

Я.М. Шуба, Н. Преварська, Р. Скрима

Кальцієва залежність запрограмованої клітинної загибелі при раку простати

Кальцій – універсальний клітинний посередник, регулюючий множество физиологических функций, включая такую важную из них, как способность клетки реализовать упорядоченное самоуничтожение после завершения своей миссии, известной под названием апоптоз. Если эта функция повреждена, то нежелательные клетки в конце-концов могут захватить всю ткань, превратив ее в рак. Кальциевая зависимость апоптоза, когда все его аспекты изучены и поняты, а ключевые «молекулярные игроки» идентифицированы, предоставляет хорошую возможность для контроля злокачественного роста. В этом обзоре мы описываем основные молекулярные детерминанты кальциевого гомеостаза клеток рака простаты и устанавливаем их роль в трансформации в апоптозрезистивные фенотипы клеток, характерных для поздней, андрогеннезависимой стадии рака простаты. Показано, что особенностью такой трансформации есть полная утрата апоптотического пути, связанного с опустошением кальциевых депо эндоплазматического ретикулула.

Проліферація та апоптоз – це два ключових процеси, що зумовлюють нормальний тканинний гомеостаз. Дерегуляція проліферації разом з пригніченням апоптозу створюють умови для патологічного росту тканини, що в кінцевому підсумку може перерости в неконтрольовану експансію та інвазивність, характерні для злоякісного переродження. Незважаючи на те, що як молекулярні механізми проліферація та апоптоз є незалежними процесами, з яких перший базується на циклінзалежних протеїнкіназах (cyclin-dependent protein kinases, CDKs) – основних регуляторах клітинного циклу [1], а другий – на цистеїнових протеазах, відомих під назвою каспази – головних виконавцях запрограмованої загибелі клітин [2], обидва вони розгортаються за умов інтенсивної кальцієвої сигналізації, а загальний кальцієвий гомеостаз являє собою визначальне середовище для їх проходження [3].

© Я.М. Шуба, Н. Преварська, Р. Скрима

Рак простати (РП) – одна з основних загроз здоров'ю чоловіків. Рання стадія його розвитку залежить від наявності андрогенів, і андрогендеприваційна терапія є на цій стадії найбільш ефективним засобом для припинення росту пухлини і навіть для її регресії. Але, на жаль, незважаючи на цю терапію, через деякий час найімовірніше відбувається рецидив злоякісного росту вже на андрогеннезалежній основі, для якого поки не існує ефективного лікування [4]. Тому надзвичайно важливим є розуміння того, що саме зумовлює перехід до андрогеннезалежної стадії РП. Відомо, що андрогеннезалежність пов'язана з виникненням нових фенотипів клітин, для яких найбільш характерною рисою є не посилена проліферація, а перш за все надзвичайна стійкість до апоптозу [5, 6]. У цьому огляді, базуючись на англomовній науковій літературі, ми розглядаємо основні

молекулярні та структурні детермінанти, що визначають кальцієвий гомеостаз епітеліальних клітин РП та встановлюємо їх роль у трансформації клітин в апоптозрезистивні фенотипи, характерні для пізньої, андроген-незалежної стадії РП. Досягнення останніх років у розумінні молекулярних механізмів кальцієвої сигналізації, пов'язаної з апоптозом клітин РП, дають змогу сподіватися, що фундаментальні знання в цьому напрямку знайдуть своє застосування в практичній медицині.

КАЛЬЦІЙ ТА АПОПТОЗ

Апоптоз, або запрограмована загибель клітини – це упорядкований фізіологічний процес, що дозволяє усунути клітини, які завершили, чи з якихось причин нездатні виконувати свою функцію і тому необхідність в їх існуванні відпала. Апоптоз є невід'ємною частиною нормального тканинного гомеостазу, а його порушення є причиною багатьох патологій. Рамки даного огляду не дозволяють заглиблюватися в детальний опис загальної складної молекулярної “машинерії” апоптозу, різні аспекти якої добре представлені в значній кількості спеціалізованих оглядів останніх років [7–14], тому ми обмежимося тільки окресленням основних механізмів, які відзначаються особливою кальцієвою залежністю. Незважаючи на те, що всі ці механізми є взаємопов'язаними, взаємодоповнюючими і тісно переплетеними, їх умовно можна розділити на три основні типи – мітохондріальні, цитоплазматичні та ретикулярні, тобто залежні від ендоплазматичного ретикула (ER).

Як органели, що містять необхідний апарат для запуску клітинного “самозгубного” процесу, мітохондрії являють собою центральний інтеграційний пункт, де вирішується доля клітини. Перевантаження клітини кальцієм, що може бути викликане різноманітними початковими стимулами, ініціює посилене поглинання його міто-

хондріями. Надмірна акумуляція кальцію в мітохондріях є однією з основних причин для так званого “переключення мітохондріальної проникності” (mitochondrial permeability transition), яка принаймні частково зумовлюється відкриттям “пори перехідної проникності” (permeability transition pore, РТР) – складного мультипротеїнового комплексу, розташованого в місцях контакту внутрішньої та зовнішньої мітохондріальних мембран. Відкриття цієї пори дає вихід у цитоплазму таких мітохондріальних апоптогенних факторів, як цитохром с (cytochrome c – Cyt-c) та апоптозіндукуючого фактора (apoptosis-inducing factor – AIF), які в свою чергу активують каспазний виконавчий каскад загибелі клітин. Мітохондріальна проникність загалом і РТР-комплекс зокрема регулюється членами Bcl-2 родини білків, з яких ті, що перешкоджають вивільненню апоптогенних факторів – Bcl-2 сам по собі, Bcl-x_L і Mcl-1, відіграють роль захисників від апоптозу, а ті, що сприяють вивільненню – Bax, Bad та Bak, діють як посилювачі апоптозу [15].

Початкове перевантаження клітини кальцієм може призвести до загибелі клітин також іншим шляхом, який безпосередньо не пов'язаний з “переключенням мітохондріальної проникності”. Цей шлях базується головним чином на активації кальцій-кальмодулінзалежної фосфатази – кальцій-неврину (calcineurin). Останній в свою чергу сприяє апоптозу через регуляцію активності за допомогою дефосфорилування таких ефекторів, як проапоптотичний член Bcl-2 родини – Bad [16] і транскрипційні фактори родини NFAT (nuclear factor of activated T cells – ядерний фактор активованих Т клітин) [17]. Існують також інші кальційзалежні ферменти, що безпосередньо беруть участь у ланцюгу апоптотичних подій, серед яких слід особливо відзначити декілька типів ДНК-деградуючих ендонуклеаз [18] і кальційчутливих цистеїнових протеаз з родини калпаїнів, важливих для

активації цілої низки проапоптотичних ефекторів [19].

ER – важлива, динамічна органела, що служить для зберігання основної частки внутрішньоклітинного Ca^{2+} та забезпечення необхідних умов для остаточного дозрівання заново народжуваних білків. Так званий ER-стрес, що пов'язаний з будь-якими порушеннями в його кальцієвому гомеостазі та/або в системі обробки новосинтезованих білків, також важливий чинник в апоптозі [10, 14]. Роль саме кальцієвого компонента в ER-стресумовленому апоптозі стала особливо очевидною з введенням у дослідницьку практику тапсигаргіну (thapsigargin, TG) – рослинного сесквітерпенлактону, що може незворотно блокувати SERCA (sarco(endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) помпу, яка забезпечує наповнення ER кальцієм. Блокада SERCA-помпи за допомогою тапсигаргіну дозволяє спустошити ER кальцієвих депо з одночасним підвищенням цитозольної концентрації кальцію як внаслідок його вивільнення з депо, так і за рахунок надходження із зовнішньоклітинного простору через так званий ER-депозалежний механізм входу (див. нижче). Нині тапсигаргіндукований апоптоз являє собою популярну модель для дослідження кальційзалежних апоптотичних механізмів.

