

Received: 2012.05.14
Accepted: 2012.09.28
Published: 2012.11.22

Autofagia – mechanizm molekularny, apoptoza i nowotwory

Autophagy – molecular mechanism, apoptosis and cancer

Joanna Polewska

Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

Streszczenie

Autofagia jest procesem degradacji wielkocząsteczkowych składników cytoplazmy, zwłaszcza białek o długim okresie półtrwania oraz całych organelli. W komórkach eukariotycznych, spośród trzech postaci autofagii, najlepiej poznana jest makroautofagia. W czasie makroautofagii (zwanej dalej autofagią) fragment cytoplazmy zostaje otoczony przez formującą się podwójną błonę tworzącego się pęcherzyka, zwanego autofagosomem. Następnie zawartość autofagosomu po jego połączeniu się z lizosomem ulega degradacji.

Proces autofagii odpowiedzialny jest za utrzymanie wewnątrzkomórkowej homeostazy i umożliwia przeżycie komórkom w warunkach stresowych. Autofagia odgrywa również rolę w patogenezie wielu chorób, w tym w procesie nowotworzenia. W komórkach nowotworowych autofagia może pełnić dwojaką rolę, jako proces zaangażowany w przeżycie lub śmierć komórki. W większości przypadków, autofagia indukowana terapią w komórkach nowotworowych umożliwia im przeżycie, promując rozwój nowotworu i potencjalnie prowadząc do występowania oporności na leczenie. Autofagia może również pełnić rolę supresora transformacji nowotworowej i wywołując apoptozę, może zwiększać skuteczność leczenia. Dla powodzenia terapii przeciwnowotworowej istotne jest, aby określić typ komórek nowotworowych podatnych na autofagię w odpowiedzi na podjęty rodzaj leczenia oraz aby określić, czy w danym przypadku autofagia przyczynia się do skuteczności zastosowanej terapii, czy raczej do oporności na nią.

W pracy omówiono molekularny mechanizm autofagii oraz najważniejsze szlaki sygnałowe uczestniczące w regulacji przebiegu tego procesu w komórkach nowotworowych. Omówiona została również dwojaka rola autofagii w procesie nowotworzenia oraz skutki zarówno indukcji, jak i inhibicji autofagii w terapii przeciwnowotworowej.

Słowa kluczowe:

apoptoza • atofagia • autofagosom • makroautofagia • nowotwory

Summary

Autophagy is a catabolic process involving the degradation of long-lived proteins and organelles through the lysosomal machinery. In eukaryotic cells, among the three types of autophagy the most extensively studied is macroautophagy. Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is characterized by sequestration of bulk cytoplasm in double-membrane vesicles, called autophagosomes, which ultimately fuse with lysosomes, resulting in degradation of their contents.

Autophagy is responsible for the maintenance of intracellular homeostasis and enables cell survival under stress conditions. However, this process is also involved in the pathogenesis of diverse diseases, including cancers. In the cancer cell, autophagy plays a dual role, as a mechanism responsible for protecting or killing the cell. In most cases chemotherapy-induced autophagy in tumor cells is a prosurvival response which potentially leads to development of drug resistance. However, autophagy can also lead to cell death, thus enhancing treatment efficacy. It is important

for the anticancer therapy to find the type of cancer cells which are susceptible to autophagy and to determine whether the autophagy induced by the applied therapy leads to cells' death or their survival and subsequently to therapy resistance.

In this review, the molecular mechanism of macroautophagy and the most important signaling transduction pathways involved in regulation of this process in cancer cells are presented. The dual function of autophagy in tumorigenesis and the implications of autophagy modulation for cancer therapy are also discussed.

Key words: apoptosis • autophagy • autophagosome • cancer • macroautophagy

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1021109>

Word count: 6646

Tables: –

Figures: 8

References: 105

Adres autorki: dr inż. Joanna Polewska, Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Technologii Leków i Biochemii, ul. G. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk; e-mail: jpolewska@onet.eu

Wykaz skrótów: **AMBRA1** – białko aktywujące w autofagii regulowanej przez Beklinę 1 (activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy); **AMPK** – kinaza aktywowana AMP (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase); **ATG** – gen związany z autofagią (autophagy-related gene); **Barkor** – białko regulatorowe autofagii oddziałujące z Bekliną 1 (Beclin-1-associated autophagy-related key regulator); **BNIP3** – białko wiążące Bcl-2 i adenowirusowe białko E1B-19 kDa 3(Bcl-2/adenovirus E1B-19 kDa interacting protein 3); **CaMKKβ** – kinaza kalmodulinozależnej kinazy B (calmodulin-dependent protein kinase kinase β); **CMA** – autofagia zachodząca za pośrednictwem białek opiekuńczych – chaperonów (chaperon mediated autophagy); **CML** – przewlekła białaczka szpikowa (chronic myeloid leukemia); **DAPK-1** – kinaza białkowa związana ze śmiercią (death associated protein kinase 1); **DED** – wykonawcza domena śmierci (death execution domain); **DEPTOR** – białko zawierające domeny DEP oddziałujące z kinazą mTOR (DEP domain-containing mTOR-interacting protein); **DRAM** – modulator autofagii regulowany uszkodzeniami (damage-regulated autophagy modulator); **FIP200** – białko wchodzące w skład kompleksu uczestniczącego w inicjacji autofagii (focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa); **FLIP** – białko hamujące FLICE/kaspazę 8 (FADD-like interleukin-1β-converting enzyme-like protease (FLICE/caspase-8)-inhibitory protein); **GABARAP** – białko towarzyszące receptorowi kwasu γ-aminomasłowego typu A (γ-aminobutyric acid type A receptor-associated protein); **GATE-16** – białko uczestniczące w transporcie białek wewnątrz aparatu Golgiego (Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa); **HIF-1α** – czynnik transkrypcyjny indukowany niedotlenieniem (hypoxia-inducible factor 1α); **HDM2** – ludzkie białko MDM2 (human double minute); **Hsp** – białko szoku termicznego (heat shock protein); **HtrA2/Omi** – proteaza serynowa, antagonistka białka hamującego apoptozę IAPs (high-temperature requirement serine protease A2); **JNK1** – kinaza N-końca białka c-Jun (c-JUN NH2-terminal kinase 1); **Lamp2a** – białko związane z błoną lizosomu (lysosomal-associated membrane protein 2a); **LKB1/GβL** – białko podobne do podjednostki β białka G (G protein β-subunit like protein); **MAP I LC3** – białko związane z mikrotubulami (microtubule-associated protein I light chain 3); **mSIN1** – ssące białko oddziałujące z białkową kinazą aktywowaną stresem (mammalian stress-activated protein kinase-interacting protein 1); **mTOR** – ssaczy cel rapamycyny, kinaza mTOR (mammalian target of rapamycin); **MyD88** – czynnik 88 różnicowania białaczki szpikowej (myeloid differentiation factor 88); **PCD II** – programowana śmierć typu II (programmed cell death type II); **PK1** – kinaza białkowa zależna od fosfatydyloinozytolu (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1); **PE** – fosfatydyletanolamina (phosphatidylethanolamine); **PI3K** – kinaza trifosforanofosfatydyloinozytolu (phosphoinositide 3-kinase); **PKB/Akt** – białkowa kinaza B (protein kinase B); **PRAS40** – białko wchodzące w skład kompleksu mTORC1 (proline-rich PKB/Akt substrate 40-kDa); **Protor** – białko wchodzące w skład kompleksu mTORC2 (protein observed with rictor); **PTEN** – białko wykazujące podwójną aktywność fosfatazy białkowej i fosfatazy lipidowej (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten); **Raptor** – białko regulatorowe

