded protein response signaling and protects against stroke and traumatic brain injury. *Brain Res.*, 2011; 1370: 227–237
- [67] Lacomme C., Santa Cruz S.: Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 7956–7961
- [68] Lam E., Kato N., Lawton M.: Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 2001; 411: 848–853
- [69] Lee G.H., Ahn T., Kim D.S., Park S.J., Lee Y.C., Yoo W.H., Jung S.J., Yang J.S., Kim S., Muhrad A., Seo Y.R., Chae S.W., Kim H.R., Chae H.J.: Bax inhibitor 1 increases cell adhesion through actin polymerization: involvement of calcium and actin binding. *Mol. Cell. Biol.*, 2010; 30: 1800–1813
- [70] Lee G.H., Hwang J.D., Choi J.Y., Park H.J., Cho J.Y., Kim K.W., Chae H.J., Kim H.R.: An acidic pH environment increases cell death and pro-inflammatory cytokine release in osteoblasts: the involvement of BAX inhibitor-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2011; 43: 1305–1317
- [71] Lee G.H., Kim D.S., Kim H.T., Lee J.W., Chung C.H., Ahn T., Lim J.M., Kim I.K., Chae H.J., Kim H.R.: Enhanced lysosomal activity is involved in Bax inhibitor-1-induced regulation of the endoplasmic reticulum (ER) stress response and cell death against ER stress involvement of vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase). *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 24743–24753
- [72] Lee G.H., Kim H.K., Chae S.W., Kim D.S., Ha K.C., Cuddy M., Kress C., Reed J.C., Kim H.R., Chae H.J.: Bax inhibitor-1 regulates endoplasmic reticulum stress-associated reactive oxygen species and heme oxygenase-1 expression. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 21618–21628
- [73] Lee G.H., Kim H.R., Chae H.J.: Bax inhibitor-1 regulates the expression of P450 2E1 through enhanced lysosome activity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2012; 44: 600–611
- [74] Lee G.H., Oh K.J., Kim H.R., Han H.S., Lee H.Y., Park K.G., Nam K.H., Koo S.H., Chae H.J.: Effect of BI-1 on insulin resistance through regulation of CYP2E1. *Sci. Rep.*, 2016; 6: 32229
- [75] Lee G.H., Yan C., Shin S.J., Hong S.C., Ahn T., Moon A., Park S.J., Lee Y.C., Yoo W.H., Kim H.T., Kim D.S., Chae S.W., Kim H.R., Chae H.J.: BAX inhibitor-1 enhances cancer metastasis by altering glucose metabolism and activating the sodium-hydrogen exchanger: the alteration of mitochondrial function. *Oncogene*, 2010; 29: 2130–2141
- [76] Lesniewski M., Das S., Skomorovska-Prokvolit Y., Wang F.Z., Pellett P.E.: Primate cytomegalovirus US12 gene family: a distinct and diverse clade of seven-transmembrane proteins. *Virology*, 2006; 354: 286–298
- [77] Lima R.T., Martins L.M., Guimaraes J.E., Sambade C., Vasconcelos M.H.: Specific downregulation of bcl-2 and XIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Gene Ther.*, 2004; 11: 309–316
- [78] Linette G.P., Li Y., Roth K., Korsmeyer S.J.: Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 9545–9552
- [79] Lisak D., Schacht T., Gawlitza A., Albrecht P., Aktas O., Koop B., Gliem M., Hofstetter H.H., Zanger K., Bultynck, G., Parys J.B., De Smedt H., Kindler T., Adams-Quack P., Hahn M. i wsp.: Less BAX inhibitor-1 is a Ca²⁺ channel critically important for immune cell function and survival. *Cell Death Differ.*, 2016; 23: 358–368
- [80] Lisbona F., Rojas-Rivera D., Thielen P., Zamorano S., Todd D., Martinon F., Glavic A., Kress C., Lin J.H., Walter P., Reed J.C., Glimcher L.H., Hetz C.: BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1 α . *Mol. Cell*, 2009; 33: 679–691
- [81] Liu Q.: TMBIM-mediated Ca²⁺ homeostasis and cell death. *Biochim. Biophys. Acta*, 2017; 1864: 850–857