Було показано, що ER-стрес активує специфічну ER-локалізовану каспазу-12 [20], яка в свою чергу здатна запускати каскад реакцій, що призводять до активації інших каспаз шляхом, незалежним від мітохондрій та вивільнення Cyt-c [21]. Завдяки останнім дослідженням вдалося також з'ясувати важливе значення в ER-залежному апоптозі позамітохондріально розташованих білків Bcl-2 родини, особливо тих, які знаходяться в мембрані ER [22–24]. Вважається, що ER-локалізовані члени Bcl-2 родини беруть участь у регуляції вмісту люмінального Ca^{2+} та експресії ER-резидентних білків, суттєво визначаючи таким чином апоптотичний статус клітин [22–24].

КАЛЬЦІЄВА ЗАЛЕЖНІСТЬ АПОПТОЗУ КЛІТИН РП

Розуміння механізмів апоптозу клітин РП, включаючи їх кальцієву залежність, є вирішальним для розробки нових методів лікування цього захворювання – надзвичайно гетерогенна структура, утворена з суміші клітин, які можуть експресувати андрогенний рецептор (AR), що надає їм властивості андрогензалежності, і які не можуть. На ранній стадії раку більшість неопластичної маси представлена андрогензалежними клітинами, чий проапоптотичний потенціал регулюється андрогенним рецептором. Встановлено, що апоптотична загибель цих клітин може бути легко викликана вилученням андрогенів [25, 26]. Однак пов'язане з цим збагачення пухлини популяціями існуючих андрогеннезалежних клітин, а також виникнення нових фенотипів клітин з підвищеною апоптотичною резистивністю внаслідок генетичних трансформацій призводить до повної втрати пухлиною андрогензалежності та схильності до терапії, характерних для пізньої стадії РП. На щастя, андрогеннезалежні клітини продовжують зберігати всю молекулярну систему апоптозу, тому пріоритетним завданням є вивчення особливостей її функціонування з наступним виробленням ефективних засобів для її активації.

Вже досить давно відомо, що індукція апоптозу клітин РП у відповідь на вилучення андрогенів, пов'язана з тривалим підвищенням внутрішньоклітинної концентрації кальцію ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) [27] з наступною активацією Ca^{2+} - Mg^{2+} -залежної ендонуклеази, яка залучена у фрагментацію геномної ДНК [28]. Молекулярні механізми, які лежать в основі такого підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$, не зовсім з'ясовані, але той факт, що відсоток клітин із вентральної частки простати щура, схильних до апоптозу, міг бути суттєво зниженим при застосуванні таких блокаторів потенціалзалежних кальцієвих каналів

(ПЗКК) плазматичної мембрани, як ніфедипін і верапаміл, вказував на можливий вхід Ca^{2+} із зовнішньоклітинного середовища [27, 29]. Однак, зважаючи на те, що подальші прямі електрофізіологічні дослідження не виявили вагомій ролі ПЗКК у забезпеченні входу кальцію в більшості типів епітеліальних клітин РП, ефективність цих препаратів у протидії проапоптотичному ефекту вилучення андрогенів, найімовірніше, не має прямого відношення до пригнічення ними входу кальцію, а зумовлена якимось їх іншими діями, які, безумовно, заслуговують на подальше вивчення.

Слід зазначити, що вилучення андрогенів з одного боку стимулюючи апоптоз андрогензалежних клітин РП через підвищення цитозольного вмісту Ca^{2+} , який у свою чергу може спричинити зниження в них рівня АР. Така можливість була продемонстрована на андрогензалежних клітинах пухлини простати лінії LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate), в яких високий $[\text{Ca}^{2+}]_i$, викликаний застосуванням інгібітора SERCA-помпи тапсигаргіну, спричинював чітке зниження експресії в них АР [30]. Загалом, ці факти свідчать про те, що андрогенна депривація, призводячи до тимчасового посилення апоптозу, одночасно може бути тим фактором, який сприяє переродженню клітин в андрогеннезалежні фенотипи.

Сильна андрогензалежність апоптозу клітин пухлини простати повинна зумовлюватися активацією або пригніченням андрогенвідповідальних генів. Один з андрогеніндукованих генів, ідентифікованих у простаті, кодує калретикулін (calreticulin) [31–33] – високоємний кальційзв'язувальний білок люмену ЕР. Така ідентифікація надала перші свідчення можливого залучення в апоптоз клітин пухлини простати механізмів, залежних не тільки від цитоплазматичного Ca^{2+} , але і від функціонального статусу ЕР. Важливість ЕР-залежних механізмів апоптозу витікала також з

досліджень на інших типах клітин [34]. Проте роль ЕР в апоптозі клітин все ще залишається досить суперечливою і до кінця не з'ясованою.

Перші дослідження тапсигаргініндукованого апоптозу клітин андрогеннезалежних ліній РП щура – АТ-3 та людини – TSU-Pr1, DU-145, PC-3 хоч і підтвердили необхідність та важливість тривалого підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$, в той же час заперечили будь яку вагому роль спустошення ЕР кальцієвих депо в цьому процесі [35]. Концепція про домінуюче значення цитозольного Ca^{2+} набула подальшого розвитку в дослідях з неперервного контролю $[\text{Ca}^{2+}]_i$ під час всього апоптотичного циклу. В цих дослідях тривалі зміни $[\text{Ca}^{2+}]_i$, індуковані в лініях клітин пухлини простати АТ-3 і TSU через хронічне прикладання тапсигаргіну, були розділені на ранню фазу (1–12 год) помірного зростання (менше ніж 0,5 мкмоль/л) і затриману фазу (більше ніж 12 год) сильного зростання (приблизно 10 мкмоль/л) [36]. У ранній фазі була помічена активація транскрипційного фактора GADD153, тоді як пізня відзначалася запуском кальційнеринопосередкованого апоптотичного шляху, що супроводжувався траслокацією Bad у мітохондрії, вивільненням Cyt-c, стимуляцією ініціаторної каспази-9 і фрагментацією ДНК [36].

