

林家凌, 于1983年获北京大学物理学学士学位, 1986年获北京大学生物化学硕士学位, 1994年获美国田纳西大学生物化学博士学位, 1998年在美国得克萨斯农工大学Arthur E. Johnson实验室完成博士后研究。现为美国俄克拉荷马大学健康科学中心生物化学与分子生物学系终身教授、美国俄克拉荷马Stephenson肿瘤中心研究员。主要从事膜蛋白生物化学、物理学及结构生物学领域的研究, 关注细胞凋亡过程中Bcl-2家族蛋白的在线粒体膜上的构象变化、相互作用及功能, 揭示了关键凋亡调控膜蛋白复合体形成的新机制, 特别是确定了Bax寡聚物的部分结构及其在线粒体外膜上形成促凋亡蛋白孔道的分子机制, 并于2007年和David Andrews、Brian Leber一起提出了“共镶嵌模型”(embedded together model), 系统地描述了生物膜对Bcl-2家族蛋白结构及生物功能所起的不可替代的重要作用。

https://basicsciences.ouhsc.edu/bmb/Faculty/bio_details/lin-jialing-phd

Bcl-2家族蛋白的生理功能及结构基础

冯健愉¹ 朱玉山¹ 陈隼¹ 林家凌^{2*}

¹南开大学生命科学学院, 天津 300074;

²俄克拉荷马大学健康科学中心生物化学与分子生物学系, 俄克拉何马城 73126-0901)

摘要 细胞凋亡是一个重要的生物学过程, 对细胞命运及稳态的调控起着关键作用。B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)家族蛋白是凋亡途径的重要组分, 其功能异常与多种疾病相关, 包括癌症、神经退行性疾病和自身免疫疾病等。近十年涌现了大量关于Bcl-2家族蛋白生理功能及结构的报道, 加深了我们对Bcl-2家族蛋白的作用机制及其病理意义的认识, 且在过去几年中, 许多针对不同Bcl-2成员的药物已经被开发并进入临床阶段。但Bcl-2家族蛋白功能和结构的复杂性及多样性导致该研究领域仍有大量问题尚待解决。该文总结了目前关于Bcl-2蛋白家族结构和功能的知识, 还讨论了Bcl-2蛋白作为有效分子治疗靶点的药理学意义。

关键词 Bcl-2; 促凋亡蛋白; 抗凋亡蛋白

Physiological Function and Structural Basis of Bcl-2 Family Proteins

Feng Jianyu¹, Zhu Yushan¹, Chen Quan¹, Lin Jialing^{2*}

¹College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300074, China;

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma 73126, USA)

Abstract Apoptosis is an important biological process that plays a key role in the regulation of cell fate

美国国立卫生研究院课题(批准号: R01GM062964)、俄克拉荷马州科学技术促进中心课题(批准号: HR16-026)、美国国立卫生研究院课题国家普通医学科学研究所的机构发展奖(批准号: P20GM103640)资助的课题

*通讯作者。Tel: +00-1-405-2712227 ext. 61216, E-mail: Jialing-Lin@ouhsc.edu

This work was supported by the United States National Institutes of Health (Grant No.R01GM062964), the Oklahoma Center for the Advancement of Science and Technology to JL (Grant No.HR16-026) and an Institutional Development Award from the National Institute of General Medical Sciences of the National Institutes of Health (Grant No.P20GM103640)

*Corresponding author. Tel: +00-1-405-271-2227 ext. 61216, E-mail: Jialing-Lin@ouhsc.edu

网络出版时间: 2019-09-12 12:39:42

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.q.20190912.1239.012.html>

and homeostasis. The B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) family proteins are important regulators of the apoptotic pathway, and their dysfunction is associated with a variety of diseases, including cancer, neurodegenerative and autoimmune diseases. In the past decade, a large number of research work on the physiological functions and atomic structures of Bcl-2 family proteins have been reported, which has deepened our understanding of the molecular mechanism and pathological significance of Bcl-2 family proteins. Recently, new drugs targeting different Bcl-2 proteins have been developed and used in clinics or tested in clinical trials. However, the complexity and diversity in functions and structures of Bcl-2 family have left many unsolved problems. This article summarizes current knowledge of the structure and function of Bcl-2 family proteins and discusses the pharmacological significance of Bcl-2 proteins as effective therapeutic targets.

Keywords Bcl-2; pro-apoptotic protein; anti-apoptotic protein

1842年,德国科学家Karl Vogt首次提出细胞凋亡的理论。到了1885年,解剖学家Walther Flemming对程序性细胞死亡过程进行了更准确的描述。而在1965年,昆士兰大学的John Kerr使用电子显微镜将组织中的细胞凋亡与创伤性细胞死亡区分开来^[1]。随后,阿伯丁大学的Alastair Currie及其研究生Andrew Wyllie与Kerr共同研究,并于1972年在《英国癌症杂志》上发表了一篇开创性的文章^[2]。在该文中,为了将发育过程中自然发生的细胞死亡同组织急性损伤引起的坏死区分开,他们采用了同校希腊语教授James Cormack的建议,把自然发生的细胞死亡过程称为“细胞凋亡”,即“Apoptosis”,以取代Kerr之前所使用的“程序性细胞坏死”。在希腊语中,“凋亡”意味着树叶从树上坠落或花瓣从花朵上脱落。

《中国细胞生物学学报》创刊于1979年。那个年代,学生从老师那里学到的“细胞死亡”是什么呢?以下引用麻密(作者之一在北京大学生物系1979级本科的同学)所记的翟中和老师的《细胞生物学》“第六章 细胞的衰老与死亡”的笔记:

细胞的衰老和生命的延长目前已成为一门专门的学问。细胞的衰老是有机体生命活动的普遍规律,机体内每时每刻都不断地有细胞在死亡,也有新的细胞不断产生,这是新陈代谢的规律……对于高等生物来说,细胞的衰老和死亡并不等于有机体的衰老和死亡,其中的关系是复杂的……机体死亡时某些细胞还是有生命力的,如HeLa细胞一直传到现在,今后还会无限地传下去……类坏死:细胞从衰老到死亡的一个特定的生命过程,对有机体起保护作用。

从那以后,细胞死亡特别是细胞凋亡的研究便进入了快行道。20世纪70~80年代, Sydney Brenner、

John Sulston和H. Robert Horvitz成功追踪了线虫(*Caenorhabditis elegans*)的整个胚胎细胞谱系,当中涉及了对细胞命运的研究。如Horvitz在2002年发表的《虫子的生与死》一文中所说,“除了成虫体内找到的在发育过程中产生的959个细胞外,还有131个在发育过程中出现的细胞在成虫体内找不到了。这些细胞的消失是因为它们经历了程序性细胞死亡。”David Vaux、Suzanne Cory和Jerry Adams在1988年的标志性研究描述了人类癌症基因*bcl-2*的抗细胞凋亡功能^[3]。Horvitz实验室的Hilary Ellis等^[4]和Chand Desai等^[5]首次发现了编码凋亡诱导蛋白的基因:*ced-3*和*ced-4*;而Michael Hengartner等^[6]发现了一种具有相反作用的基因:*ced-9*,该基因的产物与*bcl-2*相似。1993年,Horvitz实验室的Junying Yuan和Shai Shaham等^[7]发现,白细胞介素1- β 转换酶(也就是我们现在所说的半胱天冬酶“Caspase”)是CED-3酶的哺乳动物同源物,是该蛋白酶家族的第一个成员。1997年,Wang实验室的Liu等^[8]、Zou等^[9]和Li等^[10]发现了一种类似于CED-4的蛋白质,命名为Apaf-1(凋亡蛋白酶激活因子),体外生化实验表明,该因子参与线粒体凋亡途径中细胞色素C依赖的Caspase-3活化。2002年, Sydney Brenner、Horvitz和John E. Sulston由于发现了控制细胞凋亡的基因而被授予了诺贝尔医学奖。这些调控凋亡的基因虽然是在研究线虫的过程中被发现的,但是,如上所述,细胞凋亡过程从线虫到哺乳动物都很保守,因此这些基因的同源物在人体的发育、生长过程中发挥着同样重要的作用。