- [82] Maggio C., Barbante A., Ferro F., Frigerio L., Pedrazzini E.: Intracellular sorting of the tail-anchored protein cytochrome b5 in plants: a comparative study using different isoforms from rabbit and *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*, 2007; 58: 1365–1379
- [83] Matsumura H., Nirasawa S., Kiba A., Urasaki N., Saitoh H., Ito M., Kawai-Yamada M., Uchimiya H., Terauchi R.: Overexpression of Bax inhibitor suppresses the fungal elicitor-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) cells. *Plant J.*, 2003; 33: 425–434
- [84] Mitsuhashi I., Malik K.A., Miura M., Ohashi Y.: Animal cell-death suppressors bcl-x_i and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. *Curr. Biol.*, 1999; 9: 775–778
- [85] Nagano M., Ihara-Ohori Y., Imai H., Inada N., Fujimoto M., Tsutsumi N., Uchimiya H., Kawai-Yamada M.: Functional association of cell death suppressor, *Arabidopsis* Bax inhibitor-1, with fatty acid 2-hydroxylation through cytochrome b₅. *Plant J.*, 2009; 58: 122–134
- [86] O'Reilly L.A., Huang D.C., Strasser A.: The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *EMBO J.*, 1996; 15: 6979–6990
- [87] Pattingre S., Tassa A., Qu X., Garuti R., Liang X.H., Mizushima N., Packer M., Schneider M.D., Levine B.: Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 2005; 122: 927–939
- [88] Reimers K., Choi C.Y., Bucan V., Vogt P.M.: The Bax Inhibitor-1 (BI-1) family in apoptosis and tumorigenesis. *Curr. Mol. Med.*, 2008; 8: 148–156
- [89] Robinson K.S., Clements A., Williams A.C., Berger C.N., Frankel G.: Bax inhibitor 1 in apoptosis and disease. *Oncogene*, 2011; 30: 2391–2400
- [90] Rodriguez D.A., Zamorano S., Lisbona F., Rojas-Rivera D., Urra H., Cubillos-Ruiz J.R., Armisen R., Henriquez D.R., Cheng E.H., Letek M., Vaisar T., Irrazabal T., Gonzalez-Billault C., Letai A., Pimentel-Muñoz F.X. i wsp.: BH3-only proteins are part of a regulatory network that control the sustained signalling of the unfolded protein response sensor IRE 1 α . *EMBO J.*, 2012; 31: 2322–2335

- [91] Rojas-Rivera D., Hetz C.: TMBIM protein family: ancestral regulators of cell death. *Oncogene*, 2015; 34: 269–280
- [92] Rong Y.P., Aromolaran A.S., Bultynck G., Zhong F., Li X., McColl K., Matsuyama S., Herlitze S., Roderick H.L., Bootman M.D., Mignery G.A., Parys J.B., De Smedt H., Distelhorst C.W.: Targeting Bcl-2-IP3 receptor interaction to reverse Bcl-2's inhibition of apoptotic calcium signals. *Mol. Cell*, 2008; 31: 255–265
- [93] Sanchez P., de Torres-Zabala M., Grant M.: AtBI-1, a plant homologue of Bax inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast and is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge. *Plant J.*, 2000; 21: 393–399
- [94] Sanders D., Pelloux J., Brownlee C., Harper J.F.: Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell*, 2002; 14: S401–S417
- [95] Sano R., Hou Y.C., Hedvat M., Correa R.G., Shu C.W., Krajewska M., Diaz P.W., Tamble C.M., Quarato G., Gottlieb R.A., Yamaguchi M., Nizet V., Dahl R., Thomas D.D., Tait S.W. i wsp.: Endoplasmic reticulum protein BI-1 regulates Ca²⁺-mediated bioenergetics to promote autophagy. *Genes Dev.*, 2012; 26: 1041–1054
- [96] Saraiva N., Prole D.L., Carrara G., Maluquer de Motes C., Johnson B.F., Byrne B., Taylor C.W., Smith G.L.: Human and viral Golgi anti-apoptotic proteins (GAAPs) oligomerize via different mechanisms and monomeric GAAP inhibits apoptosis and modulates calcium. *J. Biol. Chem.*, 2013; 288: 13057–13067
