



Białka z rodziny Bcl-2 a przekaznictwo sygnału wapniowego w zarodkach ssaków uzyskiwanych techniką klonowania somatycznego

Marcin Samiec

Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki
– Państwowy Instytut Badawczy, Balice k. Krakowa

The Bcl-2 family proteins and calcium signaling in mammalian embryos generated by somatic cell cloning

Summary

The efficiency of somatic cell nuclear transfer (SCNT) technology in mammalian species remains unsatisfactory. One of the main causes of low developmental capability of pre- and peri-implanted somatic cell cloned embryos is the high occurrence of apoptotic cell death, which is prompted by incorrect calcium signaling. The latter is accompanied by upregulation of the members from the Bcl-2 protein family in the blastomeres of SCNT embryos derived from the reconstructed oocytes exposed to artificial activating factors that induce the phenomenon of Ca^{2+} ion excitotoxicity. Overexpression of antiapoptotic proteins from the Bcl-2 family plays a fundamental role in suppression of different pathways involving intracellular transduction of programmed cell death signal in the somatic cell cloned embryos. Enhancement of Bcl-2 synthesis in the cytoplasm as well as on the outer/cytoplasmic surface of cisterns and tubules of granular endoplasmic reticulum (ER_g) and thereby increase in its concentration and activity in the membranes of ER and mitochondria prevents the redistribution of free calcium cations from ER to mitochondria. The purpose of this article is to provide an overview of the current knowledge on molecular aspects of controlling calcium intracellular homeostasis in mammalian SCNT embryos, in which apoptotic cell death was stimulated by an improper activation of reconstituted oocytes.

Key words:

SCNT embryo, artificial activation, programmed cell death, Bcl-2, endoplasmic reticulum, Ca^{2+} ion, calcium-dependent ATPase, phospholamban, ion channel, mitochondrial Ca^{2+} uniporter.

Adres do korespondencji

Marcin Samiec,
Dział Biotechnologii
Rozrodu Zwierząt,
Instytut Zootechniki
– Państwowy Instytut
Badawczy,
32-083 Balice k. Krakowa;
e-mail:
msamiec@izoo.krakow.pl

1. Wstęp

Mechanizm przekazywania sygnału wapniowego w cytozolu oocytów zrekonstruowanych techniką klonowania somatycznego, który został nieprawidłowo zainicjowany przez fizyczne lub chemiczne czynniki aktywujące, może prowadzić nie tylko do stymulacji programu rozwojowego zarodków, lecz także może powodować stopniowe uruchomienie genetycznie zaprogramowanego systemu przekazywania sygnału apoptotycznego, odpowiedzialnego za czynną autodestrukcję komórek w przedimplantacyjnych zarodkach klonalnych. Z kolei, uruchomienie molekularnego scenariusza apoptozy w zarodkach ssaków jest podstawowym elementem mechanizmu regulatorowego przedimplantacyjnej fazy embriogenezy oraz śmiertelności zarodków w stadium blastocysty. W błonach retikulum endoplazmatycznego oraz w zewnętrznej błonie mitochondrialnej komórek dzielących się zarodków, zapoczątkowany zostaje wówczas program nadekspresji białek Bad i Bax, które są przedstawicielami klasy agonistów (promotorów) apoptozy z rodziny białek Bcl-2 (ang. *B-Cell Leukemia/Lymphoma-2*), regulujących proces samobójczej śmierci fizjologicznej (1,2). Nazwa tej rodziny, obejmującej zarówno białka inhibitorowe, jak i stymulatorowe procesu programowanej śmierci komórek, pochodzi od produktu ekspresji protoonkogenu *bcl-2*, pierwotnie wykrytego w białaczkach i chłoniakach wywodzących się z limfocytów B. Wzrost stężenia i poziomu aktywności proapoptotycznych białek Bad (ang. *Bcl-2 Agonist of Cell Death*) i Bax w błonach różnych kompartmentów wewnątrzkomórkowych przyczynia się do przyspieszenia zwrotnej akumulacji jonów Ca^{2+} w cysternach i kanalikach siateczki śródplazmatycznej. Do zwiększenia szybkości i pojemności magazynowania *de novo* kationów wapnia w świetle ER prowadzi proces stymulacji czynnościowej specyficznych pomp wapniowych należących do rodziny retikularnych ATPaz zależnych od jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} (ERCA/ERCMA, ang. *Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} and Mg^{2+} -Dependent ATPase*). Z kolei reakumulacja jonów wapniowych w depozytach ER zwiększa natężenie wewnątrzkomórkowego przepływu wolnych kationów wapnia z siateczki śródplazmatycznej do mitochondriów (3,4). Ponadto, nasilenie aktywności translacyjnej cząsteczek mRNA, będących produktami transkrypcji protoonkogenów *bad* oraz *bax* indukuje wzrost częstotliwości oraz amplitudy falowych wyrzutów jonów Ca^{2+} zmagazynowanych w retikulum endoplazmatycznym. Jest to następstwem podwyższenia poziomu gęstości oraz aktywności InsP_3 -zależnych kanałów wapniowych (5,6). Kolejnym efektem oddziaływania białek Bad oraz Bax, które jednocześnie pełnią funkcję inhibitorów aktywności antyapoptotycznych białek z podrodziny Bcl-2, jest intensyfikacja transportu aktywnego kationów wapniowych do otoczki jądrowej i nukleoplazmy jąder komórkowych. Ten ostatni proces katalizowany jest przez jądrowe ATPazy zależne od jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} , będące przedstawicielami pomp wapniowych z rodziny NCA/NCMA (ang. *Nuclear Ca^{2+} - and Mg^{2+} -Dependent ATPase*), podobnej do tej występującej w ER (7-9).

Udowodniono, że u bydła i świni domowej nasilenie ekspresji proapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2, takich jak Bax oraz obniżenie ekspresji antyapoptotycz-

nych białek z rodziny Bcl-2, takich jak Bcl-2 i/lub Bcl-X_L nie są zjawiskami specyficznymi tylko dla hodowanych *in vitro* zarodków klonalnych. Są one powszechne także w odniesieniu do hodowanych w warunkach pozaustrojowych zarodków, które wyprodukowane zostały metodą zapłodnienia *in vitro* (IVF, ang. *In Vitro Fertilization*). Na podstawie wyników badań przeprowadzonych u tych gatunków zwierząt gospodarskich wykazano również, że częstość występowania obu tych zjawisk była znacznie wyższa wśród blastocyst rozwijających się w warunkach *ex vivo* z zarodków uzyskanych w następstwie klonowania somatycznego lub zapłodnienia *in vitro* niż wśród blastocyst rozwijających się w warunkach wewnątrzustrojowych (w macicy ciężarnych samic-dawczyń) z zarodków uzyskanych w następstwie zapłodnienia *in vivo* (10-13). Ponadto zdiagnozowano, że w warunkach hodowli *in vitro* ekspresja protoonkogenów *bax* i *bcl-2*, oceniana na podstawie ich aktywności transkrypcyjnej i/lub na bazie aktywności translacyjnej produktów ich transkrypcji, była znacznie wyższa w odniesieniu do blastocyst bydła rozwijających się z zygot zrekonstruowanych z jąder fibroblastów tkanki skórnej dorosłych osobników niż w odniesieniu do blastocyst rozwijających się z zygot zrekonstruowanych z jąder fibroblastów płodowych lub z jąder komórek wzgórka jajonośnego pęcherzyków jajnikowych dojrziałych płciowo jałówek i krów. W komórkach blastocyst klonalnych wszystkich trzech typów zachowana była taka sama zależność – nadekspresji cząsteczek mRNA i/lub białek Bax w stosunku do transkryptów i/lub białek Bcl-2. Z kolei, jedynie w przypadku blastocyst klonalnych uzyskanych z zarodków zrekonstruowanych z jąder fibroblastów tkanki skórnej dorosłych osobników aktywność transkrypcyjna protoonkogeny kodującego antyapoptotyczne białko Bcl-2 utrzymywała się na poziomie zbliżonym do profilu ekspresji tego genu w komórkach hodowanych *ex vivo* zarodków w stadium blastocysty uzyskanych w wyniku procedury IVF (11,14). Na podstawie analizy porównawczej wyników badań nad klonowaniem somatycznym bydła i świń można wnioskować, że stymulacja nie tylko aktywności transkrypcyjnej protoonkogeny kodującego proapoptotyczne białko Bax, lecz także aktywności translacyjnej produktów transkrypcji genu *bax* może być jedną z głównych przyczyn znacznego obniżenia przed- i okołoinplantacyjnych kompetencji rozwojowych zarodków klonalnych w stosunku do potencjału rozwojowego *in vitro* oraz *in vivo* zarodków wyprodukowanych w następstwie zapłodnienia pozaustrojowego (10,15-17).