1 细胞凋亡途径

细胞凋亡是一种细胞程序性死亡的过程,以清

除衰老、多余或功能失调的细胞,对于多细胞生物的发育和稳态调控至关重要^[11]。如果细胞凋亡受到抑制,会引起癌症或自身免疫疾病的发生;而过度的细胞凋亡则会导致神经退行性病变,以及加重中风、心肌梗死和脑外伤后的缺血再灌注损伤^[12-15]。因此,细胞凋亡必须受到严格调控,而深入了解细胞凋亡机制对于这些疾病的治疗是很重要的。

近年来研究已经证实,细胞主要有两条调控细胞凋亡的信号通路,即受体介导的细胞凋亡途径(外源途径)和线粒体介导的细胞凋亡途径(内源途径)(图1)。在受体介导的凋亡途径中,细胞表面的死亡受体被对应的胞外死亡配体激活后,信号传至胞内产生级联放大信号。定位于膜上的死亡受体在胞外区域富含半胱氨酸,在胞质区域含有与细胞凋亡相关的结构域——死亡结构域。当配体与死亡受体在细胞膜表面结合后,会促进膜上受体的三聚化,然后通过其C-端胞质死亡结构域募集接头蛋白FADD,进一步募集蛋白降解酶原Pro-Caspase-8,诱导其自身活化切割并产生活化的蛋白降解酶Caspase-8,激活更多的Caspase家族蛋白,如Caspase-3和Caspase-9,进而切割更多的蛋白质并使细胞瓦解凋亡。

线粒体介导的细胞凋亡内源途径主要响应细胞内部产生的应激信号,如细胞核DNA损伤、线粒体去极化、内质网蛋白非折叠以及如生长激素缺乏等。该细胞凋亡途径主要依赖线粒体并受线粒体蛋白(主要是Bcl-2家族蛋白)的调节^[16-19]。当

Bcl-2家族的两种促凋亡蛋白Bax和Bak使线粒体外膜通透化时,线粒体膜间隙蛋白如细胞色素C、SMAC和Omi等释放到细胞质中^[20-21],细胞色素C促进Apaf-1的寡聚化,并由Apaf-1寡聚体募集并活化Caspase-9^[22],SMAC和Omi则使Caspase从一直蛋白脱离^[23],导致下游的Caspase-3以及核酸酶等被活化,随之维持细胞生存的蛋白质和核酸被降解,细胞凋亡发生。

细胞凋亡的外源途径和内源途径并不是孤立存在的,它们之间存在着交叉联系(cross-talk)。细胞膜上的死亡受体与配体结合后引起Caspase-8的激活,活化的Caspase-8能切割Bcl-2家族中的一种促凋亡蛋白Bid,切割后产生的截断片段(tBid)可以转移到线粒体外膜,与线粒体外膜结合并激活线粒体外膜上的Bax和Bak,引起线粒体外膜通透化,导致细胞色素C等促凋亡物质释放,引发典型的细胞凋亡反应^[24-25]。事实上,活化的Caspase-8可以切割并活化下游诸多Caspase家族蛋白以介导细胞凋亡过程,所以这个交叉点的参与对于细胞凋亡过程不是必需的。然而由于在某些细胞(特别是II型细胞)中,Caspase酶活通常情况下处于被抑制状态,如被IAP家族蛋白集合抑制。因此,需要从线粒体释放的另一个蛋白SMAC,先结合并中和IAP蛋白,才能使Caspase酶得以活化^[23]。

Bcl-2家族蛋白在调控线粒体功能和细胞色素C等的释放中起重要作用^[16-19]。Bcl-2家族蛋白主要有三大类:抑凋亡蛋白亚家族,主要包括Bcl-2、Bcl-

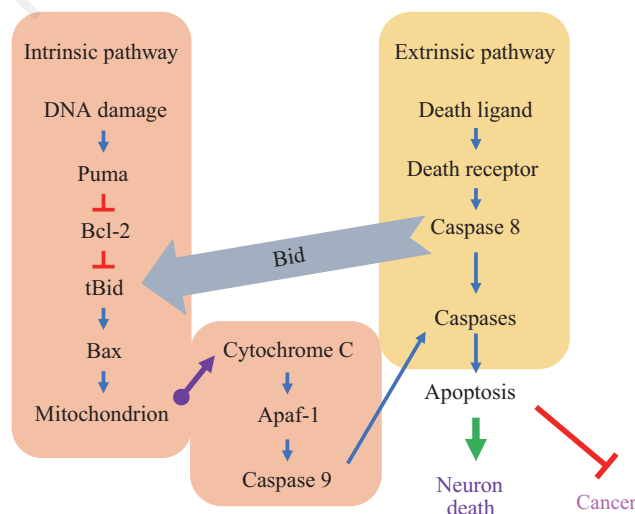


图1 调控细胞凋亡的主要信号通路

Fig.1 Main signaling pathway regulating apoptosis

xL、Mcl-1等,含有BH1、BH2、BH3、BH4四个功能域;促凋亡蛋白亚家族,也含有BH1、BH2、BH3、BH4四个功能域,包括Bax、Bak和Bok等;另一类促凋亡蛋白只含有BH3结构域,即BH3-only亚家族,主要包括Bid、Bim、Bad、Noxa和Puma等。

2 成孔蛋白: 线粒体Bax和Bak和内质网Bok

在健康细胞里,促凋亡蛋白Bax和Bak处于非激活状态。Bax是一种可溶性的蛋白分子,主要位于细胞质中,但当凋亡发生时,它会从胞质转移到线粒体并与线粒体膜相结合^[26]。Bax的NMR结构表明,该蛋白含有9个 α 螺旋,其中 $\alpha 2-5$ 和 $\alpha 8$,特别是保守的BH1、2和3结构域,形成一个疏水性袋状结构(图2, Canonical BH3-binding groove),而其C-端疏水性区域形成的 $\alpha 9$ 位于此疏水袋中^[27],这个疏水袋也可与其他Bcl-2家族蛋白中的BH3结构域结合^[18,28-29]。当细胞受到凋亡刺激时,Bax发生构象变化,其C-端的 $\alpha 9$ 被释放,暴露了疏水袋状结构,有利于其与其他Bcl-2分子之间通过BH3结构域而相互作用^[30]。这个结构表明,Bax非激活状态是由自身抑制机制导致的,当其他BH3-only蛋白质结合到疏水袋后, $\alpha 9$ 被暴露,并且可以作为跨膜序列插入线粒体外膜,从而启动Bax孔道的形成。然而,通过对处于溶液中和细胞内的Bax状态的生物物理研究发现,细胞质和膜外周的Bax蛋白存在其他构象,其中一些Bax蛋白的跨膜序列脱离疏水袋,从而使得Bax能够与BH3蛋白和膜相互作用^[31-32]。此外,最新的晶体结构表明,Bax可以形成同源二聚体,而同源二聚体之间的 $\alpha 9$ 跨膜序列和另一个BH3结合位点(不同于典型的BH3结合疏水袋)相互遮挡,从而造成(甚至增强)其自抑制状态^[33]。已经报道的研究表明,MEF细胞中能够检测到该二聚体的存在和其对Bax活性的调控。然而,这些结果需要更多的体外和体内系统研究来证实这种Bax调节机制的普遍性。

与Bax不同,Bak则通过其C-端部分疏水性区域整合在线粒体外膜上,其朝向胞质的胞质结构域中含有典型的BH3疏水袋,BH3蛋白可与之结合进而使之激活^[34-35]。为了使Bak处于非活性状态并抑制其与BH3-only蛋白结合,Bcl-2家族的抗凋亡蛋白如Bcl-xL或A1经由它们自身的疏水袋与Bak的BH3结构域结合^[36-37],从而遮挡Bak疏水口袋达到