związane z mTOR (Regulatory associated protein of mTOR); **Rheb** – homolog białka Ras wiążący GTP (Ras homolog enriched in brain); **Rictor** – białko niewrażliwe na rapamycynę towarzyszące mTOR (rapamycin-insensitive companion of mTOR); **RTK** – receptorowa kinaza tyrozynowa (receptor tyrosine kinase); **Rubicon** – białko oddziałujące z Bekliną 1 (RUN domain and cysteine-rich domain containing, Beclin1-interacting protein); **Smac/DIABLO** – drugi mitochondrialny czynnik aktywujący kaspazy (second mitochondrial activator of caspase); **TORC1/2** – kompleks 1/2 kinazy mTOR (target of rapamycin complex 1/2); **TP53INP2** – białko jądrowe indukowane przez p53 (tumor protein 53-induced nuclear protein 2); **TSC1** – hemartyna (tuberous sclerosis complex 1); **TSC2** – tuberyna (tuberous sclerosis complex 2); **ULK1** – kinaza serynowo-treoninowa, uczestnicząca w inicjacji autofagii (uncoordinated-51-like kinase-1); **UVRAG** – białko oddziałujące z Bekliną 1, promujące autofagię (UV irradiation resistance-associated gene); **VMP1** – białko błonowe wakuol (vacuole membrane protein 1); **Vps34** – kinaza białkowa 34 (vacuolar protein sorting 34); **wt** – typ dziki (wild type).

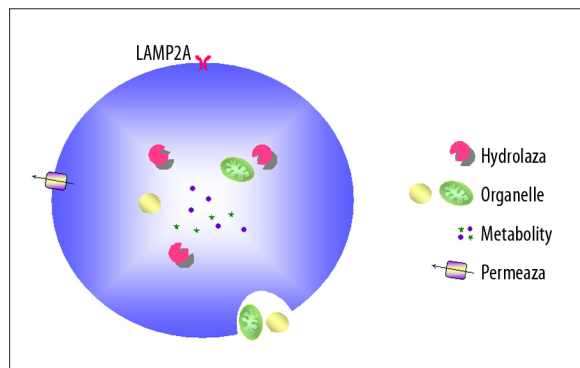
AUTOFAGIA – WSTĘP

Autofagia jest ewolucyjnie konserwatywnym i bardzo starym procesem, wspólnym dla wszystkich komórek organizmów eukariotycznych, od jednokomórkowych drożdży do wielokomórkowych ssaków. Ten katabolizujący proces znany jest przede wszystkim jako wewnątrzkomórkowy system degradacji wielkocząsteczkowych składników cytoplazmy, szczególnie białek o długim okresie półtrwania oraz całych organelli [46,55]. Gdy strawieniu ulega część cytoplazmy, w celu zachowania równowagi w jej wielkości i składzie, autofagię określa się mianem nieselektywnej. O autofagii selektywnej (specyficznej) mówimy natomiast wtedy, gdy dochodzi do degradacji ściśle określonych struktur, takich jak: agregaty białek – agrefagia (aggrephagy), mitochondria – mitofagia (mitophagy), retikulum endoplazmatyczne – retikulofagia (reticulophagy), rybosomy – rybofagia (ribophagy), peroksyosomy – peksofagia (pexophagy) oraz bakterii i wirusów – ksenofagia (xenophagy) [61].

Proces autofagii indukowany jest na podstawowym poziomie w większości komórek, gdzie spełnia następujące funkcje:

- jest mechanizmem adaptacyjnym do warunków stresowych, zapewniającym dopływ substancji odżywczych niezbędnych do podtrzymania najważniejszych procesów życiowych, kosztem mniej ważnych w danej chwili składników komórki;
- pozwala na zachowanie homeostazy wewnątrzkomórkowej, uczestnicząc w procesie usuwania zbędnych lub uszkodzonych organelli oraz regulując wielkość siateczki śródplazmatycznej;
- bierze udział w procesach swoistych tkankowo, takich jak: proces dojrzewania erytrocytów, wewnątrzkomórkowa biogeneza surfaktantu na powierzchni pneumocytów, biosynteza neurolaminy w dopaminergicznym neuronach [46];
- chroni organizm przed namnożeniem wielu bakterii i wirusów [49,99];
- uczestniczy w fizjologicznych procesach rozwojowych, np. sporulacji u drożdży, rozwoju poczwarki *Drosophila melanogaster* [99].