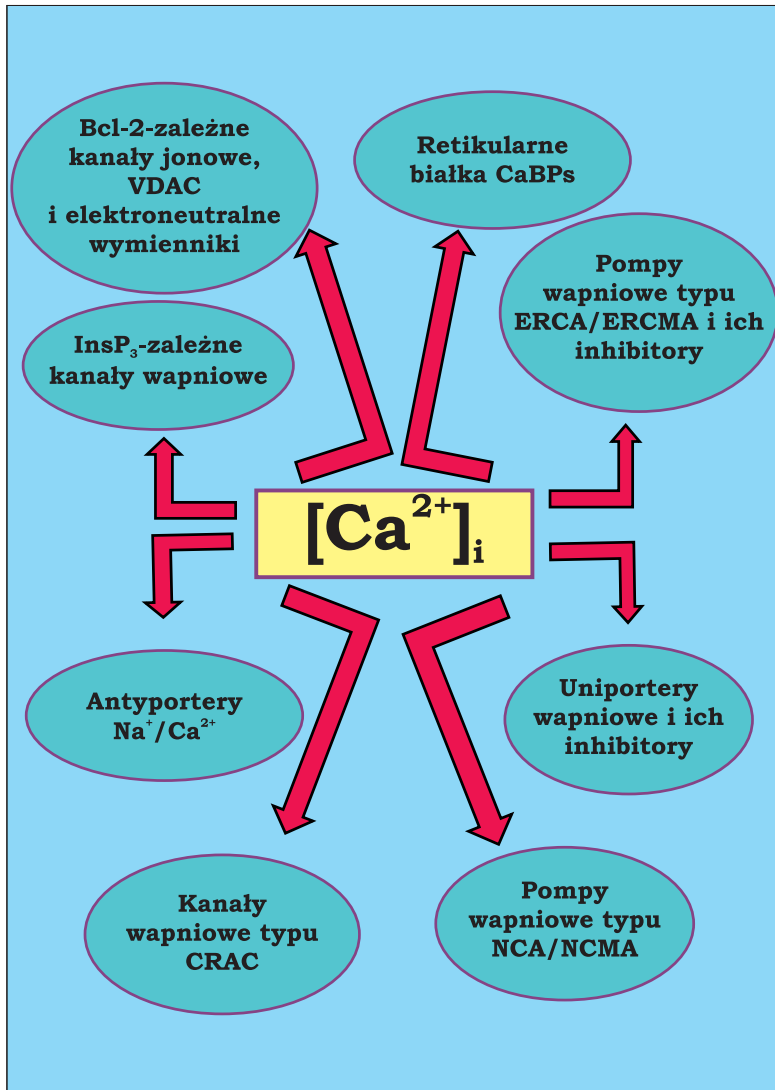
2. Rola białek rodziny Bcl-2 w regulacji gospodarki wapniowej w apoptotycznych komórkach zarodków klonalnych

Wzrost stężenia, a także wzrost aktywności głównych białek regulatorowych z rodziny Bcl-2, należących do klasy antagonistów apoptozy – białka Bcl-2 oraz w mniejszym stopniu Bcl-X_L, jest prawdopodobnie mechanizmem obronnym komórek zarodków klonalnych przed przekroczeniem punktu nieodwracalności procesu apoptozy. Mechanizm ten jest obserwowany w błonach organelli stanowiących

wewnątrzkomórkowe magazyny jonów Ca^{2+} takich jak siateczka śródplazmatyczna i mitochondria (18,19). Przypuszcza się, że te białka są bezpośrednio odpowiedzialne za spadek tzw. spoczynkowego poziomu koncentracji wapnia w retikulum endoplazmatycznym $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$, spowodowany obniżeniem stężenia zarówno jego formy zjonizowanej, należącej do tzw. mobilnej puli kationów wapniowych, jak i odwracalnie schelatowanej przez specyficzne białka sensorowe jonów Ca^{2+} (głównie kalretikulinę). Zmniejszenie poziomu kationów wapniowych zgromadzonych w świetle cystern i kanalików ER ma wpływ na kinetykę opróżniania tych wewnątrzkomórkowych rezerwuarów Ca^{2+} . Dokonuje się to poprzez redukcję szybkości i pojemności uwalniania jonów wapnia za pośrednictwem kanałów błonowych zależnych od *myo-inozytolo-1,4,5-trisfosforanu* (InsP_3 , ang. *Myo-Inositol-1,4,5-Trisphosphate*) (rys., 20,21). Efektem spowolnienia tempa redystrybucji jonów Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej gładkiej i szorstkiej do cytozolu blastomerów zarodka klonalnego jest spadek częstotliwości, a także amplitudy kolejno generowanych oscylacyjnych wyrzutów kationów wapnia (22,23). To z kolei prowadzi stopniowo do skrócenia całkowitego czasu trwania, a ponadto do obniżenia poziomu przejściowego przyrostu cytoplazmatycznej koncentracji wolnych jonów wapniowych $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ w stanie spoczynkowym blastomerów zarodka. Ten specyficzny stan niewrażliwości komórek zarodka klonalnego na zewnętrzne bodźce stymulujące przypada na okres rozwoju przedimplantacyjnego następujący bezpośrednio po sztucznej aktywacji zrekonstruowanych hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych (24-26).

2.1. Molekularne mechanizmy interakcji antyapoptotycznych białek rodziny Bcl-2 z ATPazami wapniowymi w błonach siateczki śródplazmatycznej komórek zarodkowych

Wynikiem spadku spoczynkowego poziomu przyrostu $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$, indukowanego przez nadekspresję antyapoptotycznych białek Bcl-2 oraz Bcl-X_L w dwuwarstwie fosfolipidowej błon ER, jest zmniejszenie stężenia głównego białka sensorowego kationów wapnia – kalmoduliny – w cytozolu komórek zarodków klonalnych. Przyczynia się to na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego do obniżenia gęstości oraz zahamowania aktywności retikularnych ATPaz zależnych od jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} (ERCA/ERCMA) wskutek ich progresywnego odwrażliwiania (desensytyzacji) (rys.). Enzymy te spełniają funkcję pomp wapniowych, które odpowiedzialne są za czynny transport kationów wapnia z cytoplazmy do światła retikulum endoplazmatycznego. Efektem zmian w kinetyce akumulacji jonów Ca^{2+} w świetle siateczki śródplazmatycznej, które spowodowane są osłabieniem zdolności transportującej ATPaz wapniowych, jest zatem zmniejszenie szybkości i pojemności magazynowania *de novo* kationów wapniowych w ER, tj. ich resekwestracji od cytozolowej puli Ca^{2+} (27,28). Przypuszcza się, że spowolnienie i obniżenie stopnia reakumulacji kationów wapnia w świetle retikulum endoplazmatycznego komórek zarodków klonalnych jest wywołane wzrostem koncentracji