抑制其活性的效果;抗凋亡蛋白也可与BH3-only蛋白结合使之不能激活Bak^[38]。这些基础研究为BH3结构域模拟药物的开发提供了一个思路。BH3结构域模拟药物的功能类似于BH3-only蛋白,可解除抗凋亡蛋白对促凋亡蛋白的抑制(故可称为去抑制剂)^[39]。在这些药物的作用下,Bak(和Bax或BH3-only激活蛋白)一旦被释放,即可激活细胞(如恶性肿瘤细胞或引起自身免疫的T细胞和B细胞)中本身处于静息状态的凋亡程序。目前已研发的BH3模拟物能诱导癌细胞通过凋亡而死亡^[40-41]。然而,这些化学合成的BH3模拟物的作用机制还没有完全确定。而一些BH3结构域模拟物能有效抑制抗凋亡蛋白与tBid形成复合体,但不能有效抑制它们与Bim形成复合体,其原因可能在于Bim有另一个结构域可以与Bcl-xL等抗凋亡蛋白结合^[42],但Bim与Bcl-xL之间的双栓锁结构尚不清楚,尤其是Bim的非BH3结构域与Bcl-xL结合的方式和位置尚未清楚。其他BH3蛋白和抑凋亡蛋白复合物的结合方式也尚未完全阐明,因为目前所有蛋白复合物的全长结构还没有一个是确定的,且有生物学意义的抑制功能通常发生在膜上^[43]。此外,在线粒体外膜中,抗凋亡蛋白直接与Bak或Bax结合,然而,这些具有多个BH结构域的膜蛋白复合物结构完全未知。体外研究表明,它们的结合界面超出了BH3疏水口袋界面^[44-45],使得BH3模拟化学物质在破坏它们的复合物方面效果较差^[46]。而实际情况更为复杂的是,由Bcl-2家族蛋白调控Bak活性并不是唯一的分子机制。例如,晶体结构研究揭示了一个由锌离子连接的Bak同源二聚体,这被认为是Bak的一种非活性形态^[47]。而由二硫键连接的Bak同源二聚体的结构提示了其他调控机制存在的可能^[48]。

与研究了几十年的Bax和Bak相比,Bok是近几年才被深入研究的,尽管它在1997年已经被发现为卵巢促凋亡Bcl-2蛋白^[49]。Bok折叠成类似于Bax和Bak的结构,但它在体外的成孔能力较差^[50]。在正常细胞中,它主要定位于内质网上。Bok结构不如Bax和Bak稳定,并且其细胞水平始终受内质网相关降解(ERAD)途径调节^[51-52]。当被内质网应激引起的其他非折叠蛋白质使ERAD不堪重负时,多余的Bok蛋白会转移到线粒体上,从而将内质网应激传递给线粒体,这可以说是一种替代或额外的死亡信号传导机制^[53-55]。当Bok处于线粒体时,它可能与其他Bcl-2家

族蛋白相互作用。然而, 这些相互作用是否真的存在, 以及它们是怎么发生并参与凋亡调控的, 目前尚未清楚^[56]。此外, Bok可能在线粒体或其他细胞器上起着其他作用^[57-60]。

3 激活剂: BH3-only蛋白

某些BH3-only蛋白在凋亡细胞中被诱导并活化, 而在正常细胞中转录受抑制呈低表达状态, 或在翻译后被修饰(如磷酸化等)抑制呈非活性状态。例如, 胞内Bid蛋白一般折叠存在于细胞质中, 其活性被自我抑制, 在凋亡发生时被活化的Caspase-8或其他蛋白酶切割后产生活性^[61]。同样, Bim在正常细胞中也处于非活化状态, 但其活性受另外一些机制的调节, 比如其一, Bim的两种主要亚型BimEL和BimL共享一个肌动蛋白轻链结合片段, 可被隔离在细胞骨架上^[62]。最近发现肌动蛋白轻链能促进Bim同源二聚化^[63]。尽管肌动蛋白轻链-Bim同源二聚体结构未得到解析, 但研究表明, 肌动蛋白轻链-Bim复合物诱导Mcl-1至线粒体, 稳定这种抗凋亡蛋白, 从而提高细胞的凋亡阈值^[62-63]。其二, 磷酸化能激活或抑制Bim^[64-65]。其三, 另一种Bim亚型BimS缺乏肌动蛋白轻链结合片段, 这可能是它在细胞中能保持结构性凋亡活性的原因^[62]。因此, 相比存在于大多数细胞类型中的BimL和BimEL^[66], 受转录调控的BimS很少出现在正常细胞中。同样地, Noxa和Puma在健康细胞中也不太表达, 在DNA损伤后由p53诱导转录表达^[67]。Bad被磷酸化抑制, 并与伴侣蛋白14-3-3结合^[68]。其他BH3蛋白如Hrk、Bik和Bmf, 其功能活性是如何被调控的尚不清楚。

4 共镶嵌(embedded together)模型更新

在共镶嵌模型之前, 大多数模型在很大程度上忽略了膜在Bcl-2家族蛋白功能调节中发挥的作用。例如, BH3-only蛋白之所以被如此命名, 是因为这些蛋白有且仅有的BH3结构域被认为是唯一重要的可用来结合其他Bcl-2家族蛋白的结构域。无论是抗凋亡还是促凋亡的多BH结构域蛋白, BH3-only蛋白都可以结合并抑制或激活它们的功能。但他们忽略的一个事实是, 大多数Bcl-2家族蛋白含有一个疏水区结构域, 并且该结构域足够长, 可跨越脂质双分子层; 或半疏水半亲水, 足以在外周结合脂质双层表面, 其非极性氨基酸侧链嵌入非极性脂质酰基链之

间, 极性或带电荷的氨基酸侧链则与极性或带电荷的脂质头部基团结合。共镶嵌模型考虑了这一点, 并推断BH3-only蛋白和多BH结构域蛋白之间的功能性相互作用发生在膜上^[16]。

tBid是由细胞表面死亡受体激活下游的Caspase-8切割Bid所产生的截短型Bid蛋白, 它随后与多BH结构域的促凋亡蛋白Bax结合, 诱导其转位到线粒体上形成复合体及孔洞。直观地说, 这个模型符合热力学原理, 因为tBid是在大多数Bax存在的活细胞的细胞质中产生的。然而, 有实验证据推翻了这一模型。因为在细胞质中由Caspase-8切割产生的tBid仍然与被切下的另一片段相互作用, 使得该非共价连接的复合物保持在共价连接的“前蛋白”的非活性构象中, 其能与Bax结合的BH3结构域螺旋的疏水侧面朝向蛋白质核心, 因此不能与Bax相互作用。同样地, 胞质中的Bax也处于无活性构象状态, 其能与BH3结构域结合的疏水袋被其自身的C末端 α 9螺旋覆盖, 而 α 9螺旋主要由疏水残基形成, 但也含有少数极性残基, 特别是第184位丝氨酸。总之, 这两个蛋白质不能相互作用, 且都在非活性的构象中。令人惊讶的是, cBid(被Caspase切割的Bid)很快转移到线粒体膜上, 其中tBid由于与膜的相互作用而与另一片段解离, 从而暴露其BH3结构域; 而此时Bax的C末端疏水螺旋可能由于与膜的相互作用而从疏水袋中释放出来。这两个相辅相成的构象变化使得tBid-Bax的结合成为事实(图2)^[69-70]。

与折叠良好Bid蛋白不同^[71], NMR研究表明, 有些BH3-only蛋白在它们独自存在时是无结构的^[72]。如果是这样, Bax的另一个BH3激活因子Bim蛋白也是非结构化的, 因此BH3结构域总是暴露的, 那么, Bim就能直接结合Bax。但是, 关于可溶性的Bax能否与Bim结合是有争议的。如果细胞质中的可溶性Bax蛋白与NMR解析的结构状态一致, 那么其C末端 α 9螺旋将堵塞其能与BH3结构域结合的疏水口袋, 从而阻碍了Bim的进入。近年来利用生物物理手段如NMR和EPR, 揭示了可溶性Bax的柔性构象。特别是在一些构象状态中, α 9螺旋是被甩出BH3口袋的, 因此BH3口袋将可以与Bim的BH3结构域接触。或者, Bim可以与Bax上的其他位置结合, 例如通过NMR研究揭示的一个触发口袋, 它能够结合以一个 α 螺旋构象存在的Bim的BH3多肽段, 该结合能够激活Bax(图2, Trigger pocket)^[73]。