- [97] Schenkman J.B., Jansson I.: The many roles of cytochrome b5. *Pharmacol. Ther.*, 2003; 97: 139–152
- [98] Staubach S., Hanisch F.G.: Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer. *Expert. Rev. Proteomics*, 2011; 8: 263–277
- [99] Surh Y.J., Kundu J.K., Li M.H., Na H.K., Cha Y.N.: Role of Nrf2-mediated heme oxygenase-1 upregulation in adaptive survival response to nitrosative stress. *Arch. Pharm. Res.*, 2009; 32: 1163–1176
- [100] Walter L., Marynen P., Szpirer J., Levan G., Günther E.: Identification of a novel conserved human gene TEGT. *Genomics*, 1995; 28: 301–304
- [101] Wang J., Bayles K.W.: Programmed cell death in plants: lessons from bacteria? *Trends Plant Sci.*, 2013; 18: 133–139
- [102] Wang X., Tang C., Huang X., Li F., Chen X., Zhang G., Sun Y., Han D., Kang Z.: Wheat BAX inhibitor-1 contributes to wheat resistance to *Puccinia striiformis*. *J. Exp. Bot.*, 2012; 63: 4571–4584
- [103] Watanabe N., Lam E.: *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. *Plant J.*, 2006; 45: 884–894
- [104] Watanabe N., Lam E.: BAX inhibitor-1 modulates endoplasmic reticulum stress-mediated programmed cell death in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 3200–3210
- [105] Weis C., Pfeilmeier S., Glawischmig E., Isono E., Pachel F., Hahne H., Kuster B., Eichmann R., Hüchelhoven R.: Co-immunoprecipitation-based identification of putative Bax inhibitor-1-interacting proteins involved in cell death regulation and plant-powdery mildew interactions. *Mol. Plant Pathol.*, 2013; 14: 791–802
- [106] Westphalen B.C., Wessig J., Leypoldt F., Arnold S., Methner A.: BI-1 protects cells from oxygen glucose deprivation by reducing the calcium content of the endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ.*, 2005; 12: 304–306
- [107] Xu C., Xu W., Palmer A.E., Reed J.C.: BI-1 regulates endoplasmic reticulum Ca²⁺ homeostasis downstream of Bcl-2 family proteins. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 11477–11484
- [108] Xu Q., Reed J.C.: Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol. Cell*, 1998; 1: 337–346
- [109] Yamada T., Ichimura K., Kanekatsu M., van Doorn W.G.: Homologs of genes associated with programmed cell death in animal cells are differentially expressed during senescence of *Ipomoea nil* petals. *Plant Cell Physiol.*, 2009; 50: 610–625
- [110] Yoshinaga K., Arimura S.I., Hirata A., Niwa Y., Yun D.J., Tsutsumi N., Uchimiya H., Kawai-Yamada M.: Mammalian Bax initiates plant cell death through organelle destruction. *Plant Cell Rep.*, 2005; 24: 408–417
- [111] Yu L.H., Kawai-Yamada M., Naito M., Watanabe K., Reed J.C., Uchimiya H.: Induction of mammalian cell death by a plant Bax inhibitor. *FEBS Lett.*, 2002; 512: 308–312
- [112] Yue H., Nie S., Xing D.: Over-expression of *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 delays methyl jasmonate-induced leaf senescence by suppressing the activation of MAP kinase 6. *J. Exp. Bot.*, 2012; 63: 4463–4474
- [113] Yun C.H., Chae H.J., Kim H.R., Ahn T.: Doxorubicin- and daunorubicin-induced regulation of Ca²⁺ and H⁺ fluxes through human Bax inhibitor-1 reconstituted into membranes. *J. Pharm. Sci.*, 2012; 101: 1314–1326
- [114] Zhang M., Li X., Zhang Y., Zhou K.: Bax inhibitor-1 mediates apoptosis-resistance in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Mol. Cell Biochem.*, 2010; 333: 1–7
- [115] Zhou J., Zhu T., Hu C., Li H., Chen G., Xu G., Wang S., Zhou J., Ma D.: Comparative genomics and function analysis on BI1 family. *Comput. Biol. Chem.*, 2008; 32: 159–162

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.