

# 线粒体膜间隙蛋白在细胞凋亡中的作用

马丽焱

(中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

**摘要:** 线粒体除了作为细胞内的“能量工厂”外, 在控制细胞凋亡中起主导作用。细胞凋亡时, 线粒体膜通透性增加, 释放可溶性线粒体膜间隙蛋白质, 进一步破坏细胞结构。在这些致死性蛋白质中, 有些(cyt c、Smac/DIABLO、Omi/HtrA2等)能够激活 caspases, 另一些(endo G、AIF、Omi/HtrA2等)则以非 caspase 依赖的方式发挥作用。多种线粒体因子参与细胞凋亡, 强化了细胞器在凋亡控制中的核心作用。

**关键词:** 线粒体; 细胞凋亡; caspase; 细胞色素 c

**中图分类号:** R329.25;R345.99;R394.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)01-29-5

Kerr 等在 1972 年首次定义细胞凋亡现象时认为: 细胞凋亡过程中, 主要的改变发生在细胞核、而不是细胞器(线粒体、内质网、溶酶体等); 但是近年来, 随着无细胞研究体系的发展, 使人们对亚细胞成分在细胞凋亡中的作用有了深入的认识, 研究显示几乎所有的细胞内结构均参与了这一过程<sup>[1]</sup>。线粒体是真核细胞中重要的细胞器, 它通过氧化磷酸化作用进行能量转换, 为细胞进行各种生命活动提供能量, 被称为细胞内的“能量工厂”。对于线粒体在细胞凋亡过程中关键作用的突破性认识源自细胞色素 c (cytochrome c, cyt c)作用的新发现。cyt c 是线粒体氧化磷酸化通路中的一个电子载体。1996 年王晓东等惊奇地发现: 在无细胞体系中, caspase-3 的活化需要存在于线粒体的成熟的 cyt c、而不是内质网核糖体合成的 cyt c 前体的参与, 表明线粒体参与了细胞凋亡过程。这一最初受到质疑的发现很快被越来越多的研究结果证实——线粒体释放的 cyt c 触发了最终的细胞凋亡; 与此过程相关的分子机制也随之进一步明确<sup>[2]</sup>。

细胞内存在二条选择性诱导凋亡的通路, 即由细胞表面死亡受体介导的“外源性通路”和由线粒体介导的“内源性通路”。在细胞凋亡早期, 线粒体就特别地受到影响, 它们在细胞死亡过程中起着关键的调节作用。不同的促凋亡信号传导通路和损伤通路汇集于线粒体, 诱导线粒体膜通透性(mitochondrial membrane permeabilization, MMP)改变<sup>[3]</sup>, 线粒体释放可溶的、具有潜在致死性的膜间隙(intermembrane space, IMS)蛋白, 后者或参与

caspase 活化、或以非 caspase 依赖的方式诱导细胞凋亡。此外, 由于线粒体呼吸链抑制和 / 或氧化磷酸化脱偶联产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)、线粒体释放的  $Ca^{2+}$  也参与了细胞凋亡。本文就线粒体膜间隙蛋白在细胞凋亡中复杂作用的现有认识作一综述。

## 1 Caspase 级联反应活化因子——cyt c

cyt c 是一种由细胞核基因编码、负责在呼吸链复合物 III(cyt c 还原酶)和 IV(cyt c 氧化酶)之间传递电子的血红素蛋白。已经证实 cyt c 一旦进入细胞浆, 在 ATP 或 dATP 的参与下, 与凋亡蛋白水解酶激活因子 1(apoptosis protease activation factor-1, Apaf-1)含多个 WD-40 重复序列的羧基末端结合, 继而促进 Apaf-1 之间相互作用, 使 Apaf-1 从闭合的单体结构聚合成一个适合于 caspase-9 前体装配的开放的七聚体平台<sup>[4]</sup>。Apaf-1 氨基末端的 caspase 募集域(caspase recruitment domain, CARD)为 caspase-9 前体的结合位点, 通常情况下并不暴露, 多聚体化使 Apaf-1 的 CARD 域暴露, 吸引具有同样 CARD 域的 caspase-9 前体形成一个大分子量的 caspase 活化复合物, 称为 apoptosome, 在 apoptosome 中活化的 caspase-9 进一步激活效应 caspases — caspase-7 和 -3, 从而启动了 caspase 级联反应。此外, caspase-3 也可以通过蛋白水解作用产生一个氨基末端缺乏 XIAP 作用模体、因而不被 XIAP 抑制的 p10 caspase-