На противагу цим результатам характеристика тапсигаргініндукованого апоптозу в андрогензалежних клітинах лінії LNCaP за експериментальних умов, що дозволяли викликати спустошення ЕР-депо без суттєвого підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$, показала, що спустошення депо саме по собі є достатнім для виклику апоптозу LNCaP-клітин [37]. Більше того, одне спустошення ЕР-депо призводило до швидшої активації каспази-9, ніж подвійний стимул, пов'язаний зі спустошенням депо та підвищенням $[\text{Ca}^{2+}]_i$, хоч подальші апоптотичні механізми були однакові незалежно від виду початкового стимулу [37]. Наші власні дослідження,

проведені на клітинах LNCaP, підтвердили, що для активації апоптозу за допомогою тапсигаргіну стаціонарний вхід Ca^{2+} не є необхідним – цілком достатнім є спустошення депо [38]. У цих дослідженнях нам вперше вдалося зареєструвати EP-депозалежний кальцієвий струм (store-operated Ca^{2+} current – I_{SOC}) у клітинах пухлини простати, що лежить в основі тапсигаргініндукованого входу Ca^{2+} , та показати наявність тапсигаргін-викликаного апоптозу за умов блокування цього струму [38]. Більше того, таке блокування призводило навіть до посилення апоптозу, особливо в перші 24 год [38], свідчаючи про те, що EP-стрес-і $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -залежний апоптотичні шляхи можуть конкурувати між собою за одні і ті самі молекулярні детермінанти, що добре узгоджується з виявленими відмінностями у швидкості активації каспази-9 [37]. Цікаво, що апоптоз LNCaP-клітин може бути також помітно стимульований кофеїном, чия основна дія полягає у вивільненні Ca^{2+} з EP-депо через ріанодинові рецептори (ryanodine receptors – RyR) [39]. Однак дія кофеїну в клітинах LNCaP теж супроводжувалася входом Ca^{2+} , природа якого поки не зовсім зрозуміла, що перешкодило з упевненістю говорити про виключну EP-залежність його проапоптотичної дії [39].

Очевидно, що кальцієве наповнення EP є важливою детермінантою у визначенні не тільки проапоптотичного, але і потенціалу росту андрогензалежних клітин LNCaP, зважаючи на те, що дія стимулятора проліферації – інсулінового фактора росту (insulin growth factor – IGF) та проапоптотичного агенту – фактора некрозу пухлин- α (tumor necrosis factor- α – TNF- α) пов'язана відповідно зі збільшенням та зниженням вмісту Ca^{2+} в EP [40].

Цікаву взаємозалежність мобілізації Ca^{2+} з EP та мітохондріальним його поглинання було показано для стауроспориніндукованого апоптозу андрогеннезалежних клітин пухлини простати лінії PC-3 [41]. У

цій клітинній моделі дія деяких, але не всіх проапоптотичних стимулів супроводжувалася зменшенням кальцієвого вмісту EP, яке передувало активації каспаз [41]. Зокрема, стауроспориніндукований апоптоз був пов'язаний з початковим спустошенням EP-депо, за яким наставало посилене мітохондріальне поглинання Ca^{2+} з наступним вивільненням Cyt-c, причому роль сигнального посередника між EP і мітохондріями відігравав білок Bcl-2 родини – Вах [41].

Таким чином здається, що обидва – EP стресзалежний та $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -залежний апоптотичні шляхи є діючими в епітеліальних клітинах РП, однак необхідні додаткові дослідження для виявлення та розділення молекулярних механізмів, на яких вони базуються. Зокрема, все ще залишається не зовсім визначене значення EP-резидентної каспази-12. Імовірно також, що основні кальційзалежні апоптотичні механізми – і це буде показано нижче – відрізняються в андрогензалежних і незалежних фенотипах клітин РП.

Тапсигаргін, кальцієві іонофори та агоністи, що активують сигнальний шлях фосфоліпази с (phospholipase с – PLC) опосередкованого гідролізу фосфоліпідів, здатні мобілізувати внутрішньоклітинний Ca^{2+} з наступною стимуляцією його входу через депозалежний механізм. Однак існує багато проапоптотичних агентів і впливів, які прямо не пов'язані з системами, що можуть призводити до швидкого збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Нещодавно було показано, що такі їх представники, як трансформуючий фактор росту β (transforming growth factor- β – TGF- β), хемотерапевтичні засоби 5-фторурацил (5-fluorouridine – 5-FdUR) і доксорубіцин (doxorubicin), а також радіація викликають затримане збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у клітинах пухлини простати ліній AT-3, TSU і PC3, яке супроводжувало морфологічні зміни, характерні для перебігу процесу апоптотичної загибелі [42]. У відповідь на кожен з цих впливів збільшення

$[Ca^{2+}]_i$ починалося після затримки у 28–48 год і проходило у дві стадії тривалістю 0,5–2 та 4–8 год відповідно, в результаті яких кінцевий вміст $[Ca^{2+}]_i$ сягав десятків мікромолей [42]. Збільшення $[Ca^{2+}]_i$, очевидно, відбувалося внаслідок входу, оскільки у середовищі з низьким вмістом Ca^{2+} спостерігалось значне подовження часу апоптотичних подій, і було необхідне для вивільнення Cyt-c, активації каспази-3 та фрагментації ДНК [42]. Однак через які саме мембранні шляхи цей вхід кальцію відбувався, залишається нез'ясованим.

Було показано, що TGF- β може викликати швидке (протягом хвилин), транзйентне, субмікромольне підвищення $[Ca^{2+}]_i$ у РС-3U-клітинах пухлини простати внаслідок TGF- β -опосередкованого пригнічення мітохондрій і вивільнення ними Ca^{2+} внаслідок мітохондріального роз'єднання [43]. Вважається, що цей ефект є важливим в механізмі проапоптотичної дії TGF- β [43].

Серцеві глікозиди головним чином відомі за своїм позитивним інотропним ефектом на серцеву діяльність, однак існують дані, що вони також здатні проявляти потужну проапоптотичну дію на клітини РП, що включає в себе зміни кальцієвого гомеостазу. На моделі клітин пухлини простати лінії РС-3 було показано, що серцеві глікозиди призводять до входу Ca^{2+} [44, 45], який за аналогією з кардіоміоцитами був віднесений до зворотної активності Na^+Ca^{2+} -обмінника, зумовленої переваженням клітин Na^+ в результаті пригнічення глікозидами Na^+K^+ -АТФази [45]. У випадку серцевих глікозидів вхід Ca^{2+} призводить до задіяння явно мітохондріального шляху запрограмованої загибелі, що супроводжується втратою мембранного потенціалу мітохондрій [45] і вивільненням Cyt-c з наступною активацією каспази-3 та каспази-8 [44]. Безумовно, ці результати є дуже обнадійливими, однак механізм входу Ca^{2+} вимагає подальшого з'ясування з огляду на те, що наявність функціонального Na^+Ca^{2+} -обміну в епітеліальних клітинах РП

до цього часу продемонструвати не вдалося.

Таким чином, аналіз існуючих даних свідчить про те, що кальцієва сигналізація з залученням усіх трьох механізмів – цитоплазматичного, мітохондріального та ER-залежного відіграє роль у апоптозі епітеліальних клітин РП, однак відносний внесок кожного з них, очевидно, залежить від природи стимулу до апоптозу та початкового проапоптотичного статусу клітин.

МОЛЕКУЛЯРНІ ДЕТЕРМІНАНТИ КАЛЬЦІЄВОГО ГОМЕОСТАЗУ ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИН РАКУ ПРОСТАТИ

Епітеліальні клітини РП є представниками незбудливих клітин секреторного типу і залежно від того, які саме субклітинні та молекулярні детермінанти визначають їх кальцієвий гомеостаз, вони подібні до інших типів незбудливих клітин. Загалом, існує три основних кальцієвих пула, які клітини використовують для створення різного типу кальцієвих сигналів: зовнішньоклітинний простір, ER і мітохондрії. Кожен з цих пулів відокремлений власними мембранами, які включають в себе різноманітні кальцій-транспортуючі білки. Специфічне для кожного типу клітин представлення цих білків і зумовлює відносну участь кожного з пулів у створенні кальцієвого сигналу, а також його часопросторові характеристики.