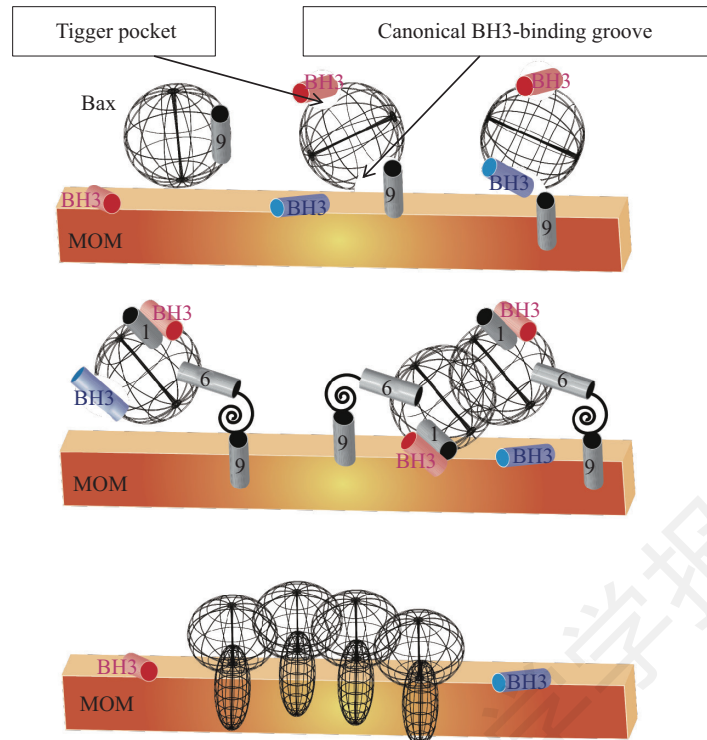


图2 线粒体外膜上Bax被BH3-only蛋白激活

Fig.2 BH3-only proteins activate of Bax at the mitochondrial outer membrane

5 Bax孔洞结构

内源性细胞凋亡是由Bax蛋白将线粒体外膜通透化(mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP)引发的。Bax在健康的细胞中是无活性的并且存在于胞质中。在应激细胞中, Bcl-2家族中的促凋亡蛋白(如tBid和Bim)被激活后, 反过来激活Bax。被激活的Bax蛋白发生构象变化并且嵌入到线粒体外膜(mitochondrial outer membrane, MOM)中。但是膜嵌合的Bax如何引起MOMP的机制尚不清楚。一种模型假设单个Bax分子可以通过在MOM上形成大到足以从线粒体膜间隙(mitochondria intermembrane space, MIS)中释放细胞色素C(CytC)的孔洞^[74-76]。另一种模型表明, 多个Bax分子寡聚化在MOM上形成更大的孔, 不仅能够释放像CytC(12 kDa)这种小的MIS蛋白, 而且也能释放像SMAC(25 kDa)这类大的MIS蛋白。实际上, 超高分辨率成像分析显示, 在凋亡细胞中的MOM上, 非常大的Bax复合物形成弧状和环状排列, 相邻或是环绕着直径为数十到数百纳米的巨大孔洞^[77-78]。然而, 这些巨大孔洞是否与比它小很多的凋亡相关MIS蛋白(如CytC的直径为3 nm)的释放相关, 一直备受争议。最近的文章显示, 这些巨大的孔洞使线粒体内膜(mitochondrial inner membrane,

MIM)透过MOM突出, 从而导致线粒体内膜通透化(mitochondrial inner membrane permeabilization, MIMP)和线粒体DNA(mtDNA)的外排^[79-80]。不过, MIMP的分子机制仍然全无定论^[81]; 并且, 来自凋亡细胞的mtDNA释放到细胞质会诱导的天然免疫信号产生, 与细胞凋亡的无免疫反应概念矛盾。

目前关于Bax寡聚体的结构及其形成机制仍然不清楚。非激活的Bax单体是9个 α 螺旋组成的球状束($\alpha 1-9$)^[27]。Bax蛋白一旦被激活, $\alpha 9$ 插入到线粒体外膜。2个尾部锚定在线粒体的Bax蛋白利用其 $\alpha 2-5$ 区域形成由一个Bax的 $\alpha 2$ (BH3结构域)结合到另一个Bax的 $\alpha 3'-\alpha 4'-\alpha 5'$ 形成的口袋(groove)中组成二聚体(图3, BH3-in-groove dimer)^[82]。这种多个二聚体单元如何组装形成较大的寡聚物仍然是未知的。我们认为可由在 $\alpha 2-5$ 区域侧面的其他螺旋结构域的相互作用来连接BH3-in-groove二聚体。例如, 我们发现2个 $\alpha 9$ 螺旋在线粒体外膜上相互作用, 将2个BH3-in-groove二聚体连接成为四聚体, 然后通过额外的 $\alpha 9 \cdot \alpha 9$ 相互作用得到更高阶的寡聚体^[83-84]。此外, $\alpha 9$ 二聚化能扩张Bax孔洞来释放更大的线粒体蛋白^[83]。对于Bak, Ruth Kluck实验室^[85]发现, 不同于由 $\alpha 2-5$ 区域形成的稳定的BH3-in-groove二聚体, $\alpha 1$ 、 $\alpha 6$ 、

$\alpha 7$ 、 $\alpha 8$ 或 $\alpha 9$ 的相互作用会产生不稳定的二聚体,从而会产生异源多聚体。这一模型暗示了每个BH3-in-groove二聚体间(例如,通过 $\alpha 1 \cdot \alpha 1$ 或者 $\alpha 9 \cdot \alpha 9$)的相互作用本身对于Bak(或Bax)寡聚化并不是必要的;然而缺乏所有的二聚体间相互作用,寡聚体和由此形成的孔洞,将不会出现^[86]。

目前已经提出了不同的模型来解释Bax寡聚化形成孔洞的机制^[87-88]。根据最合理的“蛋白脂质孔”模型, $\alpha 4$ 和 $\alpha 5$ 的非极性氨基酸残基位于由 $\alpha 2$ -5区域形成BH3-in-groove二聚体的底部表面,并且嵌入到线粒体外膜脂质双分子层中,通过不对称地扩张膜曲度,从而弯曲脂质双层并引起膜张力(图3)^[18,82-83,89-90]。多个BH3-in-groove二聚体堆积会产生更大的张力,最终破坏膜脂双层结构,并形成一个“蛋白脂质孔”,其中围绕亲水性孔洞的内壁既含有蛋白质也含有脂质^[91-92]。与内壁仅含蛋白质的“蛋白孔”模型相比,蛋白脂质孔边缘的脂质放射状排列成胶束结构,以避免疏水性酰基链暴露在水环境中(图3)。然而,在边缘处弯曲脂质产生的线性张力与孔隙半径成正相关,并且因此会不利于膜孔打开。线性张力可以被通过嵌入脂质分子间的非极性Bax氨基酸残基减弱从而能稳定胶束结构^[88,93]。Bax蛋白除了BH3-in-groove二聚体以外的区域在膜孔形成过程中的作用仍然处在猜想阶段。“蟹钳”模型提出这些区域沿着环形孔分布,或者是位于线粒体外膜的两侧或者穿透线粒体外膜^[93]。尤其是相同数量的两性 $\alpha 6$ 螺旋的疏水残基包埋在线粒体膜朝向胞质的脂质单层中,然而相同数量的疏水性 $\alpha 9$ 螺旋以相反的方向穿过脂双层(图3)。来自邻近BH3-in-groove二聚体的 $\alpha 6$ 或 $\alpha 9$ 螺旋之间的相互作用使得这些二聚体聚集在孔洞边缘来稳定孔洞,并招募新的二聚体来扩张孔洞^[94-97]。

Bax蛋白的 $\alpha 2$ -5二聚体的晶体结构含有一个由 $\alpha 4$ -5区域组成的凹陷状非极性表面^[82],这能很好地结合由磷脂双分子层形成的凸出状界面。之前的研究表明,具有正曲率的脂质[例如,油酰-溶血磷脂酰胆碱(O-LPC)、油酰-溶血磷脂酰乙醇胺(O-LPE)]会促进Bax在膜上打孔,而具有负曲率的脂质[例如,二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二油酰甘油(DOG)]则会阻碍该过程^[92,98]。因此,我们假设 $\alpha 2$ -5二聚体与线粒体外膜表面的相互作用使具有正曲率的脂类聚集,产生一个凸面来进一步增加蛋白质和膜之间的接触面积。这能将更多的非极性 $\alpha 4$ -结构域上的残基嵌入脂质双层膜的细胞质并产生更强的膜张力来诱导脂质孔打开(图3)。与晶体结构相比,根据化学交联数据提出的 $\alpha 2$ -4二聚体结构模型具有一个平坦的非极性表面^[83],可以更好地覆盖脂质双层的平坦边缘,从而形成一个更稳定的膜孔内壁。基于这两种结构,我们进一步猜测, $\alpha 2$ -5二聚体可以在两种构象之间切换来满足两种功能需求,一种具有促使孔洞形成的凹陷表面,另一种具有稳定孔洞功能的平坦表面(图3)。