W zależności od tego, w jaki sposób substrat dostarczony jest do lizosomów, wyróżniono trzy podstawowe postaci autofagii: mikroautofagię, autofagię zależną od białek opiekuńczych – chaperonów (CMA) oraz makroautofagię.



Ryc. 1. Mikroautofagia

Mikroautofagia

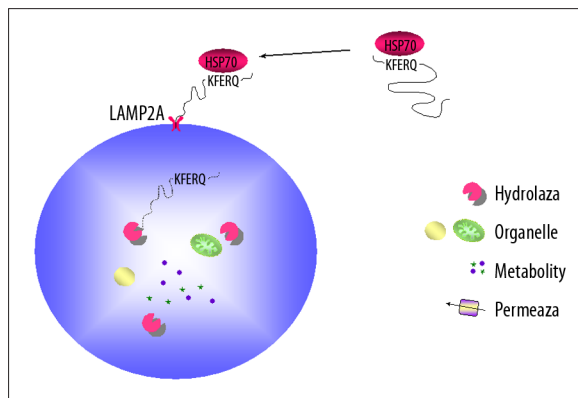
Mikroautofagia (ryc. 1) jest najmniej poznana postacią autofagii. W trakcie tego procesu fragment cytoplazmy, wraz z zawartymi w niej rozpuszczalnymi białkami lub organellami, zostaje otoczony przez błonę lizosomalną i za pośrednictwem endocytozy, wnika do wnętrza lizosomów [70].

Autofagia zależna od białek opiekuńczych – chaperonów

W czasie autofagii zależnej od białek opiekuńczych – chaperonów (ryc. 2), wybrane białka cytosolowe mające ulec degradacji, transportowane są do wnętrza lizosomów dzięki obecności na ich błonie odpowiednich receptorów. Receptor rozpoznaje i wiąże kompleks chaperon-substrat, a drugie białko opiekuńcze obecne wewnątrz lizosomu, umożliwia translokację substratu [46,55]. Unikalną cechą tego procesu jest to, że każde substratowe białko zawiera w swojej sekwencji aminokwasowej motyw KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln), który pełni funkcję sekwencji kierującej do lizosomu. W cytoplazmie sekwencja ta rozpoznawana jest przez białko szoku termicznego o masie 73 kDa – hsc73, które należy do rodziny białek opiekuńczych hsp70. Utworzony zostaje kompleks substrat/hsp73, następnie białko chaperonowe łączy się z receptorem Lamp2a znajdującym się na błonie lizosomu. Dostarczony w ten sposób substrat po rozpleceniu transportowany jest do wnętrza lizosomu, gdzie ulega hydrolizie [3,18,19,45].

Makroautofagia

Makroautofagia (ryc. 3) jest najpowszechniej występującą postacią autofagii. W czasie makroautofagii fragment



Ryc. 2. Autofagia zależna od białek opiekuńczych – chaperonów

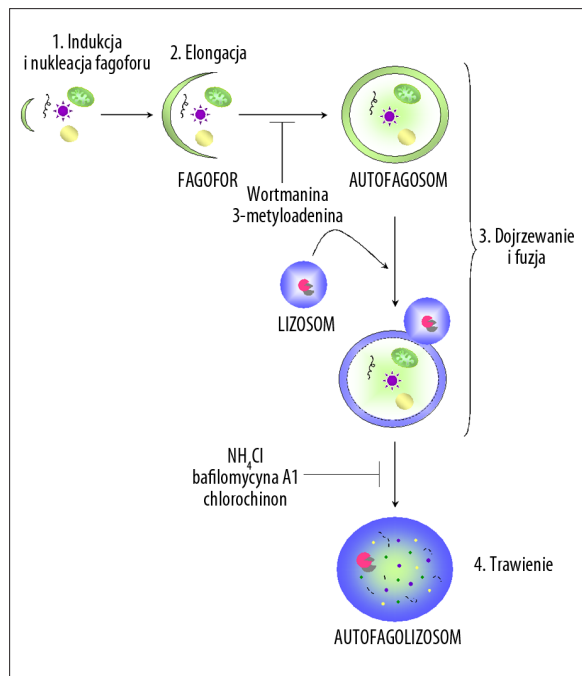
cytoplazmy zostaje otoczony przez formującą się podwójną błonę, kształtem przypominającym literę C, nazywaną błoną izolującą bądź fagoforem (phagophore). Oba końce fagoforu wydłużają się, zamykając w swym wnętrzu część cytoplazmy wraz z białkami (o długim okresie półtrwania) lub całymi organellami. Tak utworzony pęcherzyk o wielkości 300–900 nm, nazywany autofagosomem, podlega następnie procesowi dojrzewania. W trakcie dojrzewania dochodzi do fuzji autofagosomów z lizosomami, co prowadzi do powstania autofagolizosomów. To właśnie w tych strukturach zachodzi proces degradacji wielkocząsteczkowych substratów do ich podstawowych składników, jakimi są aminokwasy oraz kwasy tłuszczowe z użyciem lizosomalnych enzymów hydrolitycznych [52,55,68].

Spośród trzech postaci autofagii – makroautofagia jest procesem najczęściej spotykanym w komórkach i to jej poświęca się największą uwagę. Dlatego też przedstawione niżej rozważania dotyczą makroautofagii, określanej dla uproszczenia terminem „autofagia”.

MOLEKULARNY MECHANIZM AUTOFAGII

Zmiany morfologiczne towarzyszące autofagii zostały po raz pierwszy scharakteryzowane w komórkach ssaczych prawie 50 lat temu. Natomiast molekularny mechanizm tego procesu został wyjaśniony dzięki zastosowaniu badań z wykorzystaniem mutagenyzy w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Późniejsze odkrycie genów zaangażowanych w regulację autofagii u ssaków było możliwe dzięki ich dużej homologii z odpowiadającymi im genami u drożdży. Jednocześnie zaproponowano ujednoczone nazewnictwo genów, których produkty kontrolują proces autofagii, oznaczając je skrótowo *ATG* oraz cyfrą porządkową.