В епітеліальних клітинах РП, як і в незбудливих клітинах загалом, кальцієвий вхід із зовнішньоклітинного простору головним чином підтримується так званим механізмом “ємнісного кальцієвого входу” (capacitative calcium entry – CCE), відомого ще під більш загальною назвою, “депозалежний кальцієвий вхід” (store-operated calcium entry – SOCE) [46]. Цей механізм може відслідковувати ступінь наповнення ER кальцієвих депо і дозволить вхід Ca^{2+} тільки тоді, коли наповнення суттєво знижується. Він опосередковується спеціалізо-

ваними депозалежними, кальційпроникними каналами (store-operated Ca^{2+} -permeable channels – SOC) плазматичної мембрани (ПМ). Найбільш загальним фізіологічним стимулом для активації цих каналів є IP_3 -опосередковане вивільнення Ca^{2+} з ЕР у відповідь на стимуляцію поверхневих рецепторів, зчеплених з PLC-каталізованим сигнальним шляхом гідролізу фосфоліпідів, продуктом якого і є IP_3 . У зв'язку з цим одразу при своєму відкритті ці канали були названі “ Ca^{2+} вивільнення-активовані канали” (Ca^{2+} release-activated channels – CRAC) [47].

Хоч молекулярна природа SOC- та CRAC-каналів, а також механізми їх активації у відповідь на спустошення ЕР все ще остаточно не з'ясовані, представники широко досліджуваної нині родини іонних каналів, відомої під назвою TRP (Transient Receptor Potential), вважаються найбільш обнадійливими кандидатами на роль SOC [46, 48–50]. Родина TRP-каналів ссавців бере свій початок з першого каналу такого типу, клонованого з мушки *Drosophila*, в якій він задіяний у системі фототрансдукції. Наші власні дослідження, проведені на андрогензалежній простатній лінії епітеліальних клітин людини LNCaP, показали залучення в простатспецифічний тип ендогенних SOC представників “канонічної” TRP-підродини – TRPC1 [51] та TRPC4 (неопубліковані дані), а також “ванілоїдної” TRP-підродини – TRPV6 [52]. У цьому плані TRPV6, відомий також під назвами “кальцієвий транспортер типу 1” (Ca^{2+} transporter type 1 – CaT1) або “епітеліальний кальцієвий канал 2” (epithelial calcium channel 2 – ECaC2) [53], заслуговує на особливу увагу у зв'язку з тим, що його експресія корелює зі стадіями РП [54–56]. Більше того, ймовірно, що експресія TRPV6 може знаходитися під прямим негативним контролем з боку АР, адже було показано, що фармакологічна блокада АР за допомогою антиандрогенів не тільки призводить до підвищення вмісту мРНК до TRPV6 в клітинах LNCaP [52, 54], але і до посилення

в них струму через SOC (I_{SOC}) [52]. Дослідження зразків тканини 140 пацієнтів з РП виявили чіткий зв'язок експресії TRPV6 з розвитком захворювання та запропонували його як можливий прогностичний маркер для класифікації РП [56]. Що ж до ролі TRPV6 у генерації ендогенного простатспецифічного I_{SOC} , то ймовірно, що при створенні цього струму TRPV6 повинен тісно взаємодіяти з якимось іншими потенційними складовими та/або регуляторами SOC, бо штучна надекспресія TRPV6 у клітинах LNCaP призводила до появи додаткового струму до I_{SOC} з відмінними властивостями [57]. У будь-якому разі молекулярна основа SOCE в епітеліальних клітинах РП ще далека від свого остаточного з'ясування, а той факт, що крім TRPV6 вона може включати також TRPC1 і TRPC4 свідчить про її складність та можливу мультиканальну природу. Безсумнівно, майбутні дослідження внесуть більшу ясність у цю проблему.

ЕР – важлива динамічна структура, яка відповідає за зберігання основної частки внутрішньоклітинного Ca^{2+} . Основні молекулярні детермінанти, які задіяні в маніпуляціях з кальцієм через ЕР, включають: IP_3 (IP_3R) та ріанодинові (RuR) рецептори, що забезпечують вивільнення Ca^{2+} у відповідь на фізіологічну стимуляцію, канали втрат, через які відбувається пасивне витікання кальцію з ЕР, SERCA Ca^{2+} -помпа, що забезпечує завантаження ЕР кальцієм і кальційзв'язувальні білки-чаперони (chaperones), що беруть участь у внутрішньольюмінальному зберіганні Ca^{2+} . В результаті узгодженого функціонування цих молекулярних детермінант забезпечується оптимальне базальне наповнення ЕР кальцієм, яке потрібне для синтезу та дозрівання білків.

Дані про представлення специфічних ізоформ ключових кальційманіпулюючих білків у епітеліальних клітинах РП досить обмежені і, в основному, одержані на різних клітинних лініях простатного походження.

Так, з трьох відомих ізоформ IP_3R – IP_3R1 , IP_3R2 , IP_3R3 [58] андрогеннезалежні клітини пухлини простати лінії DU-145 переважно експресують ізоформи IP_3R1 та IP_3R3 у приблизному співвідношенні 3:1 і зовсім не експресують ізоформу IP_3R2 [59]. Майже таке ж співвідношення у експресії ізоформ IP_3R спостерігається і для андрогензалежних клітин лінії LNCaP. Враховуючи те, що згідно з існуючими уявленнями безпосередня конформаційна взаємодія IP_3R і SOCE може відігравати роль в активації SOCE [60], а також те, що підтипи IP_3R являють собою важливі детермінанти в апоптозі [61–63], ця інформація є корисною як для встановлення механізмів керування SOCE в епітеліальних клітинах РП, так і для поглибленого розуміння ER-залежності апоптозу. LNCaP-клітини також експресують функціональні RyR з переважним представленням їх ізоформ RyR1 та RyR2, які беруть участь у мобілізації Ca^{2+} з ER депо [39], але фізіологічний стимул, який призводить до їх активації, поки залишається нез'ясованим. На жаль мало що відомо про молекулярну природу шляхів пасивних втрат Ca^{2+} з ER. Відповідно до однієї з гіпотез, втрати Ca^{2+} можуть відбуватися через транслокон [64] – водну пору, яка забезпечує рух поліпептидів через мембрану ER. Останні дані, одержані на клітинах LNCaP, узгоджуються з гіпотезою про потенційну роль транслокону в опосередкуванні кальцієвих втрат [65].

Поглинання Ca^{2+} в ER контролюється родиною SERCA-помп [66], розташованих у мембрані ER, тоді як люмінальне середовище включає в себе кальційзв'язувальні чаперони, які задіяні не тільки в зберіганні Ca^{2+} , але і у згортанні та посттрансляційній модифікації білків. З декількох відомих тканинспецифічних ізоформ SERCA-помп у клітинах LNCaP була виявлена тільки фосфоламбанзалежна SERCA2b-ізоформа [67, 68], яка є однією з найбільш представлених і в інших тканинах. У простаті зага-

лом і в LNCaP клітинах зокрема досить сильно експресується калретикулін – один з найрозповсюдженіших кальційзв'язувальних (зберігаючих) чаперонів ER [69]. З огляду на те, що калретикулін представляє один з андрогеніндукованих генів у простаті [31–33], його роль у визначенні кальцієвого гомеостазу та пов'язаних з ним процесах проліферації та апоптозу набуває особливого значення для РП.