Bax蛋白的 $\alpha 9$ 结构域是一种特殊的跨膜螺旋,它既包括非极性氨基酸,也含有极性氨基酸残基。我们提出的 $\alpha 9$ 二聚体结构模型拥有被接触面包埋的大部分非极性氨基酸残基,剩余的非极性和极性氨基酸残基分布在表面。我们推测, $\alpha 9$ 在不同磷脂分子结构中处于一种单体和二聚体平衡态,特别是 $\alpha 9$ 单体在平滑的磷脂双分子层膜中更加稳定,这类脂质膜能将更多的非极性氨基酸包裹于非极性环境中,从而降低该系统的能量并能补偿包埋少数极性氨基酸残基所需要的能量消耗。相对于 $\alpha 9$ 单体而言, $\alpha 9$ 二聚体在表面上具有较少的非极性氨基酸

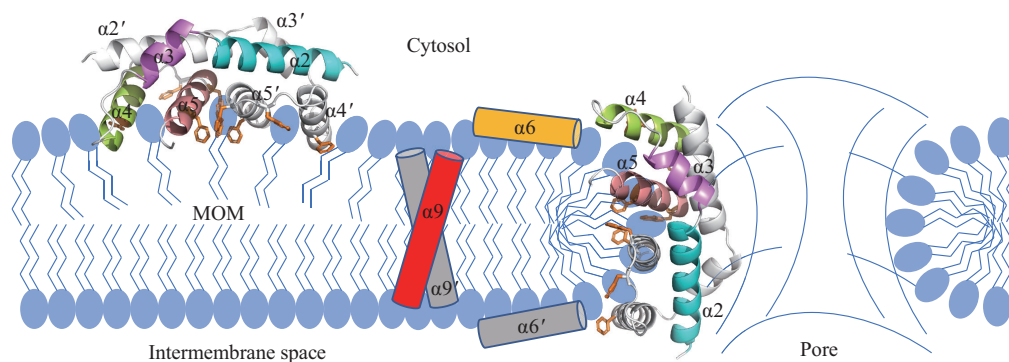


图3 Bax孔道结构模型

Fig.3 Model of Bax pore

残基, 脂质双层包埋 $\alpha 9$ 二聚体的表面时将无法产生足够稳定的能量来平衡包裹极性氨基酸残基时产生的不稳定能量。因此 $\alpha 9$ 二聚体在位于环形孔边缘的胶束磷脂结构中会更加稳定, $\alpha 9$ 二聚体所包含的部分极性氨基酸残基可以与极性或带电的脂质分子头部相互作用, 甚至能够伸展到含水通道中。如果上述推测是正确的, 那么增加膜中的胶束脂质(如圆锥状O-LPC)或层状脂质[如圆柱状二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)]将分别相应增加或减少 $\alpha 9$ 的二聚化含量。事实上, 圆锥状的脂质分子能够促进Bax孔形成^[92,98], 可能恰好是由于这类脂质沿着孔边缘形成了胶束结构, 从而增加 $\alpha 9$ 的二聚化状态。

已有报道表明, Drp1能诱导脂质体膜融合, 在该过程中形成的脂质体膜半融合态能促进Bax寡聚化和膜孔形成^[90]。具有正向曲率的倒锥形脂质分子, 例如LPC能阻止膜半融合中间态的形成, 从而抑制Bax寡聚化。这与观察到在缺乏Drp1时, LPC能促进Bax膜孔形成的实验结果相反^[92,98]。目前关于半融合状态的膜是如何促进Bax寡聚化的机制尚未清楚, 除了半融合膜具备由负曲率的锥形脂质分子(如心磷脂和油酸)所形成的高度弯曲的膜表面。

之前大多数关于Bax成孔过程的研究都是在脂质体中进行的, 脂质体的成分参考了从非洲爪蟾线粒体(外膜和内膜)鉴定出来的磷脂组合(PC:PE:PI:PS:CL的比例为47:28:9:9:7)^[91]。众所周知, 线粒膜内外膜的脂质成分不同, 例如, 线粒体具有的特征磷脂——心磷脂(cardiolipin, CL), 大部分位于线粒体内膜中。例如, 大鼠肝脏线粒体外膜PC:PE:PI:PS:CL:PA的比例为54:29:13:2:1:1, 而在其内膜中的比例则是40:34:5:3:18:0^[99]。同样已知的是内膜和外膜的磷脂组分是动态的。例如, Bax插入线粒体外膜会诱导超氧化物产生和心磷脂的氧化^[100]。这一过程反过来能够破坏心磷脂和细胞色素C的相互作用, 从而使细胞色素C从线粒体内膜脱离, 并通过线粒体外膜上的Bax孔洞释放到细胞质中^[101-102]。研究发现, 肿瘤细胞线粒体膜中的胆固醇含量增加, 胆固醇能抑制Bax向线粒体膜上募集、插入和寡聚化, 从而导致对细胞凋亡的阻遏^[103-106]。因此有必要重新评估生理学或病理学相关的磷脂组分对Bax相互作用和孔洞形成的影响。此外, 最近有研究表明, 线粒体内膜通透性增加依赖于位于线粒体外膜的Bax(或Bak)蛋白^[79-80]。然而, 除了在线粒体外

膜上形成孔洞从而允许线粒体内膜突至细胞质中外, Bax是否在线粒体内膜上也形成孔洞, 以及线粒体内膜被挤压至细胞质中的动力来源, 还不得而知^[81]。我们假设tBid和Bax能够通过Bax孔洞穿过线粒体外膜, 然后在线粒体内膜上形成小洞从而允许水分子进入到线粒体基质中。这一过程产生的渗透压使线粒体基质扩张, 从而迫使线粒体内膜膨胀并穿过在线粒体外膜上的Bax孔洞。一旦有更多的在细胞质中被tBid激活的Bax蛋白转位至线粒体内膜并参与其上孔洞形成, 就能将其扩展成一个大的孔洞, 从而释放mtDNA。

6 孔道抑制剂: Bcl-2如何抑制线粒体中的Bax激活和寡聚化

Bcl-2、Bcl-xL和其他抗凋亡蛋白能够有效抑制线粒体上的tBid/Bax或Bax/Bax复合体的形成^[46]。Bcl-xL是一种尾部锚定的拓扑结构, 其位于胞质结构域中的经典疏水口袋能与tBid或Bax的BH3结构域结合。但有些Bax分子除了有嵌入线粒体外膜的 $\alpha 9$ 尾部, 还有嵌入膜中 $\alpha 5$ - $\alpha 6$ 螺旋发夹, 从而形成多次跨膜的拓扑结构^[44]。而Bcl-2在与膜上的tBid或Bad相互作用后能从尾部锚定变为多次跨膜构象, 从而有效抑制促凋亡蛋白^[107-108]。另外, Bcl-2被tBid或Bim活化后能形成或大或小的寡聚化孔洞, 而这是Bcl-xL不具备的性质^[109-110]; 并且, Bcl-2本身也能形成二聚体^[111]。Bcl-2能利用多个区域来结合Bax以阻止其转变为寡聚体成孔状态^[45,112]。由此, 我们推测, Bcl-2可以转变不同的构象, 并通过与BH3和非BH3结构域的相互作用来有效抑制线粒体中的tBid、Bim和Bax的功能。tBid、Bim和Bax的BH3结构域结合到Bcl-2的经典疏水口袋中, 使尾部锚定的Bcl-2转变为多次跨膜构象, 该构象的膜嵌合区能够与促凋亡蛋白中的膜嵌合区结合。抗凋亡细胞因子和促凋亡细胞因子的胞质结构域也能相互作用从而进一步稳定复合物。鉴于抗细胞凋亡的Bcl-2和Bcl-xL与促凋亡蛋白所形成的复合物之间的结构差异, 其相应的BH3模拟小分子化合物可能需要不同的作用模式来阻止这些复合物的形成^[113-114]。

7 孔洞抑制剂本身能成孔吗?