Rys. Ognia anty- i proapoptotycznej regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia wolnych jonów wapnia $[Ca^{2+}]_i$ w komórkach zarodków klonalnych. W błonach retikulum endoplazmatycznego (ER) obejmują one: 1) kanały wapniowe zależne od *myo*-inozytolo-1,4,5-*trifosforanu*, 2) specyficzne ATPazy zależne od jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} (ERCA/ERCMA) i ich inhibitory (fosfolamban), 3) kanały kationowe lub chimerowe (kationowo-anionowe), które są formowane przez białka Bcl-2 i/lub anionowe kanały zależne od transmembranowego potencjału elektrochemicznego (VDAC), 4) elektroneutralne wymienniki K^+/Ca^{2+} lub H^+/Ca^{2+} oraz 5) białka wiążące wapń (CaBPs) m.in. kalretikulina, białka GRP78 (BiP) i GRP94, enzym PDI; w zewnętrznej błonie mitochondrialnej – 6) wysoce selektywne dla jonów Ca^{2+} transmembranowe nośniki (uniportery wapniowe) i ich inhibitory; w zewnętrznej błonie otoczki jądra komórkowego – 7) specyficzne ATPazy zależne od jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} (NCA/NCMA), a w plazmolemie – 8) wymiennicze sodowo-wapniowe (antyportery Na^+/Ca^{2+}) oraz 9) kanały jonowe typu CRAC, które są odpowiedzialne za pojemnościowy napływ zewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} do cytoplazmy, będący rezultatem opróżnienia magazynów wapnia zlokalizowanych głównie w ER (szczegółowe objaśnienia w tekście)

i aktywności zlokalizowanych na zewnętrznej powierzchni dwuwarstwy białkowo-fosfolipidowej błon ER cząsteczek fosfolambanu, który należy do podrodziny/klasz specyficznych endogennych inhibitorów kompetycyjnych ATPaz typu ERCA/ERCMA (29,30) (rys.). Istnienie takiego mechanizmu odwracalnego zahamowania funkcji aktywnego transportu jonów Ca^{2+} przez pompy wapniowe ER zostało potwierdzone przez model supresji *in vitro* procesu aktywacji ścieżki przekazywania sygnału apoptotycznego w płodowych komórkach fibroblastycznych za pośrednictwem wysoce selektywnych inhibitorów pomp wapniowych z grupy nieodwracalnych blokerów ATPaz siateczki śródplazmatycznej (31,32). Trwała inhibicja kompetycyjna pomp wapniowych indukowana oddziaływaniem na komórki takich mediatorów chemicznych jak np. taspigargina (TG, laktone seskwiterpenowy wyizolowany z rośliny *Thapsia galganica*, będący również promotorem transformacji nowotworowej komórek) lub 2,5-ditertybutyrylo-1,4-benzohydrokwinon (tBuBHQ) prowadziła do progresywnego opróżniania wewnątrzkomórkowych magazynów wapnia w ER oraz w mitochondriach (33,34). Wyniki tych badań mogą świadczyć raczej nie tyle o bezpośrednim wpływie antyapoptotycznych białek Bcl-2 na aktywność ATPaz z rodziny ERCA/ERCMA, lecz o pośrednim efekcie ich oddziaływania na enzymatyczne pompy wapniowe poprzez stymulację (modulowanie funkcji) specyficznych inhibitorów ATPaz zależnych od jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} z grupy integralnych białek błonowych retikulum endoplazmatycznego (35,36). Klasycznym przykładem regulatorowej roli białek Bcl-2 w stosunku do odwracalnych blokerów pomp wapniowych ER jest inicjacja aktywności najlepiej poznanego przedstawiciela tej klasy białek – fosfolambanu, który stanowi niskocząsteczkowe, integralne białko błonowe siateczki śródplazmatycznej. Dopiero jego fosforylacja przez zależną od cyklicznego 3',5'-adenozynomonofosforanu (cAMP, ang. *Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate*) kinazę białkową A (PKA, ang. *Protein Kinase A*) lub zależną od Ca^{2+} -kalmoduliny kinazę białkową typu II (CaM-PK-II, ang. *Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II*) znosi jego hamujące działanie i sprawia, że aktywność ATPazy wapniowej ponownie wzrasta (27,37,38). Jednakże, w wyniku braku uzupełniania przez unieczynnioną za pośrednictwem fosfolambanu Ca^{2+} -ATPazę malejącego poziomu mobilnej puli wapnia, tj. jego formy zjonizowanej w cysternach i kanałkach siateczki śródplazmatycznej gładkiej i szorstkiej, dochodzi w nich do gwałtownej aktywacji białek wiążących wapń (CaBPs, ang. *Calcium-Binding Proteins*) i zwiększenia ich funkcji chelatorowej w stosunku do wolnych jonów Ca^{2+} (39) (rys.).

2.2. Biochemiczne przyczyny nabywania przez białka Bcl-2 molekularnej kompetencji do formowania kanałów jonowych w błonach siateczki śródplazmatycznej komórek zarodkowych

Straty w obrębie mobilnej puli kationów wapniowych wewnątrz cystern i kanałków ER wzrastają w następstwie indukowanej głównie przez antyapoptotyczne białka Bcl-2 zwiększonej przepuszczalności błon ER dla protonów (H^+), jonów me-

tali jednowartościowych (K^+) i dwuwartościowych (Ca^{2+}) oraz w mniejszym zakresie dla anionów chlorkowych (Cl^-) (24,28). Nie mogą być one zrekompensowane w wyniku uwarunkowanej przez aktywację Ca^{2+} -ATPaz akumulacji wapnia w świetle ER. Zwiększenie przecieku jonów wapnia ze światła retikulum endoplazmatycznego do cytozolu komórek zarodka jest w znacznym stopniu uzależnione od: 1) formowania przez białka Bcl-2 w dwuwarstwie lipidowej błon ER kanałów jonowych o niskim stopniu selektywności w stosunku do kationów i/lub 2) tworzenia przez nie chimerowych (kationowo-anionowych) kanałów napięciowo-zależnych o szczególnie wysokim stopniu przewodnictwa w stosunku do dodatnio naładowanych jonów o niskiej energii hydratacji, a zatem jonów Ca^{2+} (rys.). Ten ostatni rodzaj kanałów stanowią tzw. kanały wapniowo- i wodorowo (oksoniowo)-chlorkowe ($Ca^{2+}/H^+(H_3O^+)/Cl^-$). Charakterystyczna dla nich jest jednokierunkowa (symportowa) przepuszczalność jonotropowa, tzn. albo docytozolowa, albo do wnętrza cystern i kanalików ER, a to oznacza, że ich nośnikowe funkcje współtransportowe uwarunkowane są dynamicznymi zmianami transmembranowego potencjału elektrochemicznego na powierzchni zewnętrznej (cytoplazmatycznej) oraz na powierzchni wewnętrznej (luminalnej) błon siateczki śródplazmatycznej (5,40). Generowany przejściowo za pośrednictwem obu typów kanałów błonowych ER nadprogowy przyrost koncentracji wolnych kationów wapniowych w cytoplazmie komórek powyżej punktu krytycznego, wyznaczonego przez ekstremum 10^{-5} M/L, wykracza poza fizjologiczne możliwości adaptacyjne przedimplantacyjnych zarodków klonalnych, tj. granicę ich wewnątrzkomórkowej tolerancji na podwyższone stężenie jonów Ca^{2+} wahające się w przedziale od 10^{-7} do 10^{-6} M/L. Dlatego też ulega on następnie zmniejszeniu poniżej górnej wartości progowej tzw. spoczynkowego poziomu zmian koncentracji wapnia (rzędu 10^{-5} M/L) poprzez wzrost frekwencji usuwania jonów Ca^{2+} do środowiska pozakomórkowego (pożywki hodowlanej) (23,31). Eliminacja kationów wapnia z cytoplazmy komórek zarodka odbywa się wbrew gradientowi stężeń za pośrednictwem zlokalizowanych w plazmolemie jonowymiennych układów, które wykazują wysoką zdolność do jednoczesnego transportu w przeciwnych kierunkach kationów o różnym ładunku elektrostatycznym. Układy te określane są mianem wymiennicy sodowo-wapniowych lub antyporterów Na^+/Ca^{2+} , a ich przeciwpądowe funkcje nośnikowe są zależne od hydrolizy adenosyno-5'-trifosforanu (ATP, ang. *Adenosine 5'-Trisphosphate*) (rys., 18,41). Z kolei znaczny spadek parametrów biofizycznych (amplitudy, częstotliwości oraz jednostkowego i całkowitego czasu trwania) oscylacji wapniowych w cytozolu komórek zarodków klonalnych, hodowanych *in vitro*, prowadzi do obniżenia szybkości i wielkości pojemnościowego dokomórkowego napływu egzogennych jonów Ca^{2+} na zasadzie transportu nośnikowego biernego, tj. uniportu przez kanały wapniowe typu CRAC (ang. *Ca²⁺ Release-Activated Ca²⁺ Channels*), które są okresowo formowane w błonie cytoplazmatycznej (rys.). Stymulacja czynnościowa kanałów CRAC jest bezpośrednio skorelowana ze wzrostem stopnia opróżnienia retikulum endoplazmatycznego z puli wolnych (nieschelatowanych) kationów wapnia, a zatem ze wzrostem kinetyki docytozolowego uwalniania jonów Ca^{2+} za