9 片段, 增强 caspase-9 的作用。基因敲除实验的结果进一步证实 *cyt c* 在细胞凋亡中的重要作用: *cyt c*<sup>-/-</sup> 小鼠在妊娠中期死亡; 从这些 *cyt c* 基因缺失小鼠 E8-E9 胚胎中分离的细胞对于多种凋亡信号如紫外线(UV)照射、血清饥饿或 staurosporine 诱导的凋亡具有抗性, 其 Apaf-1 始终以单体形式出现, caspase-3 活性明显降低<sup>[5]</sup>。

线粒体 IMS 和基质中的热休克蛋白 (heat shock protein, Hsp) 10 和 Hsp60 也可以促使 *cyt c* 启动 caspase-3 级联反应<sup>[6]</sup>。相反, Hsp27、Hsp70 和 Hsp90 则分别作用于 apoptosome 的不同组成成分——即 Hsp27 与 *cyt c* 结合、Hsp70 和 Hsp90 与 Apaf-1 结合, 抑制 apoptosome 的形成和 caspases 的活化<sup>[7]</sup>。

*cyt c* 在氧化磷酸化和 apoptosome 形成中的双重作用是脱偶联的。含 Zn<sup>2+</sup>(替代 Fe<sup>2+</sup>)的 *cyt c* 衍生物丧失电子载体功能, 但仍能诱导细胞凋亡<sup>[8]</sup>; 相反, 酵母 *cyt c* 可以在哺乳动物线粒体呼吸链中发挥作用, 但缺乏致细胞凋亡活性。

线粒体在释放 *cyt c* 的同时也损害其自身功能, 主要表现为线粒体跨膜电势( $\Delta\psi_m$ )耗散、ATP 耗竭和自由基产生<sup>[9,10]</sup>, 进一步加重了细胞损伤。

## 2 凋亡抑制蛋白拮抗因子——Smac/DIABLO

细胞凋亡蛋白抑制因子(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)可以有效地结合并且抑制 caspases; 同时, 它们可能还具有泛蛋白连接酶样功能, 促使与其结合的 caspases 降解。大多数哺乳类动物的 IAPs 中含有 1-3 个作用不同的功能单位, 即所谓的杆状病毒 IAP 重复序列(baculoviral IAP repeat, BIR)——一种从酵母到人类遗传学上保守的、大约由 70 个氨基酸组成的模体。例如: XIAP 可与 caspase-3 和 -9 相互作用, 有效地阻断 caspases 的活化, XIAP 的 BIR3 域可有效地抑制已加工过的 caspase-9 的活性, BIR2 域则选择性地作用于活化的 caspase-3。正在凋亡的细胞中, caspases 可从 IAPs 的阻断中游离出来, 这个过程可能由所谓的 Smac/DIABLO 引起。Smac/DIABLO 通过其氨基端的线粒体定位序列(mitochondrial localization sequence, MLS)定位于线粒体, 并且被进一步加工成 23 kDa 的成熟蛋白质。成熟 Smac 氨基端的 Ala-Val-Pro-Ile(AVPI)四肽序列可以与 IAPs 的 BIR 域结合。体外实验发现: Smac/DIABLO 与 XIAP 的 BIR2 域和 BIR3 域之间存在相互作用, 氨基端突变的 Smac/DIABLO 可取消这种作

用; 相反, 与此氨基端结构相对应的多肽足以易化 caspase 在细胞提取物中的活化。细胞内过度表达成熟的 Smac 并不直接诱导细胞凋亡, 但可以增加细胞对于各种凋亡刺激的敏感性<sup>[11,12]</sup>, 并且抑制细胞增生<sup>[11]</sup>。各种细胞凋亡刺激使 Smac/DIABLO 从线粒体中释放进入细胞浆, 与几种 IAPs 如 XIAP、c-IAP1 和 c-IAP2、杆状病毒 Op-IAP 以及 survivin 等相互作用, 通过替代已与活性 caspases 结合的 IAPs 或防止 IAPs 与活性 caspases 的结合, 阻断它们的 caspase 抑制功能, 从而促进细胞凋亡。