Мітохондрії мають цілу низку кальцій-транспортуючих механізмів, що дозволяють їм поглинати та вивільняти Ca^{2+} через їх внутрішню мембрану [70]. Завдяки цьому вони беруть участь у контролі локальної та глобальної цитозольної концентрації Ca^{2+} , цим самим регулюючи багато кальційзалежних процесів. РТР разом з H^+-Ca^{2+} - та Na^+-Ca^{2+} -обміном формують шляхи виходу Ca^{2+} з мітохондрій, тоді як мітохондріальне поглинання Ca^{2+} головним чином забезпечується каналоподібним уніпортером [71].

Таким чином, хоч основні детермінанти кальцієвого гомеостазу в епітеліальних клітинах РП загалом відомі, значна робота ще повинна бути проведена для визначення їх точної молекулярної природи, що є абсолютно необхідним з точки зору практичних завдань направлено впливу на їх функцію при лікуванні РП. Тим не менш, існуючі дані вже забезпечують достатній рівень базових знань для подальшого вивчення того, яких змін можуть зазнати основні детермінанти кальцієвого гомеостазу при набутті апоптотичної резистивності, характерної для просунутої, андрогеннезалежної стадії РП.

ЗМІНИ В КАЛЬЦІЄВОМУ ГОМЕОСТАЗІ, ПОВ'ЯЗАНІ З НАБУТТЯМ АНДРОГЕННЕЗАЛЕЖНОСТІ ТА АПОПТОТИЧНОЇ РЕЗИСТИВНОСТІ

Перехід до андрогеннезалежності супроводжується появою нових фенотипів клітин

з підвищеною резистивністю до апоптозу. Один з таких фенотипів тісно пов'язаний з надекспресією поширеного антиапопто-тичного онкопротейну – Bcl-2 [5, 72]. Непа-тологічні епітеліальні клітини простати загалом не експресують Bcl-2, але показано, що його експресія посилюється в аде-нокарциномі, не підданій гормональній терапії, а ще більше – в гормонрезистивній аденокарциномі, після андрогенної депривації [73–75]. Також відомо, що розвиток гормоннечутливого РП, супроводжується також збільшенням рівня експресії інших білків виживання Bcl-2 родини, таких, як Bcl-x_L і Mcl-1 [76].

Особливої уваги заслуговує збагачення андрогеннезалежної пухлини злоякісними нейроендокринними клітинами. Повністю диференційовані, непроліферуючі, нейрон-подібні нейроендокринні клітини є нормальним компонентом епітелію простати, які через вивільнення різноманітних нейро-секреторних факторів регулюють розвиток і секреторну активність простати ендокрин-паракринним шляхом [77, 78]. Однак збільшення їх популяції за межі нормальних пропорцій завдяки злоякісному переродженню базальних епітеліальних клітин є типовою характеристикою розвитку РП [78]. Нейроендокринні клітини позбуті ядерних AP [79], тим самим представляють андрогеннезалежний тип клітин у простаті. Вони також виявляють високу резистивність до апоптозу [6], яка, однак, не має відношення до Bcl-2 [80], а найімовірно зумовлена такими новими білками виживання, як сервівін (survivin) [81] і кластерин (clusterin) [82].

Андрогензалежні клітини пухлини простати лінії LNCaP являють собою зручну експериментальну модель для вивчення як Bcl-2-, так і нейроендокриннозумовленого фенотипів андрогеннечутливості та апопто-тичної резистивності завдяки створенню LNCaP-клонів зі стабільною надекспресією Bcl-2 [5] та можливості викликати нейро-

ендокринну диференціацію LNCaP-клітин за допомогою таких простих експери-ментальних прийомів, як підвищення в них вмісту цАМФ або андрогенна депривація [83, 84]. У наших власних дослідженнях змін кальцієвого гомеостазу Bcl-2-надекспресуючих (LNCaP/Bcl-2) [68] і нейроендо-криннодиференційованих (NE-LNCaP) [85] LNCaP-клітин вдалося встановити не тільки незалежність цих змін від конкретного механізму апоптотичної резистивності, але і спільність молекулярних перебудов, які лежать в їх основі. Головними характеристиками кальцієвого гомеостазу LNCaP/Bcl-2 і NE-LNCaP-клітин порівняно зі звичайними андрогензалежними LNCaP-клітинами були: знижений рівень базального наповнення ER Ca²⁺-пулу та зменшення ER пулзалежного кальцієвого входу. Ці зміни супроводжувалися підвищеною резистив-ністю до TG- та TNF- α -індукованого апоптозу зі збільшенням пріоритетності входу Ca²⁺ перед спустошенням ER-депо у активації апоптозу [68, 85] порівняно з контрольними андрогензалежними LNCaP-клітинами [37, 38]. Перехід від переважної ER стресзалежності до кальцієвої вхідзалежності апоптозу при набутті андроген-нечутливості добре узгоджується з ранніми даними з вивчення апоптозу, викликаного андрогенною депривацією [27, 29] та з більшістю даних, одержаних на андроген-нечутливих лініях клітин пухлини простати [35, 36], свідчаючи про те, що такий перехід являє собою загальну характеристику андрогеннезалежності незалежно від того, якими конкретно антиапоптотичними меха-нізмами вона може супроводжуватись.

Хронічне недонаповнення ER кальціє-вого пулу в LNCaP/Bcl-2 і NE-LNCaP-клі-тинах виявилось результатом посиленого пасивного виходу Ca²⁺ з ER, супроводжу-ваного недоекспресією люмінального каль-ційзв'язувального білка калретикуліну та ізоформи SRCA2b кальцієвої помпи, тоді як зниження SOCE було пов'язане зі

зменшення кількості функціональних SOC-каналів [68, 85]. Таким чином, з усіх кальційманіпулюючих білків, на які вплинув перехід до андрогеннечутливості, тільки калретикулін представляє андрогенвідповідальний ген у простаті [31–33]. З огляду на це, здається ймовірним, що саме недоекспресія калретикуліну та відповідне зменшення кальційзберігаючої ємності EP є першопричиною зменшення ролі EP стресопосередкованого апоптозного шляху та пов'язаного з цим загального посилення здатності андрогеннезалежних клітин до виживання. Дійсно, андрогенна депривація дозволяє вижити тільки тим клітинам, для яких недоповнений EP завдяки зниженню його зберігаючої здатності, що супроводжується адаптивним посиленням втрат, зменшенням поглинання (недоекспресія SERCA-помпи) та можливості до перезаповнення (недоекспресія SOC-каналів) є новим рівнем рівноваги. Такі клітини виявляються повністю резистивними до EP-стресопосередкованому апоптозу, який в результаті зможе бути запущений тільки через цитоплазматичні або мітохондріальні механізми, залежні від кальцієвого входу.