pośrednictwem InsP_3 -zależnych kanałów wapniowych. Konsekwencją spadku przepuszczalności jonotropowej kanałów CRAC w plazmolemie jest gwałtowna redukcja trwałego (resztkowego) poziomu cytozolowej koncentracji kationów wapnia (28,42,43).

2.3. Molekularne mechanizmy interakcji białek Bcl-2 z mitochondrialnymi uniporterami wapniowymi w komórkach zarodka

Przypuszcza się, że odbywająca się za pośrednictwem białek Bcl-2, o ekspresji specyficznej dla błon ER, redukcja dolnej granicy stałego stężenia jonów Ca^{2+} w stanie spoczynkowym komórki do tzw. wartości podprogowej jest sygnałem do gwałtownego osłabienia kinetyki dyfuzji ułatwionej kationów wapniowych do zlokalizowanych w sąsiedztwie cystern i kanalików siateczki śródplazmatycznej mitochondriów. Za proces wspomaganą domitochondrialną translokację kationów wapnia odpowiedzialny jest system wysoce selektywnych dla Ca^{2+} przezbłonowych nośników, nazywanych uniporterami wapniowymi. Umiejscowione są one w obrębie zewnętrznej błony mitochondrialnej (44,45) (rys.). Mitochondria stanowią bowiem rodzaj specyficznych zbiorników o dużej i relatywnie trwałej pojemności buforowej w stosunku do Ca^{2+} , przyczyniając się tym samym do przejściowej immobilizacji tych jonów w obiegu wewnątrzkomórkowym. Wzrost aktywności antyapoptotycznych białek Bcl-2 pochodzących z błon ER inicjuje zatem przyspieszenie spadku amplitudy przyrostu koncentracji wolnych kationów wapnia w przestrzeni międzybłonowej i matriksu mitochondrialnej. Z kolei akceleracja tego ostatniego procesu indukuje stopniowo na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego zwiększenie aktywności również frakcji integralnych białek Bcl-2 w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (7,46). Bezpośrednim tego efektem jest podwyższenie wartości elektrochemicznego potencjału transmembranowego $\Delta\Psi_m$ w mitochondriach i towarzyszące temu procesowi zmniejszenie przepuszczalności błon mitochondrialnych (47,48). Prowadzi to do zahamowania uwalniania do cytozolu komórek zarodka kilku czynników apoptogennych. Zalicza się do nich np. 1) proapoptotyczne białko/flawoproteinę AIF (ang. *Apoptosis Inducing Factor*) o masie molekularnej 57 kDa, wykazujące znaczną homologię do oksydoreduktaz oraz zdolność aktywacji prokaspazy-3; 2) cytochrom c, określane również mianem drugiego czynnika aktywującego kaskadę proteaz apoptotycznych (Apaf-2, ang. *Apoptosis Protease Activating Factor-2*); 3) białko Smac/DIABLO (ang. *Second Mitochondrial Activator of Caspases/Direct IAP [Inhibitor of Apoptosis Protein]-Binding Protein with Low pI*), określane jako drugorzędowy/wtórny aktywator kaspaz pochodzenia mitochondrialnego lub białko o niskiej wartości punktu izoelektrycznego, inaktywujące białkowe czynniki inhibitorowe procesu apoptozy, m.in. inhibitory wielu kaspaz inicjujących (-8, -10) i wykonawczych (-3, -6, -7), poprzez ich bezpośrednie wiązanie, a także 4) prokaspazy-2, -3 i -9, czyli zymogeny kaspaz należących do inicjatorów fazy wykonawczej (-2, -9) oraz efektorów fazy wykonawczej apoptozy (-3) (49-51).

Mechanizm dodatniego sprzężenia zwrotnego, który sprowokowany jest przyrostem stężenia należących do grupy antagonistów procesu apoptozy integralnych białek Bcl-2 w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, przyczynia się również do odwracalnego zablokowania funkcji translokacyjnych uniporterów wapniowych poprzez stymulację aktywności ich białek supresorowych w mitochondriach (52,53) (rys.). Dowodem wskazującym pośrednio na brak istnienia bezpośrednich interakcji między białkami represorowymi apoptozy z podrodziny Bcl-2 a transmembranowymi domenami białek spełniających rolę nośników specyficznych dla jonów Ca^{2+} w zewnętrznej błonie mitochondrialnej jest model supresji *in vitro* procesu aktywacji wewnątrzkomórkowego szlaku przekazywania sygnału apoptotycznego w fibroblastach płodowych. W modelu tym, pozaustrojowa represja systemu transdukcji hiperkalcemicznej informacji proapoptotycznej odbywała się za pośrednictwem wysoce selektywnych inhibitorów uniporterów wapniowych w mitochondriach np. *m*-chlorofenylohydroksycjanku karbonylowego lub czerwieni rutenowej (40,54). Jednakże obniżony poziom kationów wapnia w przestrzeni międzybłonowej oraz w macierzy mitochondrialnej nie jest spowodowany jedynie zahamowaniem funkcji transportujących przezbłonowych nośników jonów Ca^{2+} w tych organellach poprzez specyficzne endogenne inhibitory o niepoznanej dotąd strukturze biochemicznej, lecz przede wszystkim spadkiem poziomu przejściowego przyrostu kationów wapniowych w cytoplazmie (55,56) (rys.).