Występujące w komórkach ssaków i uczestniczące w autofagii białka Atg można zgrupować w cztery kompleksy. Pierwszy, składający się z białkowych kinaz serynowo-treoninowych Atg1/ULK1/2, regulowany jest aktywnością kinazy TOR (u ssaków – mTOR) [71]. Drugi kompleks, PI3K/Vps34, złożony jest z lipidowych kinaz i pośredniczy w nukleacji pęcherzyków. Trzeci i czwarty kompleks stanowią dwa ubikwitynopodobne systemy koniugacyjne Atg12-Atg5 oraz Atg8-PE, które pośredniczą we wzroście pęcherzyków. Ponadto w proces powstawania autofagosomów zaangażowane są dwa przezbłonowe białka Atg9/mAtg9 oraz VMP1, uczestniczące w recyrkulacji białek Atg.



Ryc. 3. Makroautofagia

Tworzenie autofagosomów w komórce może zostać zapoczątkowane w odpowiedzi na różnorodne zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe czynniki stresowe, takie jak: deficyt aminokwasów i innych składników odżywczych, agregacja nieprawidłowo pofałdowanych białek, akumulacja uszkodzonych organelli, hipoksja czy też aktywacja onkogenów. Bez względu na rodzaj czynnika indukującego, w procesie autofagii można wyróżnić następujące etapy (ryc. 3):

1. Powstawanie autofagosomu – indukcja, nukleacja, elongacja,
2. Fuzja autofagosomu z lizosomem – dojrzewanie,
3. Degradacja – trawienie.

Powstawanie autofagosomu

Indukcja – kompleks Atg13-Atg1/ULK1/2-Atg17

Za zapoczątkowanie tworzenia autofagosomu u drożdży odpowiedzialna jest kinaza serynowo-treoninowa Atg1, wchodząca w skład kompleksu Atg1: Atg13: Atg17. Zdolność do łączenia się białek w tym kompleksie zależna jest od stanu ufosforylowania białka Atg13, który z kolei regulowany jest przez kompleks białka TOR (TORC). Inaktywacja TORC prowadzi do defosforylacji Atg13, wzrostu jego powinowactwa do białek Atg1 oraz Atg17, a tym samym do indukcji tworzenia błon izolujących [100].

Ssaczy odpowiednik kompleksu Atg1: Atg13: Atg17 składa się z homologicznej do Atg1 serynowo-treoninowej kinazy ULK1 i/lub prawdopodobnie ULK2, białka FIP200 (homolog drożdżowego Atg17), ssaczego odpowiednika białka Atg13 (mAtg13) oraz białka Atg101. Białko Atg101 umiejscowione jest na fagoforze i stabilizuje ekspresję oraz podstawowy poziom ufosforylowania białek Atg13 i ULK1 [34, 69]. Białko FIP200 z kolei jest istotne dla stabilizacji i fosforylacji białka ULK1 [30].

Etap inicjacji autofagii zarówno w komórkach drożdży, jak i ssaków regulowany jest głównie aktywnością kinazy TOR (u ssaków-mTOR). Wysoce zakonserwowana serynowo/treoninowa kinaza TOR jest dużym białkiem o masie 280 kDa, należącym do kinaz białkowych zbliżonych do kinazy fosfatydylo-3-inozytolu. Rola, jaką spełnia kinaza TOR w komórkach eukariontów obejmuje regulację transkrypcji, translacji, metabolizmu, progresji cyklu komórkowego oraz autofagii. Białko TOR jest swojego rodzaju „czujnikiem” komórkowego poziomu czynników wzrostowych, związków energetycznych oraz składników odżywczych [77].

W komórkach ssaków kinaza mTOR funkcjonuje jako katalityczna podjednostka w dwóch różnych kompleksach białkowych: mTORC1 i mTORC2. Oba kompleksy wykazują strukturalne podobieństwo, ale pełnią w komórce różne funkcje. W komórkach ssaków niewrażliwy na rapamycynę kompleks mTORC2 składa się z białek: mLST8, rictor, mSIN1, DEPTOR i protor. Uczestniczy on w regulacji cytoszkieletu aktywnego oraz kinazy Akt/PKB. Kompleks mTORC1 składa się z białek mLST8 (GβL), PRAS40, DEPTOR i raptor. Kompleks ten kontroluje syntezę białek (z udziałem kinazy p70S6 i białka 4E-BP1), import substancji odżywczych oraz autofagię [22,39,100]. Aktywność kompleksu mTORC1 regulowana jest przez wiele sygnałów, m.in. czynniki wzrostu, insulinę, poziom składników odżywczych i energetycznych oraz czynniki stresogenne, takie jak: hipoksja, stres osmotyczny, reaktywne formy tlenu oraz infekcje wirusowe.

Indukcja autofagii związana jest z regulacją aktywności kompleksu mTORC1. W warunkach stresowych aktywny kompleks mTORC1 połączony jest z kompleksem ULK1/2: Atg13: FIP200. Białko mAtg13 w takim połączeniu występuje w postaci nadmiernie ufosforylowanej i wykazuje niewielkie powinowactwo do ULK1/2. Natomiast podczas głodzenia, hipoksji czy też niedoboru czynników wzrostu nieaktywny kompleks mTORC1 oddysocjuje, a białka mAtg13 oraz ULK1/2 ulegają defosforylacji. Zaktywowane białko ULK1/2 fosforyluje białka mAtg13 oraz FIP200 [39,68,75,100], co zapoczątkowuje tworzenie autofagosomu.

Nukleacja – kompleks PI3K/Vps34

Na etapie nukleacji, czyli we wczesnym stadium powstawania fagoforu, istotną rolę spełnia kompleks, w skład którego wchodzi kinaza fosfatydyloinozytolu klasy III – PI3K (u drożdży Vps34). Aktywność kinazy PI3K jest najważniejsza w dostarczeniu fosfolipidu, trifosforanu fosfatydyloinozytolu (PI3P, PtdIns3P), w miejsce tworzenia błon izolujących. Fosfolipid PI3P powstaje wówczas, gdy kinaza PI3K połączy się wcześniej z Bekliną 1 (u drożdży Atg6) oraz kinazą serynową p150 (Vps15). Mimo że dokładny mechanizm nie jest znany, wiadomo, że rdzeń tego kompleksu umiejscowiony jest na fagoforze i uczestniczy w rekrutacji kolejnych białek z rodziny Atg, niezbędnych do przebiegu dalszych etapów powstawania autofagosomu.