Bcl-2的结构折叠类似于细菌成孔毒素。抗凋亡和促凋亡的Bcl-2蛋白都具有Bcl-2的折叠特点。

电生理学检测方法适用于所有Bcl-2家族蛋白,但在抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白之间存在明显的差异。我们通过脂质体染料泄漏实验提示存在由tBid和Bim诱导的去除C末端跨膜区序列的Bcl-2蛋白孔洞的形成。那么Bcl-xL、Mcl-1、Bcl-w和A1是否也能形成类似的膜孔洞呢?如果是,那为什么这些孔洞没有杀死细胞?或者,是否也可以将Bcl-2转变为促凋亡的BH3-only蛋白或成孔蛋白,从而改变其在线粒体的功能^[109,115]?

8 小分子去抑制剂、抑制剂和激活剂及其应用

ABT系列分子(ABT-737、263和199)是一类在结构上模拟BH3结构域的化合物,在体外能以低于1 nmol/L的亲合强度,与tBid、Bim、Bax中的BH3肽竞争性地结合在可溶性的Bcl-2和Bcl-xL的经典疏水口袋区域^[39,113-114]。在体外实验中,这些化合物能以大于10 nmol/L的浓度,对Bcl-2和Bcl-xL阻止线粒体细胞色素C的释放功能进行有效抑制。然而,在活细胞实验中须用5 μ mol/L的ABT-737和ABT-263药物才能抑制线粒体上的Bcl-xL和Bcl-2与tBid的结合,但对于其与Bim的结合并没有影响^[116-117]。可以得知,对于ABT系列化合物的效果,体外实验与细胞实验的结果仍存在显著差异。另外,当ABT-737浓度高于5 μ mol/L时,可在线粒体上抑制tBid和Bax与Bcl-xL结合,再次表明膜结合复合体不仅依靠经典的BH3疏水袋界面结合。我们认为,ABT系列化合物能够直接阻止Bcl-2家族成员间经典的BH3结构域与疏水袋的相互作用,但不能直接阻断非经典的通过其他结构域的相互作用。

David Andrews实验室^[118]发现,两个结构上有相关性的小分子化合物MSN125和MSN50能阻止Bax介导的体外界膜通透和细胞凋亡的发生。与此一致的是,我们的交联数据显示,MSN50通过 α 1、 α 6、 α 7- α 8和 α 9相互作用界面,而非BH3-in-groove和 α 2- α 3- α 4相互作用界面,来抑制Bax同源二聚化。David还发现了有效基团——DAN004,体外界膜通透实验中,它与MSN50/125都能抑制Bax的同源二聚化,但有趣的是,它在细胞实验中表现出细胞毒性作用的。不过,低剂量的MSN125可使体外培养的原代神经元细胞抵抗谷氨酸毒性。因此,为了增强对这些化合物对神经元的保护作用并降低其细胞

毒性,我们有必要分别从生物、物理、化学的角度更深入全面地研究这些化合物与生物学靶标之间的相互作用及其对细胞的影响。从长远角度出发,因为结构信息的研究能发现有效的结合位点、指导化合物设计并优化这些化合物以降低由脱靶造成的细胞毒性作用,因此,Bax与小分子化合物的复合体结构分析研究是非常有必要的^[119]。而这些化合物小分子如何阻止Bax二聚体进一步形成多聚体的分子机制,也是研究的难点。

Bax从被激活到寡聚化的状态具有逐步发生和相互依赖的特性^[29,83],对于干扰这一过程的小分子来说,存在多个可以干涉的步骤,从而限制被激活的Bax分子在线粒体外膜上大量形成寡聚化复合物。此外,小分子可能促进Bax寡聚化复合物的错误组装,形成失效复合体,从而不能诱导大的孔洞形成。为了实现其抑制作用,以限速步骤为目标是最好的,因为这能给抑制剂结合靶点提供充足的时间。此外,干预早期关键步骤要比干预后期冗余步骤可以起到更有效的抑制效果。

9 问题与展望

Bcl-2家族蛋白在细胞凋亡调控中发挥着重要作用,但是关于其结构、功能和相互作用模式目前仍有很多问题。譬如:激活的Bax/Bak能够形成孔洞,但是孔洞是如何形成的?它们形成的是蛋白质孔、脂质孔还是混合型孔?孔的大小有多大,需要多少Bax/Bak分子,它们在不同类型细胞死亡中的作用是什么?在孔洞中的Bax/Bak蛋白的膜拓扑结构是什么?线粒体脂质在孔形成和孔本身中发挥着怎样的作用?思考并解决这些问题,有助于深入了解凋亡调节机制,并为相关疾病的诊疗提供理论依据。

参考文献 (References)

- 1 Kerr JF. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol* 1965; 90(2): 419-35.
- 2 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4): 239-57.
- 3 Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988; 335(6189): 440-2.
- 4 Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986; 44(6): 817-29.
- 5 Desai C, Garriga G, McIntire SL, Horvitz HR. A genetic pathway

- for the development of the *Caenorhabditis elegans* HSN motor neurons. *Nature* 1988; 336(6200): 638-46.
- 6 Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 1992; 356(6369): 494-9.
- 7 Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993; 75(4): 641-52.
- 8 Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; 86(1): 147-57.
- 9 Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90(3): 405-13.
- 10 Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91(4): 479-89.
- 11 Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997; 88(3): 347-54.
- 12 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-74.
- 13 Fricker M, Tolkovsky AM, Borutaite V, Coleman M, Brown GC. Neuronal Cell Death. *Physiol Rev* 2018; 98(2): 813-80.
- 14 Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol* 2010; 72: 19-44.
- 15 Murphy E, Ardehali H, Balaban RS, DiLisa F, Dorn GW, 2nd, Kitsis RN, *et al.* Mitochondrial function, biology, and role in disease: A scientific statement from the American Heart Association. *Circ Res* 2016; 118(12): 1960-91.
- 16 Leber B, Lin J, Andrews DW. Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis* 2007; 12(5): 897-911.
- 17 Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 2010; 37(3): 299-310.
- 18 Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(1): 49-63.
- 19 Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(1): 47-59.
- 20 Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102(1): 33-42.
- 21 Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, *et al.* Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 2002; 277(1): 432-8.
- 22 Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 2002; 9(2): 423-32.
- 23 Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X, *et al.* Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 2000; 408(6815): 1008-12.
- 24 Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; 94(4): 481-90.
- 25 Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94(4): 491-501.
- 26 Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997; 139(5): 1281-92.
- 27 Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 2000; 103(4): 645-54.
- 28 Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, *et al.* BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 2005; 17(4): 525-35.
- 29 Kim H, Tu HC, Ren D, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, *et al.* Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 2009; 36(3): 487-99.
- 30 Nechushtan A, Smith CL, Hsu YT, Youle RJ. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J* 1999; 18(9): 2330-41.
- 31 Gahl RF, He Y, Yu S, Tjandra N. Conformational rearrangements in the pro-apoptotic protein, Bax, as it inserts into mitochondria: a cellular death switch. *J Biol Chem* 2014; 289(47): 32871-82.
- 32 Tsai CJ, Liu S, Hung CL, Jhong SR, Sung TC, Chiang YW. BAX-induced apoptosis can be initiated through a conformational selection mechanism. *Structure* 2015; 23(1): 139-48.
- 33 Garner TP, Reyna DE, Priyadarshi A, Chen HC, Li S, Wu Y, *et al.* An autoinhibited dimeric form of BAX regulates the BAX activation pathway. *Mol Cell* 2016; 64(2): 431.
- 34 Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, *et al.* tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 2000; 14(16): 2060-71.
- 35 Moldoveanu T, Grace CR, Llambi F, Nourse A, Fitzgerald P, Gehring K, *et al.* BID-induced structural changes in BAK promote apoptosis. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20(5): 589-97.
- 36 Sattler M, Liang H, Nettlesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, *et al.* Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 1997; 275(5302): 983-6.
- 37 Smits C, Czabotar PE, Hinds MG, Day CL. Structural plasticity underpins promiscuous binding of the prosurvival protein A1. *Structure* 2008; 16(5): 818-29.
- 38 Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, *et al.* Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 2005; 17(3): 393-403.
- 39 Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, *et al.* An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005; 435(7042): 677-81.