3. Molekularne aspekty oddziaływań białek wiążących kationy wapnia z Bcl-2-zależnymi kanałami jonowymi w błonach siateczki śródplazmatycznej komórek zarodków klonalnych

Za całkowitą koncentrację kationów wapniowych zmagazynowanych w formie schelatowanej i niezwiązanej stechiometrycznie w retikulum endoplazmatycznym odpowiada stan względnej równowagi między aktywną akumulacją jonów Ca^{2+} w świetle kanalików i cystern ER, a ich biernym wyciekiem przez kanały jonowe uformowane w błonach siateczki śródplazmatycznej przez integralne białka Bcl-2 z grupy inhibitorów apoptozy (57,58) (rys.). Naruszenie tego stanu homeostazy wapniowej przez uruchomienie ścieżki przekazywania sygnału apoptotycznego i gwałtowny przyrost cytozolowego stężenia jonów Ca^{2+} powoduje zwiększenie natężenia aktywacji transkrypcyjnej protoonkogenu *bcl-2* i stymulację translacji cząsteczek mRNA kodujących białko Bcl-2, co prowadzi do nadekspresji białek Bcl-2 w komórkach przedimplantacyjnych zarodków klonalnych (59,60). Innymi mechanizmami stymulującymi przyspieszenie formowania kanałów jonowych przez białka Bcl-2 są nasilenie modyfikacji potranslacyjnych, tj. glikozylacji i/lub proteolitycznego przetwarzania/dojrzenia natywnego prekursora tego białka – tzw. pro- lub prebiałka Bcl-2 oraz zmiany konformacji białka Bcl-2 i inicjacja jego oligomeryzacji (61,62). Te procesy biochemiczne są zapoczątkowywane albo w wyniku przyłączenia się do białek Bcl-2 aktywnych ko-

faktorów, jakimi mogą być białka wiążące jony wapnia w świetle ER (CaBPs), albo w wyniku „wychwytywania” jonów Ca^{2+} przez domeny asocjacyjne labilnych produktów ekspresji protoonkogenów *bcl-2* o masie molekularnej 26 kDa (63,64) (rys.). Przyпуска się nawet, że integralne białka błonowe Bcl-2 oraz Bcl- X_L , zlokalizowane w dwuwarstwie lipidowej ścian kanalików i cystern ER, pełnią funkcję białek zakotwiczających aktywne białka CaBPs, które zaliczane są do grupy wewnątrzkomórkowych białek protekcyjnych w warunkach ekscytotoksyczności sygnału wapniowego. Z kolei, białka chelatujące kationy wapniowe indukują prawdopodobnie zmiany konfiguracji przestrzennej i/lub przemiany tautomeryczne w strukturze chemicznej białek Bcl-2 oraz Bcl- X_L , prowadzące do zwiększenia podatności ich form monomerycznych lub homodimerycznych na oligomeryzację cząsteczek. Oligomeryzacja antyapoptotycznych białek Bcl-2 odgrywa z kolei istotną rolę w formowaniu przez te białka w błonach ER kanałów jonowych o niskiej selektywności w stosunku do kationów jedno- i dwuwartościowych, ale o wysokim stopniu przewodnictwa dielektrycznego dla jonów Ca^{2+} (65,66). Katalizowane przez kinazy PKA lub CaM-PK-II zmiany w stopniu fosforylacji poszczególnych reszt aminoacylowych w obrębie specyficznych segmentów w hydrofilowych domenach cytoplazmatycznych białek Bcl-2 mają także istotny wpływ na zwiększenie przepuszczalności kanałów kationowych lub chimerowych (kationowo-anionowych) kanałów formowanych zarówno przez białka Bcl-2, jak i/lub anionowe kanały zależne od napięcia pola elektrostatycznego utworzonego na powierzchni błon ER, tj. kanały VDAC (ang. *Voltage-Dependent Anion Channel*) (rys., 67, 68). Zmiany biochemiczne i biofizyczne, obejmujące wzrost poziomu pH wewnątrz cystern i kanalików retikulum endoplazmatycznego oraz obniżenie elektrochemicznego potencjału transbłonowego, które wynikają ze zmniejszenia zawartości kationów wapniowych i wodorowych/oksoniowych (Ca^{2+} i $\text{H}^+/\text{H}_3\text{O}^+$) oraz anionów chlorkowych (Cl^-), mogą powodować zwiększenie średnicy światła, a także wydłużenie czasu otwarcia zależnych od Bcl-2 i/lub Bcl- X_L kanałów jonowych. To z kolei wpływa na wzrost częstotliwości oraz pojemności przepływu kationów wapnia z ER do cytoplazmy. Natomiast zmiany fizykochemiczne o odmiennym charakterze, czyli zmiany, które dotyczą obniżenia pH wywołanego zwiększeniem stężenia i energii jonizacji kationów oksoniowych i anionów chlorkowych w świetle ER oraz wzrostu potencjału transbłonowego, indukują odwrócenie kierunku pasywnego „przecieku” kationów wapniowych tzn. z cytozolu do cystern i kanalików siateczki śródplazmatycznej (6,69).

Wpływ lub napływ jonów Ca^{2+} z/do ER przez kanały uformowane za pośrednictwem hydrofobowych domen śródbłonowych białek Bcl-2 może sugerować istnienie w ich obrębie elektroneutralnych wymienników, które zaangażowane są także we wspomaganą translokację (transport bierny nośnikowy) jonów K^+ lub protonów (rys.). Wymienniki takie mogą potencjalnie pracować w obu kierunkach na zasadzie jednoczesnej wymiany przeciwnopądowej, czyli antyportu jonów o zmiennej wartościowości dodatniego ładunku elektrostatycznego (kationów metali jedno- lub dwuwartościowych). Ze względu na skierowany albo do światła cystern i kanalików ER, albo do cytozolu gradient stężeń jonów K^+ lub H^+ odgrywają one podwójną rolę,

tn. służą albo do gwałtownej eliminacji kationów wapnia z ER (na zasadzie transportu pasywnego, tj. zgodnego z gradientem stężenia Ca^{2+}), albo do doretikularnej dyfuzji ułatwionej kationów wapnia (70) (rys.). Gwałtowne obniżenie tzw. spoczynkowego poziomu koncentracji jonów Ca^{2+} wewnątrz siateczki śródplazmatycznej indukowane wzrostem częstotliwości opróżnienia wysoce mobilnych miejsc depozycji wapnia w ER oraz zahamowaniem jego transportu aktywnego do światła cystern i kanalików ER powoduje zwiększoną mobilizację miejsc chelatowania kationów wapnia w obrębie jego białek adaptorowych lub akceptorowych. Natomiast podwyższenie wartości tzw. potencjału retencyjnego retikulum endoplazmatycznego dla sygnalizatora wapniowego poprzez zwiększenie aktywności białek wiążących jony Ca^{2+} (CaBPs) jest niezbędne do „wychwytywania” tych kationów z już znacznie ograniczonej puli wapnia w rezerwuarach ER. Zdolność odwracalnego wiązania wapnia w formie zjonizowanej przez domeny asocjacyjne białek z grupy CaBPs wynika bezpośrednio z ich niskiego stopnia powinowactwa do jonów Ca^{2+} , a także z ich wysokiej jonowymiennej pojemności magazynowania kationów (71,72) (rys.). Jednakże te właściwości fizykochemiczne białek chelatorowych wapnia są konieczne nie tylko do zwiększania pojemności buforowej w świetle kanalików i cystern ER, lecz przede wszystkim do pełnienia przez nie specyficznych funkcji regulatorowych i protekcyjnych w stosunku do procesów biochemicznych zachodzących w obrębie siateczki śródplazmatycznej. Retikulum endoplazmatyczne stanowi bowiem organellem wielofunkcyjne, które poza pełnieniem roli modulatora i transduktora sygnałów wapniowych jest również miejscem biosyntezy oraz modyfikacji potranslacyjnych białek sekrecyjnych i integralnych białek błonowych (61,62).