Aktywność kompleksu Beklina 1: PI3K: p150 i tworzenie fosfolipidu PI3P są ściśle regulowane przez białka oddziałujące z Bekliną 1. Do pozytywnych regulatorów kompleksu Beklina 1: PI3K: p150, a tym samym autofagii, zalicza się białka:

- Atg14L/Barkor – istotne dla etapu powstawania autofagosomu [66,87,104];
- UVRAG (homolog drożdżowego Vsp38), które w znaczący sposób podwyższa aktywność kinazy PI3K [95] oraz uczestniczy w etapie dojrzewania autofagosomu i w szlaku endocytarnym [37,60]. Białka UVRAG oraz Atg14L współzawodniczą o miejsce wiązania do kinazy PI3K [8];
- VMP1;
- AMBRA1 [25];
- MyD88 [17,52,68,100].

Do negatywnych regulatorów kompleksu Beklina 1: PI3K: p150 zalicza się m.in. białko Rubicon regulujące proces dojrzewania autofagosomu i szlak endocytarny oraz białka należące do rodziny Bcl-2 [13, 104].

Elongacja – systemy koniugacyjne

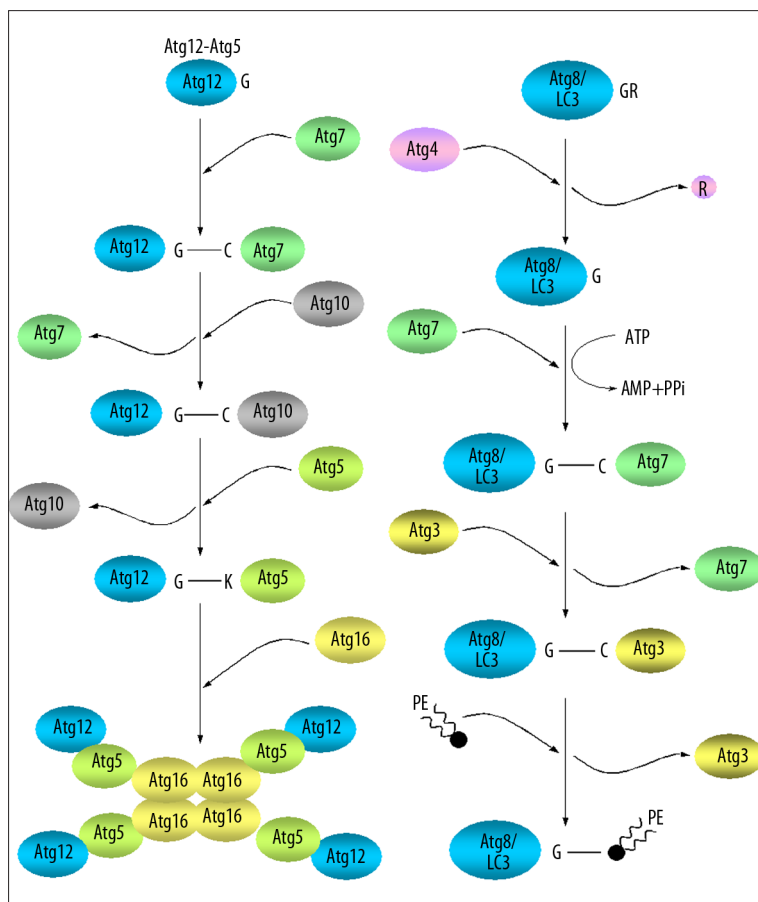
Białkowe produkty genów *ATG* tworzą dwa skoniugowane ze sobą systemy Atg12-Atg5-Atg16L oraz Atg8-PE (ryc.4), przypominające systemy przyłączające ubikwitynę do białek przeznaczonych do proteasomalnej degradacji. Oba systemy są niezbędne do prawidłowego przebiegu etapu elongacji fagoforu.

Kompleks Atg12-Atg5-Atg16L – tworzenie i wydłużanie fagoforu

W tworzeniu pierwszego systemu koniugacyjnego, Atg5-Atg12-Atg16L (ryc. 4) uczestniczą białka Atg: 5, 7, 10, 12 i Atg16. Produkt genu *Atg12* jest małym 186-aminokwasowym, hydrofilowym białkiem, które poprzez wiązanie kowalencyjne łączy się z białkiem Atg5. Proces tworzenia kompleksu Atg12-Atg5 rozpoczyna się od ATP-zależnej aktywacji białka Atg12 przez białko Atg7 (pełniące podobną funkcję jak enzym E1 aktywujący ubikwitynę). W wyniku jego działania, poprzez wiązanie tioestrowe między C-końcówką glicyną białka Atg12, a cysteiną białka Atg7 tworzy się kompleks przejściowy. Następnie Atg12 przenoszone jest na białko Atg10 (działające podobnie do enzymu koniugacyjnego E2), z którym łączy się wiązaniem tioestrowym między C-końcówką glicyną, a cysteiną białka Atg10. Ostatecznie białko Atg12 zostaje połączone wiązaniem amidowym ze 149 lizyną białka Atg5, poprzez wspomnianą C-końcówką glicynę. Połączenie to jest nieodwracalne, i jak dotąd nie jest znana żadna proteaza rozcinająca wiązanie między tymi dwoma białkami [65,99]. W komórkach wielu tkanek oraz linii komórkowych białka Atg12 oraz Atg5 występują w postaci kompleksu [89].