- 40 Delbridge AR, Strasser A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ* 2015; 22(7): 1071-80.
- 41 Merino D, Kelly GL, Lessene G, Wei AH, Roberts AW, Strasser A. Bh3-mimetic drugs: blazing the trail for new cancer medicines. *Cancer Cell* 2018; 34(6): 879-91.
- 42 Liu Q, Osterlund EJ, Chi X, Pogmore J, Leber B, Andrews DW. Bim escapes displacement by BH3-mimetic anti-cancer drugs by double-bolt locking both Bcl-XL and Bcl-2. *Elife* 2019; 8.
- 43 Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ* 2018; 25(1): 65-80.
- 44 Ding J, Mooers BH, Zhang Z, Kale J, Falcone D, McNichol J, *et al.* After embedding in membranes antiapoptotic Bcl-XL protein binds both Bcl-2 homology region 3 and helix 1 of proapoptotic Bax protein to inhibit apoptotic mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem* 2014; 289(17): 11873-96.
- 45 Barclay LA, Wales TE, Garner TP, Wachter F, Lee S, Guerra RM, *et al.* Inhibition of Pro-apoptotic BAX by a noncanonical interaction mechanism. *Mol Cell* 2015; 57(5): 873-86.
- 46 Llambi F, Moldoveanu T, Tait SW, Bouchier-Hayes L, Temirov J, McCormick LL, *et al.* A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol Cell* 2011; 44(4): 517-31.
- 47 Moldoveanu T, Liu Q, Tocilj A, Watson M, Shore G, Gehring K. The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site. *Mol Cell* 2006; 24(5): 677-88.
- 48 Wang H, Takemoto C, Akasaka R, Uchikubo-Kamo T, Kishishita S, Murayama K, *et al.* Novel dimerization mode of the human Bcl-2 family protein Bak, a mitochondrial apoptosis regulator. *J Struct Biol* 2009; 166(1): 32-7.
- 49 Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M, Hsueh AJ. Bok is a proapoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(23): 12401-6.
- 50 Fernández-Marrero Y, Bleicken S, Das KK, Bachmann D, Kaufmann T, Garcia-Saez AJ. The membrane activity of BOK involves formation of large, stable toroidal pores and is promoted by cBID. *The FEBS journal* 2017; 284(5): 711-24.
- 51 Llambi F, Wang YM, Victor B, Yang M, Schneider DM, Gingras S, *et al.* BOK is a non-canonical BCL-2 family effector of apoptosis regulated by ER-associated degradation. *Cell* 2016; 165(2): 421-33.
- 52 Zheng JH, Grace CR, Guibao CD, McNamara DE, Llambi F, Wang YM, *et al.* Intrinsic instability of BOK enables membrane permeabilization in apoptosis. *Cell reports* 2018; 23(7): 2083-94. e6.
- 53 Carpio MA, Michaud M, Zhou W, Fisher JK, Walensky LD, Katz SG. Reply to fernandez-marrero *et al.* role of BOK at the intersection of endoplasmic reticulum stress and apoptosis regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113(5): E494-5.
- 54 Fernandez-Marrero Y, Ke F, Echeverry N, Bouillet P, Bachmann D, Strasser A, *et al.* Is BOK required for apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress? *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113(5): E492-E3.
- 55 Carpio MA, Michaud M, Zhou W, Fisher JK, Walensky LD, Katz SG. BCL-2 family member BOK promotes apoptosis in response to endoplasmic reticulum stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(23): 7201-6.
- 56 Ke FFS, Vanyai HK, Cowan AD, Delbridge ARD, Whitehead L, Grabow S, *et al.* Embryogenesis and adult life in the absence of intrinsic apoptosis effectors BAX, BAK, and BOK. *Cell* 2018; 173(5): 1217-30. e17.
- 57 Srivastava R, Cao Z, Nedeva C, Naim S, Bachmann D, Rabachini T, *et al.* BCL-2 family protein BOK is a positive regulator of uridine metabolism in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019; 116(31): 15469-74.
- 58 Sopha P, Ren HY, Grove DE, Cyr DM. Endoplasmic reticulum stress-induced degradation of DNAJB12 stimulates BOK accumulation and primes cancer cells for apoptosis. *J Biol Chem* 2017; 292(28): 11792-803.
- 59 Schulman JJ, Szczesniak LM, Bunker EN, Nelson HA, Roe MW, Wagner LN, *et al.* Bok regulates mitochondrial fusion and morphology. *Cell Death Differ* 2019.
- 60 Rabachini T, Fernandez-Marrero Y, Montani M, Loforese G, Sladky V, He Z, *et al.* BOK promotes chemical-induced hepatocarcinogenesis in mice. *Cell Death Differ* 2018; 25(4): 708-20.
- 61 Billen LP, Shamas-Din A, Andrews DW. Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene* 2008; 27 Suppl 1: S93-104.
- 62 Lei K, Davis RJ. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(5): 2432-7.
- 63 Singh PK, Roukounakis A, Frank DO, Kirschnek S, Das KK, Neumann S, *et al.* Dynein light chain 1 induces assembly of large Bim complexes on mitochondria that stabilize Mcl-1 and regulate apoptosis. *Genes Dev* 2017; 31(17): 1754-69.
- 64 Geissler A, Haun F, Frank DO, Wieland K, Simon MM, Idzko M, *et al.* Apoptosis induced by the fungal pathogen gliotoxin requires a triple phosphorylation of Bim by JNK. *Cell Death Differ* 2013; 20(10): 1317-29.
- 65 Hubner A, Barrett T, Flavell RA, Davis RJ. Multisite phosphorylation regulates Bim stability and apoptotic activity. *Mol Cell* 2008; 30(4): 415-25.
- 66 O'Reilly LA, Cullen L, Visvader J, Lindeman GJ, Print C, Bath ML, *et al.* The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells. *Am J Pathol* 2000; 157(2): 449-61.
- 67 Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* 2001; 29(Pt 6): 684-8.
- 68 Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 1996; 87(4): 619-28.
- 69 Shamas-Din A, Bindner S, Zhu W, Zaltsman Y, Campbell C, Gross A, *et al.* tBid undergoes multiple conformational changes at the membrane required for Bax activation. *J Biol Chem* 2013; 288(30): 22111-27.
- 70 Lovell JF, Billen LP, Bindner S, Shamas-Din A, Fradin C, Leber B, *et al.* Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* 2008; 135(6): 1074-84.
- 71 Chou JJ, Li H, Salvesen GS, Yuan J, Wagner G. Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell*