Молекулярна основа для посилення кальцієвих втрат з EP в андрогеннезалежних клітинах RP залишається поки нез'ясованою. Це може бути результатом збільшення активності або густини передбачуваних каналів втрат на роль яких запропонований транслокон [64, 65], або зумовлюватися каналоутворювальною функцією EP-локалізованих представників родини Bcl-2 білків, можливість якої, принаймні для самого Bcl-2 була продемонстрована [86]. Проте зазначити, що призначення Bcl-2 у контролі наповнення EP є досить контроверсійним з приблизно однаковою кількістю робіт, в яких показано зниження або підвищення кальцієвого вмісту EP внаслідок надекспресії Bcl-2 [24]. На додаток до можливого внеску у втрати Ca^{2+} з EP, що ще більше сприяє усуненню

EP-стресопосередкованого апоптозного шляху, надекспресія Bcl-2 в андрогеннечутливих клітинах RP протидіє апоптозу також через свою більш звичну мітохондріальну дію, яка залежить від входу Ca^{2+} , що разом призводить до суттєвого сумарного антиапоптотичного ефекту.

Незважаючи на те, що за даними досліджень [51, 52], у клітинах LNCaP вже три представники TRP родини іонних каналів – TRPC1, TRPC4 та TRPV6 були запропоновані як молекулярні прототипи ендогенних простатспецифічних SOC. Ці дані є поки недостатніми для судження про справжню молекулярну організацію SOC і, тим більше, про її зміну, що лежить в основі зниження SOCE під час набуття андрогеннезалежності. Той факт, що експресія TRPV6 у клітинах LNCaP посилюється у відповідь на фармакологічну блокаду AP [52, 54] потенційно робить цього TRP-представника важливим гравцем в апоптозі, але таке зростання погано узгоджується з показаним зниженням SOCE та I_{SOC} в андрогеннезалежних LNCaP/Bcl-2 та NE-LNCaP клітинах [68, 85]. Щодо зниження SOCE, належить також з'ясувати роль IP_3 -рецепторів, адже воно може бути також пов'язане зі змінами у взаємодії IP_3R та SOC, яка за деякими моделями вважається необхідною для активації SOC каналів [60]. Дійсно, є дані, що надекспресія антиапоптотичного Bcl-x_L білка а також вивільнення Cyt-c, може безпосередньо впливати на IP_3R [62, 63], що свідчить про можливий внесок непрямих механізмів у пригнічення I_{SOC} . У всякому разі, зменшення SOCE та I_{SOC} в андрогеннечутливих клітинах RP суттєво вразить також мітохондріальні та цитоплазматичні кальційзалежні апоптотичні шляхи.

Відомо, що експресія TRPV6 є вітамін D-залежною [87]. Це означає, що TRPV6 може відігравати важливу роль в проапоптотичній дії лігандів вітамін D рецептора на клітини RP [88]. Було показано, що,

діючи саме через рецептор вітаміну D, ці ліганди здатні пригнічувати експресію білків Bcl-2 родини та стимулювати вивільнення Cyt-c у лініях клітин пухлини простати LNCaP та ALVA-31 [88]. Можливо, що в цьому разі саме TRPV6 сприяє забезпеченню кальцієвого входу, необхідного для “переключення мітохондріальної проникності”, яка призводить до вивільнення Cyt-c.

Відзнакою нейроендокринних клітин простати є те, що вони в своїй плазматичній мембрані експресують типи іонних каналів, характерні для збудливих клітин [89]. Зокрема, однією з рис нейроендокринної диференціації клітин LNCaP є сильна надекспресія в них потенціалкерowanego кальцієвого каналу T-типу, представленого його $\alpha 1H$ -ізоформою [84]. Вважається, що цей канал, забезпечуючи стаціонарний вхід Ca^{2+} при потенціалах спокою сприяє розвитку нейроноподібних морфологічних характеристик нейроендокринних клітин (тобто росту нейритів), однак наскільки він залучений у механізми підвищення апоптотичної резистивності поки залишається не з'ясованим.

ВИСНОВКИ

Незважаючи на те, що дослідження останніх років дозволили більше зрозуміти кальційзалежність апоптозу клітин РП, багато питань усе ще чекають на свою відповідь. Зокрема, не з'ясовано, яким чином досягається специфічність кальцієвої сигналізації при апоптозі. Відомо, що різноманітні клітинні процеси залежать від специфічних просторових та часових характеристик кальцієвих сигналів [90], однак їх організація під час запрограмованої загибелі клітин РП залишається невивченою. Тому первинні клітини РП, які зберігають свою структурну поляризацію, вимагають більшого дослідження. Встановлення молекулярної природи каналів втрат EP і депозалежних каналів плазматичної мембрани, а також виявлення меха-

нізмів їх активації та андрогензалежності експресії є важливим для вироблення способів контролю апоптотичного статусу клітин РП. Роль IP_3R в апоптозі клітин пухлини простати також потребує подальшого вивчення. Безсумнівно, майбутні дослідження в цих напрямках не тільки збагатять наші знання, а і дозволять ідентифікувати нові молекулярні мішені для терапії РП.

Ya.M. Shuba¹, N. Prevars'ka², R. Skryma.

CALCIUM-DEPENDENCE OF PROGRAMMED CELL DEATH IN PROSTATE CANCER

In the present review we describe the major molecular determinants of calcium homeostasis in prostate cancer cells and establish their role in the transformation to apoptosis-resistant cell phenotypes typical of advanced androgen-independent prostate cancer. We show that the hallmark of such transformation is complete loss of apoptosis pathway associated with endoplasmic reticulum calcium store depletion.

¹A.A. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

²Laboratory of Cell Physiology of Lil University of Sciences and Technology, France

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Abrahamsson P.A. Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate // *Endocr. Relat. Cancer* 6. – 1999. – P. 503–519.
2. Altnauer F., Conus S., Cavalli A. G. et al. Calpain-1 regulates Bax and subsequent Smac-dependent caspase-3 activation in neutrophil apoptosis // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**. – P. 5947–5957.
3. Annis M.G., Yethon J.A., Leber B. et al. There is more life and death than mitochondria: Bcl-2 proteins at the endoplasmic reticulum // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – **1644**. – P. 115–123.
4. Antonsson B., Martinou J.C. The Bcl-2 protein family // *Exp. Cell Res.* – 2000. – **256**. – P. 50–57.
5. Berridge M.J., Bootman M.D., Lipp P. Calcium – a life and death signal // *Nature.* – 1998. – **395**. – P. 645–648.
6. Birnbaumer L., Boulay G., Brown D. et al. Mechanism of capacitative Ca^{2+} entry (CCE): interaction between IP_3 receptor and TRP links the internal calcium storage compartment to plasma membrane CCE channels // *Recent Prog. Horm. Res.* – 2000. – **55**. – P. 127–161.
7. Bodding M., Fecher – Trost C., Flockerzi V. Store-operated Ca^{2+} current and TRPV6 channels in lymph node prostate cancer cells // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**. – P. 50872–50879.