W kolejnym etapie do kompleksu Atg12-Atg5 zostaje przyłączone białko Atg16L, poprzez utworzenie niekowalencyjnego wiązania z białkiem Atg5. Nowo powstały kompleks Atg12-Atg5-(Atg16L)_n oligomeryzuje, tworząc wielocząonowe struktury o masie ~350 kDa u drożdży i ~800 kDa u ssaków, które są niezbędne do elongacji błony izolującej [100].

Kompleks Atg12-Atg5-(Atg16L)_n początkowo równomiernie związany jest z formującą się w kształcie półksiężyca błoną izolującą (crescent-shaped vesicle). Jednak w miarę jej wydłużania, większość białek tego kompleksu ulega asymetrycznemu przesunięciu na jej zewnętrzną powierzchnię.



Ryc. 4. Systemy koniugacyjne biorące udział w przebiegu autofagii

Po uformowaniu dojrzałego autofagosomu, kompleks Atg5-Atg12-(Atg16)_n oddysocjowuje od tworzącej go błony.

Kompleks Atg8-PE

Kompleks Atg8/Aut7-PE (ryc. 4), odpowiedzialny za dynamikę błony autofagosomalnej, obecny jest w błonie izolującej – fagoforze, błonie autofagosomów oraz w błonie ciała autofagicznych. W tworzeniu drugiego systemu koniugacyjnego Atg8/Aut7-PE uczestniczą białka Atg 3, 4, 7 i 8 oraz fosfatydyloetanolina (PE). Proces ten rozpoczyna się od odcięcia od białka Atg8 pojedynczego aminokwasu – argininy (Arg, R), przez proteazę cysteinową – Atg4. Wyeksponowana w ten sposób na C-końcu białka Atg8 glicyna (Gly, G), tworzy wiązanie tioestrowe z cysteiną białka Atg7 (tego samego, który uczestniczy w powstawaniu kompleksu Atg12-Atg5). Prowadzi to do ATP-zależnej aktywacji białka Atg8, które w następnym etapie przenoszone jest na białko Atg3 (pełniące funkcję podobną do enzymu koniugacyjnego E2), z utworzeniem nowego wiązania tioestrowego między oboma białkami. W końcowym etapie, utworzone zostaje wiązanie amidowe pomiędzy C-końcową glicyną białka Atg8, a grupą aminową fosfatydyloetanolaminy – PE, co umożliwia wbudowanie białka Atg8 do autofagosomu. W odróżnieniu od kompleksu Atg12-Atg5, połączenie Atg8-PE jest odwracalne. Po utworzeniu dojrzałego autofagolizosomu wspomniana wcześniej proteaza Atg4 hydrolizuje wiązanie białko-fosfolipid, znajdujące się na zewnętrznej stronie autofagosomu, powiększając źródło cytosolowego białka Atg8 [65].

W wyniku opisanej wyżej kaskady zdarzeń z fagoforu powstaje w pełni ukształtowany, otoczony podwójną błoną pęcherzyk autofagosomu, który podlega następnie dojrzewaniu.

Ssacze homologi białka Atg8

W komórkach ssaków obecne są co najmniej trzy homologiczne białka Atg8: MAP I LC3, GABARAP i GATE-16 [40]. Białko GABARAP związane jest z receptorem GABA oraz cytoszkieletem i uważa się, że pośredniczy w endocytozie receptorowej; GATE-16 uczestniczy w transporcie białek wewnątrz aparatu Golgiego *in vitro*, natomiast białko MAP I LC 3 zostało początkowo wyizolowane jako białko związane z mikrotubulami [65]. Wszystkie trzy homologi Atg8 są modyfikowane przez ssacze białka Atg7 i Atg3, ale tylko MAP I LC3 jest obecne zarówno w strukturach preautofagosomalnych jak i w samych autofagosomach.

W komórce białko MAP I LC3 występuje w trzech postaciach: pro-LC3, LC3-I i LC3-II. Proces potranslacyjnego przekształcania białka pro-LC3 polega na odcięciu 22-aminokwasowego fragmentu na C-końcu przez ssaczy homolog występującej u drożdży cysteinowej proteazy Atg4 [48]. Gdy autofagia zostanie zainicjowana, tak utworzona cytoplazmatyczna postać LC3-I modyfikowana jest do postaci LC3-II przez przyłączenie fosfatydyloetanolaminy – PE, w wyniku reakcji katalizowanych przez ssacze Atg7 i Atg3. Białko LC3-I umiejscowione jest w cytoplazmie, natomiast LC3-II związane jest zarówno z zewnętrzną, jak i wewnętrzną warstwą błony autofagosomu [52,55,65,99].

Proteaza Atg4, odłączając lipid PE od znajdującego się na zewnętrznej stronie autofagosomu białka LC3-II, powiększa pulę cytosolową białka LC3-I [40]. Jednak znaczna ilość białka LC3-II degradowana jest przez enzymy lizosomalne [90].

Białko LC3 II jest jedynym znanym białkiem swoiście związanym z błonami izolującymi, autofagosomami i autofagolizosomami [11,32,99]. Konwersja białka LC3 I do postaci LC3 II jest dowodem na tworzenie się autofagosomów w komórce, a tym samym na indukcję autofagii. Poziom zaś białka LC3 II jest bezpośrednio skorelowany z ilością powstających autofagosomów. Białko LC3 w ssaczach występuje w trzech postaciach (LC3A, LC3B, LC3C), jednak to wzrost postaci LC3B-II koreluje ze zwiększaniem liczby autofagosomów. Dlatego też zalecane jest, aby w ocenie autofagii metodą immunoblottingu oznaczać właśnie tę postać białka [33,40,50].

Przezbłonowe białka Atg9/mAtg9 oraz VMP1

Białka mAtg9 (Atg9) oraz VMP1, to jak dotąd jedyne zidentyfikowane białka przezbłonowe uczestniczące w autofagii zachodzącej w komórkach ssaków. Ssacze białko mAtg9 umiejscowione jest na biegunie *trans* aparatu Golgiego i w błonie późnych endosomów. Przechodzi ono błonę sześciokrotnie, a jego N- i C-końce znajdują się po stronie cytosolowej. W czasie głodu bądź pod wpływem rapamycyny białko mAtg9 przemieszcza się do zewnętrznej błony autofagosomu w procesie zależnym od Ulk1. W oparciu o wiedzę na temat roli białka Atg9 u drożdży przypuszcza się, że u ssaków białko mAtg9 uczestniczy w dostarczaniu błon do tworzącego się autofagosomu [100].