- 1999; 96(5): 615-24.
- 72 Hinds MG, Smits C, Fredericks-Short R, Risk JM, Bailey M, Huang DC, *et al.* Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death Differ* 2007; 14(1): 128-36.
- 73 Gavathiotis E, Suzuki M, Davis ML, Pitter K, Bird GH, Katz SG, *et al.* BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* 2008; 455(7216): 1076-81.
- 74 Kushnareva Y, Andreyev AY, Kuwana T, Newmeyer DD. Bax activation initiates the assembly of a multimeric catalyst that facilitates Bax pore formation in mitochondrial outer membranes. *PLoS Biol* 2012; 10(9): e1001394.
- 75 Xu XP, Zhai D, Kim E, Swift M, Reed JC, Volkmann N, *et al.* Three-dimensional structure of Bax-mediated pores in membrane bilayers. *Cell Death Dis* 2013; 4: e683.
- 76 Volkmann N, Marassi FM, Newmeyer DD, Hanein D. The rheostat in the membrane: BCL-2 family proteins and apoptosis. *Cell Death Differ* 2014; 21(2): 206-15.
- 77 Grosse L, Wurm CA, Bruser C, Neumann D, Jans DC, Jakobs S. Bax assembles into large ring-like structures remodeling the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *EMBO J* 2016; 35(4): 402-13.
- 78 Salvador-Gallego R, Mund M, Cosentino K, Schneider J, Unsay J, Schraermeyer U, *et al.* Bax assembly into rings and arcs in apoptotic mitochondria is linked to membrane pores. *EMBO J* 2016; 35(4): 389-401.
- 79 McArthur K, Whitehead LW, Heddeleston JM, Li L, Padman BS, Oorschot V, *et al.* BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis. *Science* 2018; 359(6378). pii: eaao6047.
- 80 Riley JS, Quarato G, Cloix C, Lopez J, O'Prey J, Pearson M, *et al.* Mitochondrial inner membrane permeabilisation enables mtDNA release during apoptosis. *EMBO J* 2018; 37(17). pii: e99238.
- 81 Cosentino K, Garcia-Saez AJ. MIM through MOM: the awakening of Bax and Bak pores. *EMBO J* 2018; 37(17). pii: e100340.
- 82 Czabotar PE, Westphal D, Dewson G, Ma S, Hockings C, Fairlie WD, *et al.* Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. *Cell* 2013; 152(3): 519-31.
- 83 Zhang Z, Subramaniam S, Kale J, Liao C, Huang B, Brahmabhatt H, *et al.* BH3-in-groove dimerization initiates and helix 9 dimerization expands Bax pore assembly in membranes. *EMBO J* 2016; 35(2): 208-36.
- 84 Liao C, Zhang Z, Kale J, Andrews DW, Lin J, Li J. Conformational heterogeneity of BAX helix 9 dimer for apoptotic pore formation. *Sci Rep* 2016; 6: 29502.
- 85 Uren RT, O'Hely M, Iyer S, Bartolo R, Shi MX, Brouwer JM, *et al.* Disordered clusters of Bak dimers rupture mitochondria during apoptosis. *Elife* 2017; 6.
- 86 Uren RT, Iyer S, Kluck RM. Pore formation by dimeric Bak and Bax: an unusual pore? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2017; 372(1726).
- 87 Cosentino K, Garcia-Saez AJ. Bax and bak pores: are we closing the circle? *Trends Cell Biol* 2017; 27(4): 266-75.
- 88 Bleicken S, Assafa TE, Stegmuller C, Wittig A, Garcia-Saez AJ, Bordignon E. Topology of active, membrane-embedded Bax in the context of a toroidal pore. *Cell Death Differ* 2018; 25(10): 1717-31.
- 89 Westphal D, Dewson G, Menard M, Frederick P, Iyer S, Bartolo R, *et al.* Apoptotic pore formation is associated with in-plane insertion of Bak or Bax central helices into the mitochondrial outer membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(39): E4076-85.
- 90 Montessuit S, Somasekharan SP, Terrones O, Lucken-Ardjomande S, Herzig S, Schwarzenbacher R, *et al.* Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization. *Cell* 2010; 142(6): 889-901.
- 91 Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, *et al.* Bid, Bax, and lipids cooperate to form supra-molecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 2002; 111(3): 331-42.
- 92 Terrones O, Antonsson B, Yamaguchi H, Wang HG, Liu J, Lee RM, *et al.* Lipidic pore formation by the concerted action of pro-apoptotic BAX and tBID. *J Biol Chem* 2004; 279(29): 30081-91.
- 93 Bleicken S, Jeschke G, Stegmuller C, Salvador-Gallego R, Garcia-Saez AJ, Bordignon E. Structural model of active Bax at the membrane. *Mol Cell* 2014; 56(4): 496-505.
- 94 Subburaj Y, Cosentino K, Axmann M, Pedrueza-Villalmanzo E, Hermann E, Bleicken S, *et al.* Bax monomers form dimer units in the membrane that further self-assemble into multiple oligomeric species. *Nat Commun* 2015; 6: 8042.
- 95 Bleicken S, Landeta O, Landajueta A, Basanez G, Garcia-Saez AJ. Proapoptotic Bax and Bak proteins form stable protein-permeable pores of tunable size. *J Biol Chem* 2013; 288(46): 33241-52.
- 96 Kuwana T, Olson NH, Kiosses WB, Peters B, Newmeyer DD. Pro-apoptotic Bax molecules densely populate the edges of membrane pores. *Sci Rep* 2016; 6: 27299.
- 97 Gillies LA, Peters B, Knudson CM, Newmeyer DD, Kuwana T. Visual and functional demonstration of growing Bax-induced pores in mitochondrial outer membranes. *Mol Biol Cell* 2015; 26(2): 339-49.
- 98 Basanez G, Sharpe JC, Galanis J, Brandt TB, Hardwick JM, Zimmerberg J. Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J Biol Chem* 2002; 277(51): 49360-5.
- 99 Horvath SE, Daum G. Lipids of mitochondria. *Prog Lipid Res* 2013; 52(4): 590-614.
- 100 Jiang J, Huang Z, Zhao Q, Feng W, Belikova NA, Kagan VE. Interplay between bax, reactive oxygen species production, and cardiolipin oxidation during apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 368(1): 145-50.
- 101 Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(3): 1259-63.
- 102 Nomura K, Imai H, Koumura T, Kobayashi T, Nakagawa Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem J* 2000; 351(Pt 1): 183-93.
- 103 Lucken-Ardjomande S, Montessuit S, Martinou JC. Bax activation and stress-induced apoptosis delayed by the accumulation of cholesterol in mitochondrial membranes. *Cell Death Differ* 2008; 15(3): 484-93.

- 104 Christenson E, Merlin S, Saito M, Schlesinger P. Cholesterol effects on BAX pore activation. *J Mol Biol* 2008; 381(5): 1168-83.
- 105 Shamas-Din A, Bindner S, Chi X, Leber B, Andrews DW, Fradin C. Distinct lipid effects on tBid and Bim activation of membrane permeabilization by pro-apoptotic Bax. *Biochem J* 2015; 467(3): 495-505.
- 106 Montero J, Morales A, Llacuna L, Lluís JM, Terrones O, Basanez G, *et al.* Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68(13): 5246-56.
- 107 Dlugosz PJ, Billen LP, Annis MG, Zhu W, Zhang Z, Lin J, *et al.* Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *EMBO J* 2006; 25(11): 2287-96.
- 108 Peng J, Tan C, Roberts GJ, Nikolaeva O, Zhang Z, Lapolla SM, *et al.* tBid elicits a conformational alteration in membrane-bound Bcl-2 such that it inhibits Bax pore formation. *J Biol Chem* 2006; 281(47): 35802-11.
- 109 Zhao L, He F, Liu H, Zhu Y, Tian W, Gao P, *et al.* Natural diterpenoid compound elevates expression of Bim protein, which interacts with antiapoptotic protein Bcl-2, converting it to pro-apoptotic Bax-like molecule. *J Biol Chem* 2012; 287(2): 1054-65.
- 110 Peng J, Ding J, Tan C, Baggenstoss B, Zhang Z, Lapolla SM, *et al.* Oligomerization of membrane-bound Bcl-2 is involved in its pore formation induced by tBid. *Apoptosis* 2009; 14(10): 1145-53.
- 111 Zhang Z, Lapolla SM, Annis MG, Truscott M, Roberts GJ, Miao Y, *et al.* Bcl-2 homodimerization involves two distinct binding surfaces, a topographic arrangement that provides an effective mechanism for Bcl-2 to capture activated Bax. *J Biol Chem* 2004; 279(42): 43920-8.
- 112 Ding J, Zhang Z, Roberts GJ, Falcone M, Miao Y, Shao Y, *et al.* Bcl-2 and Bax interact via the BH1-3 groove-BH3 motif interface and a novel interface involving the BH4 motif. *J Biol Chem* 2010; 285(37): 28749-63.
- 113 Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, *et al.* ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 2013; 19(2): 202-8.
- 114 Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, *et al.* ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res* 2008; 68(9): 3421-8.
- 115 Kolluri SK, Zhu X, Zhou X, Lin B, Chen Y, Sun K, *et al.* A short Nur77-derived peptide converts Bcl-2 from a protector to a killer. *Cancer Cell* 2008; 14(4): 285-98.
- 116 Aranovich A, Liu Q, Collins T, Geng F, Dixit S, Leber B, *et al.* Differences in the mechanisms of proapoptotic BH3 proteins binding to Bcl-XL and Bcl-2 quantified in live MCF-7 cells. *Mol Cell* 2012; 45(6): 754-63.
- 117 Liu Q, Leber B, Andrews DW. Interactions of pro-apoptotic BH3 proteins with anti-apoptotic Bcl-2 family proteins measured in live MCF-7 cells using FLIM FRET. *Cell Cycle* 2012; 11(19): 3536-42.
- 118 Niu X, Brahmabhatt H, Mergenthaler P, Zhang Z, Sang J, Daude M, *et al.* A small-molecule inhibitor of Bax and Bak oligomerization prevents genotoxic cell death and promotes neuroprotection. *Cell Chem Biol* 2017; 24(4): 493-506, e5.
- 119 Garner TP, Amgalan D, Reyna DE, Li S, Kitsis RN, Gavathiotis E. Small-molecule allosteric inhibitors of BAX. *Nat Chem Biol* 2019; 15(4): 322-30.