此外, Smac/DIABLO 还可以通过另一种不依赖于其 IAP 结合域的方式促进细胞凋亡<sup>[13]</sup>。细胞内过度表达缺失 IAPs 结合域的截断的 Smac/DIABLO 突变体或 Smac  $\beta$ ——一种缺乏 MLS 和与 IAPs 结合能力的 Smac/DIABLO 剪切变体, 增加细胞对 etoposide、TRAIL、TNF 等凋亡刺激的反应性。目前尚不清楚 Smac/DIABLO 这种非 IAP 依赖的促凋亡活性的机制。

缺乏 Smac/DIABLO 的小鼠完全能够存活, 并且不显示任何异常; 从 Smac/DIABLO<sup>-/-</sup> 小鼠的不同组织中分离细胞进行原代培养, 结果发现这些不同类型的细胞对多种凋亡刺激反应正常, 提示 Smac/DIABLO 缺失时, 存在着大量的代偿机制; 或者在发育过程的细胞凋亡中, Smac/DIABLO 不是不可或缺的。

## 3 丝氨酸蛋白酶——Omi/HtrA2

与 Smac/DIABLO 有类似功能特点的另一种线粒体因子是 Omi/HtrA2。Omi/HtrA2 属于丝氨酸蛋白水解酶家族, 从细菌到人类遗传学上保守。Omi/HtrA2 前体是一个 50kDa 大小的蛋白质, 其氨基端 MLS 在进入线粒体后被水解去除, 产生成熟的氨基端结构类似于 Smac 的 36kDa 的蛋白质。抗 Fas 抗体、TRAIL、staurosporin 和 UV 照射等凋亡刺激诱导细胞凋亡时, 这种蛋白酶从线粒体 IMS 中释放出来, 成熟 Omi/HtrA2 游离的氨基端暴露“保守的”、与 IAP 相互作用所必需的 Ala-Val-Pro-Ser (AVPS)四肽序列, 以与 Smac/DIABLO 相似的方式和细胞浆中 IAPs 相互作用, 从而易化 caspase 的活化。此外, IAPs 还是 Smac/DIABLO 的底物。在体外, Smac/DIABLO 可直接降解 IAPs 如 cIAP1、cIAP2、XIAP 等<sup>[14,15]</sup>。增高细胞内 Omi/HtrA2 含量, 可以增加 XIAP 的降解, 促进细胞凋亡; 相反, 用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)降低细胞内 Omi/HtrA2 表达时, 细胞对凋亡刺激的抗性增加<sup>[14]</sup>。因

此, Omi/HtrA2 一方面可以依赖于它的 IAP 结合域, 拮抗活性 caspases 与 IAPs 的结合; 另一方面, 通过它的蛋白酶活性, 裂解结合的 IAPs, 使 IAPs 成为蛋白酶体途径进一步降解的靶点。

与 Smac/DIABLO 不同的是, Omi/HtrA2 不作用于 survivin<sup>[16]</sup>。此外, 尽管 Smac/DIABLO 和 Omi/HtrA2 进入胞浆后似乎都作用于 XIAP, 它们的分布是相当不同的。Northern blot 结果显示, Smac/DIABLO 在心脏、肝、肾和睾丸中含量极其丰富, 而在骨骼肌、肺、胸腺和脑中并没有表达<sup>[17]</sup>; Omi/HtrA2 则与 XIAP 类似, 在组织器官中被普遍表达<sup>[18]</sup>。活化的 Smac/DIABLO 和 Omi/HtrA2 分别以二聚体和三聚体的形式存在。Omi/HtrA2 可以与 XIAP 的 BIR2 域和 BIR3 域相互作用, 与 BIR2 域的亲和性更高, 而 Smac/DIABLO 与 BIR3 域的亲和性更高<sup>[16]</sup>, 这种亲和性的差异提示 Omi/HtrA2 易于释放和活化与 BIR2 结合的 caspase-3, Smac/DIABLO 则主要作用于 caspase-9。Omi/HtrA2 还可以诱导不依赖于 caspase 活性或不依赖于其 IAP 结合域活性的细胞死亡。Omi/HtrA2 的丝氨酸蛋白水解酶催化活性在细胞凋亡过程中也发挥作用, 是细胞死亡的起始/加速因子。在 caspase 抑制剂存在的情况下或在 Apaf-1<sup>-/-</sup> 和 caspase-9<sup>-/-</sup> 细胞中, 过度表达 HtrA2 可以诱导细胞死亡。细胞浆中过度表达缺乏 MLS 的成熟的 Omi/HtrA2, 诱导一种特殊形式的细胞死亡——细胞膜保持完整、没有膜泡沫化或凋亡小体形成。同时突变 HtrA2 氨基末端及其具有丝氨酸蛋白水解酶活性的氨基酸残基, 使 IAP 结合域活性和丝氨酸蛋白酶活性缺失, 可完全消除其致死功能。总之, Omi/HtrA2 通过两种不同的机制促进细胞死亡: 其一, 抑制 IAP, 明显增加 caspase 活性; 其二, 非 caspase 依赖的丝氨酸蛋白水解酶活性。