8. Boehning D., Patterson R.L., Sedaghat L. et al. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis // *Nat. Cell Biol.* – 2003. – **5** – P.1051–1061.
9. Bonkhoff H. Neuroendocrine differentiation in human prostate cancer. Morphogenesis, proliferation and androgen receptor status // *Ann. Oncol.* – 2001. – **12**. – P.S141–S144.
10. Bootman M.D, Lipp P., Berridge M.J. The organisation and functions of local Ca^{2+} signals // *J. Cell Sci.* – 2001. – **114**. – P.2213–2222.
11. Bouillon R., Van Cromphaut S., Carmeliet G. Intestinal calcium absorption: Molecular vitamin D mediated mechanisms // *J. Cell Biochem.* – 2003. – **88**. – P.332–339.
12. Breckenridge D.G, Germain M., Mathai J.P. et al. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways // *Oncogene.* – 2003. – **22**. – P.8608–8618.
13. Camello C., Lomax R., Petersen O.H. et al. Calcium leak from intracellular stores – the enigma of calcium signalling // *Cell Calcium.* – 2002. – **32**. – P.355–361.
14. Catz S.D, Johnson J.L. BCL-2 in prostate cancer: a minireview // *Apoptosis.* – 2003. – **8**. – P. 29–37.
15. Clapham D.E., Runnels L.W., Strubing C. The TRP ion channel family // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2001. – **2**. – P.387–396.
16. Colombel M., Symmans F., Gil S. et al. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancers // *Amer. J. Pathol.* – 1993. – **143**. – P.390–400.
17. Connor J., Sawczuk I.S., Benson M.C. et al. Calcium channel antagonists delay regression of androgen-dependent tissues and suppress gene activity associated with cell death // *Prostate.* – 1988. – **13**. – P.119–130.
18. Distelhorst C.W., Shore G.C. Bcl-2 and calcium: controversy beneath the surface // *Oncogene.* – 2004. – **23**. – P. 2875–2880.
19. Feldman B.J., Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer // *Nat. Rev. Cancer.* – 2001. – **1**. – P.34–45.
20. Fixemer T, Remberger K., Bonkhoff H. Apoptosis resistance of neuroendocrine phenotypes in prostatic adenocarcinoma // *Prostate.* – 2002. – **53**. – P.118–123.
21. Fixemer T., Wissenbach U., Flockerzi V., Bonkhoff H. Expression of the Ca^{2+} -selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression // *Oncogene.* – 2003. – **22**. – P.7858–7861.
22. Furuya Y., Krajewski S., Epstein J.I. et al. Expression of bcl-2 and the progression of human and rodent prostatic cancers // *Clin. Cancer Res.* – 1996. – **2**. – P.389–398.
23. Furuya Y., Lundmo P., Short A.D. et al. The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin // *Cancer Res.* – 1994. – **54**. – P.6167–6175.
24. Gizatullina Z.Z., Grapengiesser E., Shabalina I.G. et al. Effect of transforming growth factor-beta on calcium homeostasis in prostate carcinoma cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – **304**. – P.643–649.
25. Gong Y., Blok L.J., Perry J.E. et al. Calcium regulation of androgen receptor expression in the human prostate cancer cell line LNCaP // *Endocrinology.* – 1995. – **136**. – P.2172–2178.
26. Guzey M., Kitada S., Reed J.C. Apoptosis induction by lalpha,25-dihydroxyvitamin D3 in prostate cancer // *Mol. Cancer Ther.* – 2002. – **1**. – P.667–677.
27. Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis // *Nature.* – 2000. – **407**. – P.770–776.
28. Hoth M., Penner R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells // *Ibid.* – 1992. – **355**. – P.353–356.
29. Huang Y.T., Chueh S.C., Teng C.M., Guh J.H. Investigation of ouabain-induced anticancer effect in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells // *Biochem. Pharmacol.* – 2004. – **67**. – P.727–733.
30. Humez S., Legrand G., Vanden-Abeeke F. et al. Role of endoplasmic reticulum calcium content in prostate cancer cell growth regulation by IGF and TNFalpha // *J. Cell Physiol.* – 2004. – in press.
31. Jayaraman T. Marks A.R. T cells deficient in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are resistant to apoptosis // *Mol. Cell Biol.* – 1997. – **17**. – P.3005–3012.
32. July L.V, Akbari M., Zellweger T. et al. Clusterin expression is significantly enhanced in prostate cancer cells following androgen withdrawal therapy // *Prostate.* – 2002. – **50**. – P.179–188.
33. Kim J.H, Shin S.Y., Yun S.S. et al. Voltage-dependent ion channel currents in putative neuroendocrine cells dissociated from the ventral prostate of rat // *Pflugers Arch.* – 2003. – **446**. – P. 88–99.
34. Kirichok Y., Krapivinsky G., Clapham D.E. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel // *Nature.* – 2004. – **427**. – P.360–364.
35. Krajewska M., Krajewski S., Epstein J.I. et al. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers // *Amer. J. Pathol.* – 1996. – **148**. – P.1567–1576.
36. Kroemer G, Reed J.C. Mitochondrial control of cell death // *Nat. Med.* – 2002. – **6**. – P.513–519.
37. Kyprianou N., English H.F., Isaacs J.T. Activation of a Ca^{2+} - Mg^{2+} -dependent endonuclease as an early event in castration-induced prostatic cell death // *Prostate.* – 1988. – **13**. – P.103–117.
38. Kyprianou N., English H.F., Isaacs J.T. Programmed cell death during regression of PC-82 human prostate cancer following androgen ablation // *Cancer Res.* – 1990. – **50**. – P.3748–3753.
39. Legrand G, Humez S., Slomianny C. et al. Ca^{2+} pools and cell growth. Evidence for sarcoendoplasmic Ca^{2+} -ATPases 2B involvement in human prostate cancer cell growth control // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**. – P.47608–47614.