VMP1 jest białkiem ssaczym, które nie ma swojego odpowiednika w komórkach drożdży. Lokalizacja VMP1 jest kontrowersyjna: w komórkach ssaków białko to obecne jest w błonie komórkowej oraz występuje wspólnie z LC3 i Bekliną 1 podczas indukcji autofagii; natomiast u ameby *Dictyostelium discoideum* homolog VMP1 obecny jest w retikulum endoplazmatycznym. Białko VMP1 oddziałuje z Bekliną 1, co jest istotne dla autofagii indukowanej przez nadmierne wytwarzanie omawianego białka. Ponadto, VMP1 najprawdopodobniej spełnia rolę białka przezbłonowego, które angażuje Beklinę 1 i PI3K klasy III w tworzenie fagoforu [100]. Potwierdzają to ostatnie rezultaty badań wykazujące, że białko TP53INP2 (oddziałujące z białkiem VMP1) jest niezbędne do przeniesienia Bekliny 1 i LC3 na autofagosom, przypuszczalnie w wyniku interakcji z VMP1 [100].

Fuzja autofagosomu z lizosomem – dojrzewanie i degradacja

Kiedy wydłużające się końce fagoforu, tworzą pęcherzyk zwany autofagosomem, kolejnym etapem w przebiegu autofagii jest połączenie autofagosomu z lizosomem. W rezultacie powstaje pęcherzyk otoczony pojedynczą błoną (autofagolizosom), w którym zachodzi ostateczny proces niszczenia jego zawartości, pod wpływem działania enzymów lizosomalnych.

W komórkach drożdży fuzja zewnętrznej błony autofagosomu z wodniczka wymaga zaangażowania kilku czynników,

które uczestniczą również w innych typach transportu z wykorzystaniem pęcherzyków (vesicular transport). Wśród nich można wymienić białka SNARE: Vam3, Vam7, Vti1 i Ykt6; białka NSF, SNAP, homologii GDI: Sec17, Sec18 i Sec19; białko należące do rodziny Rab – Ypt7 oraz białka należące do kompleksu Vps/HOPS klasy C: Ccz1 i Mon1 [49,99].

W komórkach ssaków proces łączenia autofagosomu z lizosomem jest bardziej skomplikowany, gdyż autofagosom ulega najpierw kilku etapom dojrzewania, w czasie którego łączy się z wczesnymi bądź późnymi endosomami. Rola endosomów w tym procesie polega na dostarczeniu zarówno składników mających ulec hydrolizie, jak i czynników niezbędnych do połączenia autofagosomu z lizosomem. Ponadto, endosomy obniżają pH wewnątrz pęcherzyka, stwarzając tym samym sprzyjające środowisko dla działania hydrolaz lizosomalnych [26].

Do prawidłowego przebiegu procesu dojrzewania niezbędna jest obecność białka LAMP-2 [88], monomerycznych GTPaz (Rab22, Rab24), ssaczach ortologów białek należących do rodziny SNARE oraz białka NSF [99], przy czym białko Rab7 jest głównym elementem w regulacji procesu dojrzewania autofagosomów. Nadekspresja dominujących negatywnych mutantów białka Rab7 powoduje zahamowanie fuzji między autofagosomami a późnymi endosomami/lizosomami [28].

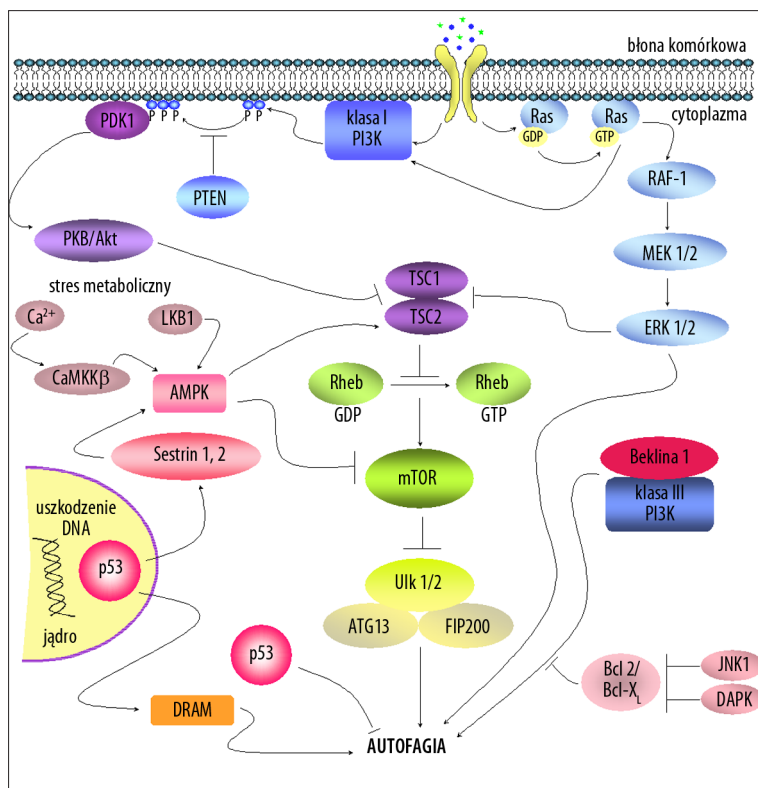
W procesie fuzji z endosomami, a następnie z lizosomami biorą również udział elementy cytoszkieletu. Inkubowanie komórek ze związkami powodującymi destabilizację mikrotubul powoduje zahamowanie dojrzewania autofagosomu. W komórkach traktowanych cytochalazyną D (związek hamujący polimeryzację aktyny) zaobserwowano znaczne obniżenie liczby tworzących się autofagosomów. Nokodazol (inhibitor dynamiki mikrotubul, hamuje polimeryzację tubuliny) blokuje fuzję autofagosomów z lizosomami, co wskazuje na udział mikrotubul w formowaniu autofagolizosomów [51]. Natomiast taksol (związek stabilizujący mikrotubule) zwiększa wydajność fuzji amfisosomów z lizosomami [65,99].