#### 4 核酸酶激活因子——凋亡诱导因子 (apoptosis inducing factor, AIF)

哺乳动物线粒体蛋白 AIF 是一个黄素蛋白, 与细菌、植物和真菌氧化还原酶具有同源性。AIF 具有 NAD(P)H 氧化酶和单脱氢抗坏血酸还原酶的活性; 此外, 在存在 NADH 时, AIF 能催化 cyt c 的还原反应。AIF 氨基末端存在 MLS, 正常情况下 AIF 定位于线粒体, 其 MLS 在 IMS 中被裂解去除产生 57 kDa 大小的成熟 AIF。反应于凋亡刺激, 成熟 AIF 易位至细胞核, 在核中诱导染色质边缘性凝

集、DNA 的大分子量 (50kb) 片段化, 但并不产生以梯度化为特征的寡核小体 DNA 片段<sup>[19]</sup>。除其核效应外, 过度表达 AIF 或显微注射 AIF 至完整细胞胞浆, 还可以诱导细胞发生其它的凋亡样改变, 如线粒体  $\Delta \Psi_m$  耗散、磷脂酰丝氨酸外翻于浆膜表面等。近来发现了 AIF 的内源性抑制剂——sp70。Hsp70 与 AIF 相互作用, 在体外或在完整细胞中均能抑制 AIF 的致凋亡效应。

AIF 在细胞凋亡中的作用是非 caspase 依赖的。广谱 caspase 抑制剂 zVAD-fmk 不能阻断 AIF 的促凋亡活性。在 Apaf-1<sup>-/-</sup>、caspase-9<sup>-/-</sup> 或 caspase-3<sup>-/-</sup> 细胞中, 不存在 caspase 活化, AIF 仍可诱导染色质固缩。并且还发现 *Dictyostelium discoideum*, 一种缺乏 caspases 的真菌, 在死亡过程中也伴有与哺乳动物 AIF 类似同源物的线粒体-核易位现象<sup>[20]</sup>。但也有不同的报道, Arnoult 等发现 AIF 的作用是依赖于 caspase 的, 用常规的凋亡诱导因子如 staurosporine、actinomycin D 处理 HeLa 和 Jurkat 细胞株时发现, caspase 抑制剂阻断(或至少延迟)线粒体释放 AIF<sup>[21]</sup>。AIF 与 caspase 级联反应之间在不同水平存在着对话(crosstalk)。当 caspase 活化发生于细胞凋亡早期时(如 Fas 触发细胞凋亡时), AIF 的释放继发于 caspase-8 的活化<sup>[22]</sup>。然而, 在某些情况的细胞死亡过程中, 线粒体释放 AIF 早于 cyt c<sup>[23-25]</sup>; 中和 AIF(通过显微注射抗体或基因敲除)可防止线粒体释放 cyt c 以及细胞死亡<sup>[25,26]</sup>, 表明 AIF 对于 cyt c 依赖性 caspase 级联反应是必不可少的。体外实验也发现, AIF 可使分离的线粒体释放 cyt c<sup>[23]</sup>。