Proces translacji odbywa się na rybosomach lub polisomach związanych na powierzchni cytoplazmatycznej błon siateczki, a nowo syntetyzowane łańcuchy polipeptydowe tzw. prekursorów białkowych (probiałek, prebiałek oraz preprobiałek) ulegają translokacji do wewnętrznej warstwy cysternowej błon ER. W celu uzyskania pełnej aktywności, natywne białka prekursorowe muszą zostać poddane posttranslacyjnym procesom modulującym ich właściwości strukturalno-funkcjonalne. Centralnym ogniwem skupiającym wielofunkcyjne układy enzymatyczne i inne kompleksy białkowe spełniające rolę regulatorową w stosunku do nowo syntetyzowanych białek są właśnie białka wiążące wapń (CaBPs) w ER (73,74). Związanie kationów wapnia przez domeny asocjacyjne białek CaBPs jest warunkiem koniecznym do zmiany ich konfiguracji przestrzennej i uzyskania pełnej aktywności jako kofaktora dla szeregu białek enzymatycznych. Te ostatnie są odpowiedzialne albo za przyłączanie reszt cukrowcowych do specyficznych sekwencji aminokwasowych (glikozylację) wielu białek, albo za proteolityczne dojrzewanie/przetwarzanie białek oraz kształtowanie ich odpowiedniej struktury przestrzennej poprzez izomeryzację ściśle określonych motywów konformacyjnych lub tworzenie mostków dwusiarczkowych między łańcuchami polipeptydowymi białek oligomerycznych (75). Ponadto, białka CaBPs należą do grupy tzw. białek protekcyjnych lub „opiekuńczych” (z ang. chaperonów lub chaperonin), spełniających funkcje ochronne w stosunku do pro-

duktów translacji w warunkach stresogennych (apoptogennych). Warunki te mogą być zainicjowane np. przez gwałtowne zaburzenie homeostazy wapniowej wewnątrz siateczki śródplazmatycznej w wyniku hiperkalcemii, bądź przez akumulację białek o nieprawidłowo ukształtowanej konformacji lub białek poddanych błędnym modyfikacjom posttranslacyjnym (76,77). Właściwości prewencyjne białek CaBPs wobec niekorzystnych skutków oddziaływania czynników stresotwórczych w cysternach i kanalikach ER mają istotne znaczenie dla stabilizacji konformacji białek w fazach tzw. przestrzennego fałdowania ich łańcuchów polipeptydowych oraz dla proteolitycznego dojrzewania białek prekursorowych albo glikozylacyjnej modyfikacji lub łączenia podjednostek białkowych poprzez oligomeryzację form monomerycznych białka prekursorowego. Na szczególną uwagę zasługuje również udział białek chelatujących jony Ca^{2+} w indukowaniu degradacji białek strukturalnych i enzymatycznych o nieprawidłowo ukształtowanej konfiguracji przestrzennej (78,79).

Wśród białek CaBPs ważną rolę w wymienionych procesach odgrywają m.in. 1) kalretikulina; 2) białko o masie cząsteczkowej 78 kDa, którego aktywność regulowana jest przez glukozę (GRP78, ang. *78 kDa Glucose-Regulated Protein*), określane także jako specyficzne białko retikulum endoplazmatycznego wiążące jony Ca^{2+} (BiP, ang. *Endoplasmic Reticulum Luminal Ca^{2+} Binding Protein*); 3) białko GRP o masie molekularnej 94 kDa (GRP94), oraz 4) białkowa izomeraza disulfidowa (PDI ang. *Protein Disulphide Isomerase*) (rys., 34,72,80). Cechą wspólną wszystkich tych białek jest obecność w ich hydrofobowym końcu karboksylowym tetrapeptydowych sekwencji sygnałowych, decydujących o ich lokalizacji specyficznej dla retikulum endoplazmatycznego, czyli tzw. regionów zachowawczych Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL). Segmenty KDEL, dostarczające tzw. sygnału retencji białka w siateczce śródplazmatycznej, biorą udział w zależnym od jonów Ca^{2+} wiązaniu („zakotwiczeniu”) do wewnętrznej powierzchni cysternowej (luminalnej) błon siateczki białek „opiekuńczych”, które pośredniczą w odpowiedzi na powstałe w ER czynniki stresogenne. Przypuszcza się, że sygnałowe sekwencje retencyjne są zlokalizowane w obrębie domen asocjacyjnych dla kationów wapnia (81). Taka struktura biochemiczna chaperonin determinuje ich podstawową funkcję regulatorową w zależności od ER, czasoprzestrzennej sekwestracji (odizolowania) jonów Ca^{2+} od cytozolowej puli tych kationów. Obecność regionu zachowawczego w obrębie miejsc chelatujących kationy wapniowe decyduje zatem o szybkiej aktywacji białek protekcyjnych z grupy CaBPs w warunkach niedoboru wapnia (hipokalcemii) w świetle cystern i kanalików ER, spowodowanej antyapoptotycznym działaniem białek Bcl-2 oraz Bcl-X_L (82,83).

4. Podsumowanie

Nadekspresja białek podrodziny Bcl-2 o działaniu antyapoptotycznym odgrywa istotną rolę w supresji różnych ścieżek wewnątrzkomórkowej transdukcji hiperkalcemicznego sygnału proapoptotycznego w blastomerach zarodków klonalnych.

Zarodki takie rozwijają się często ze zrekonstruowanych oocytów poddanych działaniu sztucznych czynników aktywujących, które indukują zjawisko ekscytotoksyczności kationów wapnia (12,15,84). Stymulacja syntezy białek z rodziny Bcl-2, należących do klasy supresorów (represorów) apoptozy, w cytoplazmie oraz na zewnętrznej powierzchni cystern i kanalików siateczki śródplazmatycznej szorstkiej prowadzi do wzrostu ich koncentracji i aktywności w błonach różnych kompartmentów wewnątrzkomórkowych, które obejmują retikulum endoplazmatyczne oraz mitochondria. Stanowi to ważne ogniwo mechanizmu zapobiegającego redystrybucji wolnych jonów Ca^{2+} z ER do mitochondriów (14,85,86). Nasilenie ekspresji białek będących przedstawicielami podrodziny Bcl-2 o funkcjach inhibitorowych wobec procesu apoptozy przyczynia się także do obniżenia liczby falowych wyrzutów kationów wapnia z depozytów wewnątrzkomórkowych zlokalizowanych w ER poprzez spadek gęstości oraz aktywności $InsP_3$ -zależnych kanałów uwalniania jonów Ca^{2+} . Ponadto, powoduje ono zahamowanie transportu kationów wapnia do otoczki jądrowej i nukleoplazmy jąder komórkowych za pośrednictwem pomp wapniowych typu NCA/NCMA, należących do rodziny jądrowych ATPaz zależnych od jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} o wysokim stopniu homologii z klasą ATPaz wapniowych ERCA/ERCMA, które występują w błonach siateczki śródplazmatycznej (13,29,87) (rys.). Z kolei, spowolnienie i zmniejszenie pojemnościowego napływu kationów wapnia ze środowiska pozakomórkowego (pożywki hodowlanej) do cytoplazmy blastomerów jest mechanizmem adaptacyjnym przedimplantacyjnych zarodków klonalnych do specyficznych, wewnątrzkomórkowych warunków biochemicznych i biofizycznych. Warunki te charakteryzują się, odpowiednio, długotrwałą redukcją stężenia jonów Ca^{2+} w retikulum endoplazmatycznym oraz spadkiem objętości światła kanalików i cystern ER w tzw. stanie spoczynkowym cytozolowej koncentracji kationów wapnia, jaki następuje po aktywacji zrekonstruowanych oocytów, indukującej przekazywanie proapoptotycznego sygnału wapniowego (17,88,89).