40. Li C., Fox C.J., Master S.R. et al. Bcl-X affects Ca^{2+} homeostasis by altering expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – **99**. – P.9830–9835.
41. Mariot P., Prevarskaya N., Roudbaraki M.M. et al. Evidence of functional ryanodine receptor involved in apoptosis of prostate cancer (LNCaP) cells // *Prostate.* – 2000. – **43**. – P.205–214.
42. Mariot P., Vanoverbergh K., Lalevee N. et al. Overexpression of an alpha 1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**. – P.10824–10833.
43. Martikainen P., Isaacs J. Role of calcium in the programmed death of rat prostatic glandular cells // *Prostate.* – 1990. – **17**. – P.175–187.
44. Mayer B., Oberbauer R. Mitochondrial regulation of apoptosis // *News Physiol. Sci.* – 2003. – **18**. – P.89–94.
45. McConkey D.J., Lin Y., Nutt L.K. et al. Cardiac glycosides stimulate Ca^{2+} increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells // *Cancer Res.* – 2000. – **60**. – P.3807–3812.
46. McDonnell T.J., Troncoso P., Brisbay S.M. et al. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of a S.M. ndrogen-independent prostate cancer // *Cancer Res.* – 1992. – **52** – P.6940–6944.
47. Michalak M., Mariani P., Opas M. Calreticulin, a multifunctional Ca^{2+} binding chaperone of the endoplasmic reticulum // *Biochem. Cell Biol.* – 1998. – **76**. – P.779–785.
48. Minke B., Cook B. TRP channel proteins and signal transduction // *Physiol. Rev.* – 2002. – **82** – P.429–472.
49. Morishima N., Nakanishi K., Takenouchi H. et al. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12 // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**. – P.34287–34294.
50. Nakagawa T., Zhu H., Morishima N. et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta // *Nature.* – 2000. – **403**. – P.98–103.
51. Nicholson D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death // *Cell Death Differ.* – 1999. – **6**. – P.1028–1042.
52. Nigg E.A. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle // *Bioessays.* – 1995. – **17**. – P.471–480.
53. Nutt L.K., Chandra J., Pataer A. et al. Bax-mediated Ca^{2+} mobilization promotes cytochrome c release during apoptosis // *J. Biol. Chem.* – 2002 – **277**. – P.20301–20308.
54. Orrenius S., Zhivotovsky B., Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2003. – **4**. – P.552–565.
55. Peng J.B., Chen X.Z., Berger U.V. et al. Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption // *J. Biol. Chem.* – 1999. – **274**. – P.22739–22746.
56. Peng J.B., Zhuang L., Berger U.V. et al. CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – **282**. – P.729–734.
57. Pinton P., Ferrari D., Rapizzi E. et al. The Ca^{2+} concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action // *EMBO J.* – 2001. – **20**. – P.2690–2701.
58. Raffo A.J., Perlman H., Chen M.W. et al. Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo // *Cancer Res.* – 1995. – **55**. – P.4438–4445.
59. Rao R.V., Ellerby H.M., Bredesen D.E. Coupling endoplasmic reticulum to the cell death program // *Cell Death Differ.* – 2004. – **11**. – P.372–380.
60. Rao A., Luo G., Hogan P.G. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function // *Annu. Rev. Immunol.* – 1997. – **15**. – P.707–747.
61. Rizzuto R., Bernardi P., Pozzan T. Mitochondria as all-round players of the calcium game // *J Physiol.* – 2000. – **529**. – P.37–47.
62. Rizzuto R., Pinton P., Ferrari D. et al. Calcium and apoptosis: facts and hypotheses // *Oncogene.* – 2003. – **22**. – P.8619–8627.
63. Robertson J.D., Orrenius S., Zhivotovsky B. Review: nuclear events in apoptosis // *J. Struct. Biol.* – 2000. – **129**. – P.346–358.
64. Sant'Agnes P.A. Neuroendocrine cells of the prostate and neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: a review of morphologic aspects // *Urology.* – 1998. – **51**. – P.121–124.
65. Schendel S.L., Montal M., Reed J.C. Bcl-2 family proteins as ion-channels // *Cell Death Differ.* – 1998. – **5**. – P.372–380.
66. Schinzel A., Kaufmann T., Borner C. Bcl-2 family members: intracellular targeting, membrane-insertion, and changes in subcellular localization // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – **1644**. – P.95–105.
67. Skryma R., Mariot P., Bourhis X.L. et al. Store depletion and store-operated Ca^{2+} current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis // *J. Physiol.* – 2000. – **527**. – P.71–83.
68. Tombal B., Denmeade S.R., Gillis J.M., Isaacs J.T. A supramicromolar elevation of intracellular free calcium ($[Ca^{2+}]_i$) is consistently required to induce the execution phase of apoptosis // *Cell Death Differ.* – 2002. – **9**. – P.561–573.
69. Tombal B., Weeraratna A.T., Denmeade S.R., Isaacs J.T. Thapsigargin induces a calmodulin/calcieneurin-dependent apoptotic cascade responsible for the death of prostatic cancer cells // *Prostate.* – 2000. – **43**. – P.303–317.
70. Van Coppenolle F., Vanden Abeele F., Slomianny C. et

- al. Ribosome-translocon complex mediates calcium leak from the endoplasmic reticulum stores // *J. Cell Sci.* – 2004. – in press.
71. Vanden Abeele F., Roudbaraki M., Shuba Y. et al. Store-operated Ca^{2+} current in prostate cancer epithelial cells. Role of endogenous Ca^{2+} transporter type 1 // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**. – P.15381–15389.
 72. Vanden Abeele F., Skryma R., Shuba Y. et al. Bcl-2-dependent modulation of Ca^{2+} homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells // *Cancer Cell* . – 2002. – **1**. – P.169–179.
 73. Vanden Abeele F., Shuba Y., Roudbaraki M. et al. Store-operated Ca^{2+} channels in prostate cancer epithelial cells: function, regulation, and role in carcinogenesis // *Cell Calcium*. – 2003. – **33**. – P.357–373.
 74. Vanoverberghe K., Mariot P., Vanden Abeele F. et al. Mechanisms of ATP-induced calcium signaling and growth arrest in human prostate cancer cells // *Ibid.* – 2003. – **34**. – P.75–85.
 75. Vanoverberghe K., Vanden Abeele F., Mariot P. et al. Ca^{2+} homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells // *Cell Death Differ.* – 2004. – **11**. – P.321–330.
 76. Venkatachalam K., Van Rossum D.B., Patterson V. et al. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry // *Nat. Cell Biol.* – 2002. – **4**. – P.E263–E272.
 77. Vermassen E., Parys J.B., Mauger J.P. Subcellular distribution of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: functional relevance and molecular determinants // *Biol. Cell*. – 2004. – **96**. – P.3–17.
 78. Voets T., Nilius B. TRPs make sense // *J. Membr. Biol.* – 2003. – **192**. – P.1–8.
 79. Wang H.G., Pathan N., Ethell I.M. et al. Ca^{2+} -induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD // *Science*. – 1999. – **284**. – P.339–343.
 80. Wang Z., Tufts R., Haleem R., Cai X. Genes regulated by androgen in the rat ventral prostate // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1997. – **94**. – P.12999–13004.
 81. Wertz I.E., Dixit V.M. Characterization of calcium release-activated apoptosis of LNCaP prostate cancer cells // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **275**. – P.11470–11477.
 82. Westin P., Bergh A., Apoptosis and other mechanisms in androgen ablation treatment and androgen independent progression of prostate cancer: a review // *Cancer Detect. Prev.* – 1998. – **22**. – P.476–484.
 83. Wissenbach U., Niemeyer B.A., Fixemer T. et al. Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**. – P.19461–19468.
 84. Wuytack F., Raeymaekers L., Missiaen L. Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps // *Cell Calcium*. – 2002. – **32**. – P.279–305.
 85. Xing N., Qian J., Bostwick D. et al. Neuroendocrine cells in human prostate over-express the anti-apoptosis protein survivin // *Prostate*. – 2001. – **48**. – P.7–15.
 86. Xue Y, Verhofstad A., Lange W. et al. Prostatic neuroendocrine cells have a unique keratin expression pattern and do not express Bcl-2: cell kinetic features of neuroendocrine cells in the human prostate // *Amer. J. Pathol.* – 1997. – **151**. – P.1759–1765.
 87. Zelivianski S, Verni M., Moore C. et al. Multipathways for transdifferentiation of human prostate cancer cells into neuroendocrine-like phenotype // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2001. – **1539**. – P.28–43.
 88. Zhu N., Pewitt E.B., Cai X. et al. Calreticulin: an intracellular Ca^{2+} -binding protein abundantly expressed and regulated by androgen in prostatic epithelial cells // *Endocrinology*. – 1998. – **139**. – P.4337–4344.
 89. Zhu N., Wang Z. Calreticulin expression is associated with androgen regulation of the sensitivity to calcium ionophore-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells // *Cancer Res.* – 1999. – **59**. – P.1896–1902.
 90. Zimmermann K.C, Bonzon C., Green D.R. The machinery of programmed cell death // *Pharmacol. Ther.* 2001. – **92**. – P.57–70.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця та Міжнарод. центр молекуляр. фізіології НАН України, Київ; Лабораторія клітинної фізіології Лільського ун-ту наук та технологій, Франція

Матеріал надійшов до редакції 27.05.2004