类似于 cyt c, AIF 除了致凋亡活性外, 还具有氧化还原酶活性, 并且二者是完全脱偶联的。无论是否存在 FAD 和/或 NAD(P)H, AIF 均能诱导核凋亡; 而完全阻断 AIF 与 DNA 相互作用、诱导染色体凝集的 AIF 突变体仍保留 NADH 氧化酶活性<sup>[27]</sup>; 此外, 缺乏电子传递辅基的重组 AIF 由于不能与黄素腺嘌呤核苷结合而丧失其还原酶活性, 但仍具有促凋亡活性<sup>[28]</sup>。

尚不清楚 AIF 促细胞凋亡活性的分子机制, AIF 本身没有内源性核酸酶活性, 推测 AIF 可能作为已知核酸酶的激活剂, 或者细胞内可能存在与 AIF 相关的未知的核凋亡通路。

AIF 基因缺失小鼠在胚胎发育的早期死亡, 尚不清楚引起这种改变的原因是由于缺乏 AIF 的促细胞凋亡活性, 抑或是由于缺乏其氧化还原酶活性所致。

AIF 同源性线粒体相关细胞死亡诱导因子(AIF-homologous mitochondrion-associated inducer of cell death, AMID)是与 AIF 同源的黄素蛋白,但与 AIF 不同的是,AMID 缺乏 MLS<sup>[29]</sup>。免疫荧光染色显示 AMID 位于线粒体和细胞浆中。在 293T 细胞中过度表达 AMID,可以诱导凋亡样细胞死亡,并且作用强度与含量呈正相关。Bcl-2、CrmA 以及广谱 caspase 抑制剂 zVAD 不能抑制 AMID 诱导的细胞死亡,提示 caspase 未介入其作用。AMID 诱导细胞凋亡的作用机制还不清楚,有待于进一步探讨。

## 5 核酸酶-核酸内切酶 G (endonuclease G, Endo G)

已报道几种 DNases 与细胞凋亡时 DNA 的降解有关,其中最具有特点的酶是由 caspase 活化的 DNase CAD/DFF40。CAD/DFF40 与其伴侣分子和抑制剂 ICAD/DFF45 形成无活性的异源性二聚体。凋亡时,ICAD 被 caspase-3 裂解、释放活性 CAD, CAD 作用于组蛋白 H1 的染色质核小体“连接”区域,产生以核小体 DNA 长度为基数的 DNA 片段。然而,缺乏 ICAD 或 ICAD-caspase-3 裂解位点的转基因小鼠具有正常的表型,并且仍然保留使 DNA 片段化的能力;此外,Samejima 等发现在 CAD<sup>-/-</sup> 鸡的 DT40 淋巴瘤细胞中,寡核小体断裂被阻断,但仍存在大分子量 DNA 片段化,提示 CAD 并非唯一参与细胞凋亡的 DNA 酶<sup>[30]</sup>。最近, Li 等分离到了另一个可以核易位的线粒体因子: Endo G<sup>[31]</sup>。Endo G 是由细胞核基因编码的线粒体核酸酶,最初被看作是与线粒体 DNA 复制有关的蛋白质,近来发现 Endo G 位于线粒体 IMS 中,因此,似乎不太可能参与线粒体 DNA 复制<sup>[32]</sup>,它在线粒体核酸代谢中的确切作用还不清楚。研究发现:在 TNF、抗 Fas 抗体和 UV 照射诱导细胞凋亡时,Endo G 从线粒体中释放出来,易位至细胞核,与核 DNA 的降解有关。在不存在 caspase 活化 DNase CAD/DFF40 的情况下,Endo G 能裂解核 DNA。与 AIF 类似,Endo G 的作用是非 caspase 依赖的, caspase 抑制剂不影响 Endo G 的活性。体外实验发现,与 CAD/DFF40 相比较,Endo G 诱导 DNA 降解时,需要更高的浓度(比 CAD/DFF40 高 100 倍),推测单凭 Endo G 的作用是不够的,还需要其他核酸酶或辅助因子的参与。核酸内切酶和 DNase I 可增强 Endo G 活性,提示这些活性物在体内可能协同作用以确保凋亡细胞中 DNA 的有效降解。Endo G 和 AIF 这两种线粒体蛋白可能在 caspase 被有限激活或 caspase 被损伤(病毒感染或 NO 和 ROS 灭活 caspase)时确保细胞核降解;或者像在植物、真菌和原生动物的所观察到的那样,与非 caspase 依赖的 DNA 降解有关。