Nie ulega wątpliwości, że białka z rodziny Bcl-2, które należą do klasy antagonistów i agonistów apoptozy, odgrywają ogromną rolę w mechanizmach regulujących wewnątrzkomórkowy system przekaźnictwa sygnału wapniowego w zarodkach ssaków uzyskiwanych w wyniku klonowania somatycznego. Jednakże, dotychczasowa wiedza na temat biochemicznych, molekularnych, biofizycznych, a także genetycznych uwarunkowań interakcji anty- i proapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 z endogennymi czynnikami odpowiedzialnymi za utrzymanie lub drastyczne naruszenie dynamicznej homeostazy w gospodarce kalcemicznej blastomerów przedimplantacyjnych zarodków klonalnych jest wciąż niespójna i fragmentaryczna. Dlatego też nie bez znaczenia pozostaje pełniejsze poznanie złożonych i skomplikowanych oddziaływań pomiędzy produktami ekspresji protoonkogenów *bcl-2* i *bax* a elementami regulatorowymi wewnątrzkomórkowych szlaków transdukcji sygnału hiperkalcemicznego (tj. ekscytotoksycznego) lub hipokalcemicznego (tj. acytotoksycznego) w czasie rozwoju *in vitro* oraz *in vivo* zarodków klonalnych. To z kolei przyczynić się może do zwiększenia efektywności

klonowania somatycznego ssaków, a w dalszej perspektywie do wzrostu tkwiącego w tej technologii i tak już dość szerokiego potencjału praktycznych możliwości aplikacyjnych w biomedycynie, farmacji i rolnictwie.

Praca finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego ze środków na naukę w latach 2009-2012 jako projekt badawczy własny nr N N311 315936.

Literatura

1. Zong W. X., Li C., Hatzivassiliou G., Lindsten T., Yu Q. C., Yuan J., Thompson C. B., (2003), *J. Cell Biol.*, 162, 59-69.
2. Sanges D., Marigo V., (2006), *Apoptosis*, 11, 1629-1641.
3. Nutt L. K., Chandra J., Pataer A., Fang B., Roth J. A. Swisher S. G., O'Neil R. G., McConkey D. J., (2002), *J. Biol. Chem.*, 277, 20301-20308.
4. de Giorgi F., Lartigue L., Bauer M. K., Schubert A., Grimm S., Hanson G. T., Remington S. J., Youle R. J., Ichas F., (2002), *FASEB (The Federation of American Societies for Experimental Biology) J.*, 16, 607-609.
5. Nakano T., Watanabe H., Ozeki M., Asai M., Katoh H., Satoh H., Hayashi H., (2006), *Cardiovasc. Res.*, 69, 908-915.
6. Oakes S. A., Scorrano L., Opferman J. T., Bassik M. C., Nishino M., Pozzan T., Korsmeyer S. J., (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 105-110.
7. Goetz J. G., Nabi I. R., (2006), *Biochem. Soc. Trans.*, 34, 370-373.
8. Leite M. F., Thrower E. C., Echevarria W., Koulen P., Hirata K., Bennett A. M., Ehrlich B. E., Nathanson M. H., (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 2975-2980.
9. Zalk R., Israelson A., Garty E. S., Azoulay-Zohar H., Shoshan-Barmatz V., (2005), *Biochem. J.*, 386, 73-83.
10. Li X., Amarnath D., Kato Y., Tsunoda Y., (2006), *Cloning Stem Cells*, 8, 41-50.
11. Amarnath D., Li X., Kato Y., Tsunoda Y., (2007), *J. Reprod. Dev.*, 53, 1247-1263.
12. Kim S., Lee S. H., Kim J. H., Jeong Y. W., Hashem M. A., Koo O. J., Park S. M., Lee E. G., Hossein M. S., Kang S. K., Lee B. C., Hwang W. S., (2006), *Mol. Reprod. Dev.*, 73, 1523-1530.
13. Gupta M. K., Uhm S. J., Lee H. T., (2007), *Mol. Reprod. Dev.*, 74, 1557-1567.
14. Jang G., Jeon H. Y., Ko K. H., Park H. J., Kang S. K., Lee B. C., Hwang W. S., (2005), *Zygote*, 13, 187-195.
15. McElroy S. L., Kim J. H., Kim S., Jeong Y. W., Lee E. G., Park S. M., Hossein M. S., Koo O. J., Abul Hashem M. D., Jang G., Kang S. K., Lee B. C., Hwang W. S., (2008), *Theriogenology*, 69, 416-425.
16. Gupta M. K., Uhm S. J., Lee S. H., Lee H. T., (2008), *Mol. Reprod. Dev.*, 75, 588-597.
17. Hwang I. S., Park M. R., Moon H. J., Shim J. H., Kim D. H., Yang B. C., Ko Y. G., Yang B. S., Cheong H. T., Im G. S., (2008), *Mol. Reprod. Dev.*, 75, 464-471.
18. He H., Lam M., McCormick T. S., Distelhorst C. W., (1997), *J. Cell Biol.*, 138, 1219-1228.
19. Pinton P., Rizzuto R., (2006), *Cell Death Differ.*, 13, 1409-1418.
20. Li C., Fox C. J., Master S. R., Bindokas V. P., Chodosh L. A., Thompson C. B., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 9830-9835.
21. Basset O., Boittin F. X., Cognard C., Constantin B., Ruegg U. T., (2006), *Biochem. J.*, 395, 267-276.
22. Zhong F., Davis M. C., McColl K. S., Distelhorst C. W., (2006), *J. Cell Biol.*, 172, 127-137.
23. Szlufcik K., Bultynck G., Callewaert G., Missiaen L., Parys J. B., de Smedt H., (2006), *Cell Calcium*, 39, 325-336.
24. Chami M., Prandini A., Campanella M., Pinton P., Szabadkai G., Reed J. C., Rizzuto R., (2004), *J. Biol. Chem.*, 279, 54581-54589.
25. Grebinyk D. M., Koval' T. V., Matyshevskaia O. P., (2004), *Ukr. Biokhim. Zh.*, 76, 63-69.

26. Pinton P., Ferrari D., Rapizzi E., di Virgilio F., Pozzan T., Rizzuto R., (2002), *Biochimie*, 84, 195-201.
27. Grebinyk D. M., Griniuk I. I., Matyshevskaia O. P., (2005), *Ukr. Biokhim. Zh.*, 77, 76-81.
28. Pinton P., Ferrari D., Magalhaes P., Schulze-Osthoff K., di Virgilio F., Pozzan T., Rizzuto R., (2000), *J. Cell Biol.*, 148, 857-862.
29. Dremina E. S., Sharov V. S., Kumar K., Zaidi A., Michaelis E. K., Schoneich C., (2004), *Biochem. J.*, 383, 361-370.
30. Breckenridge D. G., Germain M., Mathai J. P., Nguyen M., Shore G. C., (2003), *Oncogene*, 22, 8608-8618.
31. Scorrano L., Oakes S. A., Opferman J. T., Cheng E. H., Sorcinelli M. D., Pozzan T., Korsmeyer S. J., (2003), *Science*, 300, 135-139.
32. Treiman M., Caspersen C., Christensen S. B., (1998), *Trends Pharmacol. Sci.*, 19, 131-135.
33. Yoshida I., Monji A., Tashiro K., Nakamura K., Inoue R., Kanba S., (2006), *Neurochem. Int.*, 48, 696-702.
34. Ying M., Sannerud R., Flatmark T., Saraste J., (2002), *Eur. J. Cell Biol.*, 81, 469-483.
35. Mahaney J. E., Albers R. W., Waggoner J. R., Kutchai H. C., Froehlich J. P., (2005), *Biochemistry*, 44, 7713-7724.
36. Yao Q., Chen L. T., Li J., Brungardt K., Squier T. C., Bigelow D. J., (2001), *Biochemistry*, 40, 6406-6413.
37. Negash S., Yao Q., Sun H., Li J., Bigelow D. J., Squier T. C., (2000), *Biochem. J.*, 351, 195-205.
38. Ferrington D. A., Yao Q., Squier T. C., Bigelow D. J., (2002), *Biochemistry*, 41, 13289-13296.
39. Arnaudeau S., Frieden M., Nakamura K., Castelbou C., Michalak M., Demaurex N., (2002), *J. Biol. Chem.*, 277, 46696-46705.
40. Shoshan-Barmatz V., Israelson A., Brdiczka D., Sheu S. S., (2006), *Curr. Pharm. Des.*, 12, 2249-2270.
41. Machaty Z., Ramsoondar J. J., Bonk A. J., Prather R. S., Bondioli K. R., (2002a), *Biol. Reprod.*, 67, 1133-1139.
42. Machaty Z., Ramsoondar J. J., Bonk A. J., Bondioli K. R., Prather R. S., (2002b), *Biol. Reprod.*, 66, 667-674.
43. Bugaj V., Alexeenko V., Zubov A., Glushankova L., Nikolaev A., Wang Z., Kaznacheyeva E., Bezprozvanny I., Mozhayeva G. N., (2005), *J. Biol. Chem.*, 280, 16790-16797.
44. Putney J. W. Jr., Thomas A. P., (2006), *Curr. Biol.*, 16, R812-R815.
45. Hajnoczky G., Csordas G., Das S., Garcia-Perez C., Saotome M., Sinha Roy S., Yi M., (2006), *Cell Calcium*, 40, 553-560.
46. Csordas G., Hajnoczky G., (2001), *Cell Calcium*, 29, 249-262.
47. Malli R., Frieden M., Osibow K., Zoratti C., Mayer M., Demaurex N., Graier W. F., (2003), *J. Biol. Chem.*, 278, 44769-44779.
48. Manser R. C., Houghton F. D., (2006), *J. Cell Sci.*, 119, 2048-2055.
49. Hasenjager A., Gillissen B., Muller A., Normand G., Hemmati P. G., Schuler M., Dorken B., Daniel P. T., (2004), *Oncogene*, 23, 4523-4535.
50. Zheng Y., Shi Y., Tian C., Jiang C., Jin H., Chen J., Almasan A., Tang H., Chen Q., (2004), *Oncogene*, 23, 1239-1247.
51. Sanges D., Comitato A., Tammaro R., Marigo V., (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 17366-17371.
52. Dahlem Y. A., Wolf G., Siemen D., Horn T. F., (2006), *Cell Calcium*, 39, 387-400.
53. Malli R., Frieden M., Trenker M., Graier W. F., (2005), *J. Biol. Chem.*, 280, 12114-12122.
54. Kessel D., Castelli M., Reiners J. J., (2005), *Cell Death Differ.*, 12, 502-511.
55. An J., Chen Y., Huang Z., (2004), *J. Biol. Chem.*, 279, 19133-19140.
56. Lee W. K., Bork U., Gholamrezaei F., Thevenod F., (2005), *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 288, F27-F39.
57. Mattson M. P., LaFerla F. M., Chan S. L., Leissring M. A., Shepel P. N., Geiger, J. D., (2000), *Trends Neurosci.*, 23, 222-229.
58. Wang N. S., Unkila M. T., Reineks E. Z., Distelhorst C. W., (2001), *J. Biol. Chem.*, 276, 44117-44128.
59. Barrero M. J., Montero M., Alvarez J., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 27694-27699.

60. Hofer A., Fasolato C., Pozzan T., (1998), *J. Cell Biol.*, 140, 325-334.
61. Berridge M. J., (2002), *Cell Calcium*, 32, 235-249.
62. Sitia R., Braakman I., (2003), *Nature*, 426, 891-894.
63. Yu Z., Luo H., Fu W., Mattson, M. P., (1999), *Exp. Neurol.*, 155, 302-314.
64. Montero M., Brini M., Marsault R., Alvarez J., Sitia R., Pozzan T., Rizzuto R., (1995), *EMBO (The European Molecular Biology Organization) J.*, 14, 5467-5475.
65. Minn A. J., Velez P., Schendel S. L., Liang H., Muchmore S. W., Fesik S. W., Fill M., Thompson C. B., (1997), *Nature*, 385, 353-357.
66. Schendel S. L., Montal M., Reed J. C., (1998), *Cell Growth Differ.*, 5, 372-380.
67. Oakes S. A., Opferman J. T., Pozzan T., Korsmeyer S. J., Scorrano L., (2003), *Biochem. Pharmacol.*, 66, 1335-1340.
68. Mathai J. P., Germain M., Shore G. C., (2005), *J. Biol. Chem.*, 280, 23829-23836.
69. Brostrom M. A., Brostrom C. O., (2003), *Cell Calcium*, 34, 345-363.
70. Garcia-Saez A. J., Mingarro I., Perez-Paya E., Salgado J., (2004), *Biochemistry*, 43, 10930-10943.
71. Coppolino M. G., Dedhar S., (1998), *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 30, 553-558.
72. Michalak M., Corbett E. F., Mesaeli N., Nakamura K., Opas M., (1999), *Biochem. J.*, 344, 281-292.
73. Rao R. V., Peel A., Logvinova A., del Rio G., Hermel E., Yokota T., Goldsmith P. C., Ellerby L. M., Ellerby H. M., Bredesen, D. E., (2002), *FEBS (The Federation of European Biochemical Societies) Lett.*, 514, 122-128.
74. Arap M. A., Lahdenranta J., Mintz P. J., Hajitou A., Saris A. S., Arap W., Pasqualini R., (2004), *Cancer Cell*, 6, 275-284.
75. Sun F.-C., Wei S., Li C.-W., Chang Y.-S., Chao C.-C., Lai Y.-K., (2006), *Biochem. J.*, 396, 31-39.
76. 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., (2006), *Science*, 312, 572-576.
77. Li J., Lee B., Lee A. S., (2006), *J. Biol. Chem.*, 281, 7260-7270.
78. Luo S., Mao C., Lee B., Lee A. S., (2006), *Mol. Cell Biol.*, 26, 5688-5697.
79. Morishima N., Nakanishi K., Tsuchiya K., Shibata T., Seiwa E., (2004), *J. Biol. Chem.*, 279, 50375-50381.
80. Reddy R. K., Mao C., Baumeister P., Austin R. C., Kaufman R. J., Lee A. S., (2003), *J. Biol. Chem.*, 278, 20915-20924.
81. Xiao G., Chung T. F., Pyun H. Y., Fine R. E., Johnson R. J., (1999), *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 72, 121-128.
82. Lamb H. K., Mee C., Xu W., Liu L., Blond S., Cooper A., Charles I. G., Hawkins A. R., (2006), *J. Biol. Chem.*, 281, 8796-8805.
83. Lam M., Vimmerstedt L. J., Schlatter L. K., Hensold J. O., Distelhorst C. W., (1992), *Blood*, 79, 3285-3292.
84. Tsou M. F., Lu H. F., Chen S. C., Wu L. T., Chen Y. S., Kuo H. M., Lin S. S., Chung J. G., (2006), *Anti-cancer Res.*, 26, 1965-1971.
85. Jouaville L. S., Pinton P., Bastianutto C., Rutter G. A., Rizzuto R., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 13807-13812.
86. Robb-Gaspers L. D., Burnett P., Rutter G. A., Denton R. M., Rizzuto R., Thomas A. P., (1998), *EMBO (The European Molecular Biology Organization) J.*, 17, 4987-5000.
87. Marin M. C., Fernandez A., Bick R. J., Brisbay S., Buja L. M., Snuggs M., McConkey D. J., von Eschenbach A. C., Keating M. J., McDonnell T. J., (1996), *Oncogene*, 12, 2259-2266.
88. Dellis O., Dedos S. G., Tovey S. C., Taufiq-Ur-Rahman, Dubel S. J., Taylor C. W., (2006), *Science*, 313, 229-233.
89. Kotturi M. F., Hunt S. V., Jefferies W. A., (2006), *Trends Pharmacol. Sci.*, 27, 360-367.