## 6 其他线粒体蛋白质

### 6.1 Caspases

线粒体中包含大量 caspases 前体如 caspases-2, -3, -8 和 -9 前体。caspases-3 和 -9 前体在线粒体和细胞浆的相对含量与细胞类型有关。MMP 时,这些 caspases 前体从线粒体中释放进入胞浆,通过 apoptosome (caspases -3 和 -9 前体)或其他未知机制(caspases -2 和 -8 前体)产生有活性的 caspases。

### 6.2 乙酰辅酶 A 结合蛋白 (acyl-CoA-binding protein, ACBP)

分离的线粒体暴露于 tBid 时释放 ACBP。ACBP 是一个 20 kDa 的同源性二聚体,可以结合 Ca<sup>2+</sup>, 降低 Ca<sup>2+</sup> 浓度,进而活化 m-calpain。Calpains 是一组依赖于钙的巯基蛋白酶,在催化性 SH 基团附近,与木瓜蛋白酶有 33% 序列同源性。在 caspase 依赖和非 caspase 依赖的细胞死亡中均发现有 Calpain 的活化。Calpain 可以通过蛋白水解酶活性裂解、活化 Bid,提示其作用可能与激活内源性死亡通路有关。

总之,线粒体以 ATP 形式产生代谢能量,是生命的基础细胞器。同时,线粒体也是一种毒素储存器,充满具有潜在致死活性的蛋白质,这些蛋白质在 MMP 之后,迁移至细胞内不同区域,参与细胞死亡。线粒体的这种作用并非由于供能缺陷的“功能丧失”引起的,而是一个由不同的线粒体蛋白主动参与的过程。

### 参 考 文 献

- [1] FERRI KF, KROEMER GK. Organelle-specific initiation of cell death pathways[J]. *Nature Cell Biol*, 2001, 3: E255—E263.
- [2] GREEN DR, REED JC. Mitochondria and apoptosis[J]. *Science*, 1998, 281: 1309—1312.
- [3] GREEN D, KROEMER G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria[J]? *Trends Cell Biol*, 1998, 8: 267—271.
- [4] ACEHAN D, JIANG X, MORGAN DG, et al. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation[J]. *Mol Cell*, 2002, 9: 423—432.
- [5] LI K, LI Y, SHELTON JM, et al. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis[J]. *Cell*, 2000, 101: 389—399.
- [6] SAMALI A, CAI J, ZHIVOTOVSKY B, et al. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of Jurkat cells[J]. *EMBO J*, 1999, 18: 2040—2048.
- [7] PARCELLIER A, GURBUXANI S, SCHMITT E, et al. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways[J]. *Biochem Biophys Res Com*, 2003, 304: 505—512.
- [8] KLUCK RM, MARTIN SJ, HO&MAN BM, et al. Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a

- critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system[J]. *EMBO J*, 1997, **16**: 4639 — 4649.
- [9] DÜSSMANN H, KÖGEL D, REHM M, *et al.* Mitochondrial membrane permeabilization and superoxide production during apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 12645 — 12649.
- [10] DÜSSMANN H, REHM M, KÖGEL D, *et al.* Outer mitochondrial membrane permeabilization during apoptosis triggers caspase-independent mitochondrial and caspase-dependent plasma membrane potential depolarization: a single-cell analysis[J]. *J Cell Sci*, 2003, **116**: 525 — 536.
- [11] LI J, YASMEEN P, STEPHEN M K, *et al.* Role of Smac in human leukaemic cell apoptosis and proliferation[J]. *Oncogene*, 2003, **22**: 1589 — 1599.
- [12] HUNTER AM, KOTTACHCHI D, LEWIS J, *et al.* A novel ubiquitin fusion system bypasses the mitochondria and generates biologically active Smac/DIABLO[J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 7494 — 7499.
- [13] ROBERTS DL, MERRISON W, MACFARLANE M, *et al.* The inhibitor of apoptosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity[J]. *J Cell Biol*, 2001, **153**: 221 — 228.
- [14] SRINIVASULA SM, GUPTA S, DATTA P, *et al.* Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2[J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 31469 — 31472.
- [15] YANG QH, CHURCH-HAJDUK R, REN JY, *et al.* Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis[J]. *Genes & Dev*, 2003, **17**: 1487 — 1496.
- [16] VERHAGEN AM, SILKE J, EKERT PG, *et al.* HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins[J]. *J Biol Chem*, 2001, **277**: 445 — 454.
- [17] VERHAGEN AM, EKERT PG, PAKUSCH M, *et al.* Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins[J]. *Cell*, 2000, **102**: 43 — 53.
- [18] GRAY CW, WARD RV, KARRAN E, *et al.* Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response[J]. *Eur J Biochem*, 2000, **267**: 5699 — 5710.
- [19] SUSIN SA, DAUGAS E, RAVAGNAN L, *et al.* Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis[J]. *J Exp Med*, 2000, **192**: 571 — 580.
- [20] ARNOULT D, TATISCHEFF I, ESTAQUIER J, *et al.* On the evolutionary conservation of the cell death pathway: mitochondrial release of an apoptosis-inducing factor during *Dictyostelium discoideum* cell death[J]. *Mol Biol Cell*, 2001, **12**: 3016 — 3030.
- [21] ARNOULT D, PARONE P, MARTINOU JC, *et al.* Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli[J]. *J Cell Biol*, 2002, **159**: 923 — 939.
- [22] SUSIN SA, ZAMZAMI N, CASTEDO M, *et al.* The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis[J]. *J Exp Med*, 1997, **186**: 25 — 37.
- [23] SUSIN SA, LORENZO HK, ZAMZAMI N, *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor[J]. *Nature*, 1999, **397**: 441 — 446.
- [24] DAUGAS E, SUSIN SA, ZAMZAMI N, *et al.* Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis[J]. *FASEB J*, 2000, **14**: 729 — 739.
- [25] YU SW, WANG H, POITRAS MF, *et al.* Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor[J]. *Science*, 2002, **297**: 259 — 263.
- [26] JOZA N, SUSIN SA, DAUGAS E, *et al.* Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death[J]. *Nature*, 2001, **410**: 549 — 554.
- [27] YE H, CANDE C, STEPHANOU NC, *et al.* DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor[J]. *Nat Struct Biol*, 2002, **9**: 680 — 684.
- [28] Wang XC, Yang CL, Chai JJ, *et al.* Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Science*, 2002, **298**: 1587 — 1592.
- [29] WU M, XU LG, LI X, *et al.* AMID, an apoptosis-inducing factor-homologous mitochondrion-associated protein, induces caspase-independent apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 25617 — 25623.
- [30] SAMEJIMA K, TONE S, EARNSHAW WC. CAD/DFP40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 45427 — 45432.
- [31] LI LY, LUO X, WANG X. Endonuclease G is an apoptotic Dnase when released from mitochondria[J]. *Nature*, 2001, **412**: 95 — 99.
- [32] OHSATO T, ISHIHARA N, MUTA T, *et al.* Mammalian mitochondrial endonuclease G. Digestion of R-loops and localization in intermembrane space[J]. *Eur J Biochem*, 2002, **269**: 5765 — 5770.

## Role of Mitochondrial Intermembrane Proteins in Apoptosis

MA Li Yan

(Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College,  
Beijing 100094, China)

**Abstract:** Mitochondria are 'life-essential' organelles for the production of metabolic energy in the form of ATP. Paradoxically mitochondria also play an important role in the apoptotic-signaling pathway. Numerous pro-apoptotic molecules act on mitochondria and provoke the permeabilization of mitochondrial membranes. Soluble proteins contained in the mitochondrial intermembrane space are released through the outer membrane and participate in the organized destruction of the cells. Among the lethal proteins, some activate caspases (cyt c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, etc.), whereas others act in a caspase-independent fashion (endo G, AIF, Omi/HtrA2, etc.). The diversity of mitochondrial factors participating in apoptosis emphasizes the central role of these organelles in apoptosis control.

**Key words:** mitochondria; apoptosis; caspase; cytochrome c

E-mail: mly66@hotmail.com