Pochodzenie błon tworzących autofagosom

Pierwszą rozpoznawalną w komórkach ssaków strukturą uczestniczącą w procesie autofagii jest błona izolująca, nazywana również fagoforem. Jak dotąd nie do końca wiadomo skąd pochodzą składniki budujące błonę fagoforu, a następnie autofagosomu w komórkach ssaków. Przyjmuje się, że w jego biogenezie uczestniczą składniki pochodzące z przynajmniej czterech źródeł: retikulum endoplazmatycznego [4,32], aparatu Golgiego [76], błony komórkowej [80] oraz zewnętrznej błony mitochondrium [29].

SZLAKI SYGNALIZACYJNE REGULUJĄCE AUTOFAGIĘ W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Regulacja autofagii w komórkach prawidłowych i zmienionych nowotworowo przebiega na podobnych zasadach, z tą jednak różnicą, iż w komórkach nowotworowych jest ona znacznie bardziej skomplikowana. Wynika to często ze zwiększonej aktywności kinazy fosfatydilinozytolu, PI3K, w komórkach nowotworowych oraz z wielu



Ryc. 5. Szlaki regulujące autofagię (na podstawie [100] zmodyfikowano)

różnorodnych interakcji pomiędzy szlakiem PI3K-Akt-mTOR a innymi wewnątrzkomórkowymi szlakami sygnałowymi, które równie często ulegają rozregulowaniu w komórkach nowotworowych.

Inhibicja autofagii na drodze PI3K-PKB/Akt-mTOR

W przypadku komórek nowotworowych często obserwuje się konstytutywną aktywację szlaku sygnalizacyjnego PI3K-Akt-mTOR (ryc. 5), co przyczynia się do zwiększenia przeżywalności tych komórek. Nieprawidłowa aktywacja tego szlaku może być wynikiem utraty supresora transformacji nowotworowej PTEN oraz kompleksu TSC1/TSC2, amplifikacji lub mutacji genów kodujących kinazy PI3K klasy I, nadekspresji PKB/Akt, ekspozycji na kancerogeny, czy też zwiększonej aktywności receptorowych kinaz tyrozynowych. W konsekwencji prowadzi to do supresji autofagii, a także do indukcji translacji białek, wzrostu komórek i ich proliferacji, co jest ważną siłą napędową w procesie nowotworzenia [16].

Aktywność kinazy serynowo-treoninowej mTOR jest odpowiednią na sygnały pochodzące z aktywowanych receptorów błonowych i sygnałów związanych ze zmianami stężenia składników odżywczych (aminokwasy) czy też czynników wzrostu (insulina, IGF). Szlak, który m.in. prowadzi do aktywacji kinazy mTOR, a tym samym do inhibicji autofagii, należy do szlaków sygnałowych związanych z aktywnością receptorowych kinaz tyrozynowych (RKT) w kaskadzie transdukcji sygnału – kinaza fosfatydyloinozytolowa 3 (PI3K)-PKB/Akt (ryc. 5).

W wyniku przyłączenia liganda (np. czynnika wzrostu) do receptora o aktywności kinazy tyrozynowej – RKT, następuje jego dimeryzacja, co umożliwia zajęcie autofosforylacji

tyrozyn w obrębie domen cytoplazmatycznych dimeru. Następnie do ufosforylowanego receptora przyłączają się białka adaptorowe, mające domenę SH-2 oraz małe białko GTP-azowe – Ras, co w efekcie aktywuje kinazę 3-fosfatydyloinozytolu klasy I (I PI3K). Kinaza PI3K katalizuje reakcję fosforylacji PI(3,4)P₂ do PI(3,4,5)P₃, zwiększając powinowactwo do błony komórkowej białek cytoplazmatycznych, w tym PDK1 i kinazy B (PKB/Akt) oraz aktywację tej ostatniej przez PDK1. Ufosforylowana kinaza PKB/Akt hamuje aktywność kompleksu utworzonego przez hemartynę (TSC1) i tuberynę (TSC2), przez bezpośrednią fosforylację TSC2. W konsekwencji TSC1/TSC2 przestaje stymulować aktywność GTP-azową białka Rheb (białko wiążące GTP), które po przejściu ze stanu związanego z GDP (nieaktywnego) do stanu związanego z GTP (aktywnego), może bezpośrednio aktywować kompleks mTORC1. Białko Ras spełnia dwie przeciwstawne role: może hamować autofagię, aktywując szlak PI3K-PKB/Akt-mTOR lub indukować ten proces na drodze Raf-1-MEK1/2-ERK1/2 [86,98,100].

Indukcja autofagii na drodze LKB1/CaMKKβ-AMPK-mTOR

W komórkach tkanek prowadzących aktywny metabolizm (wątroba, mięśnie) szlak LKB1-AMPK-mTOR (ryc. 5) jest głównym czujnikiem regulującym przemianę tłuszczów i węglowodanów. Szlak ten uczestniczy również w regulacji metabolizmu w komórkach nowotworowych i bierze udział w procesie nowotworzenia.

Stres metaboliczny, jakim jest brak składników odżywczych, powoduje zmniejszenie stosunku poziomu ATP do AMP w komórce. W odpowiedzi serynowo-treoninowa kinaza LKB1 aktywuje białko AMPK poprzez fosforylację Thr172

w podjednostce α . Aktywne białko AMPK powoduje fosforylację i aktywację kompleksu TSC1/TSC2 oraz niezależnie fosforyluje białko raptor (wchodzące w skład kompleksu mTORC1). Skutkuje to zahamowaniem aktywności mTORC1, co umożliwia indukcję autofagii w odpowiedzi na stres metaboliczny. Kinaza AMPK, inaktywując kompleks 1 mTOR, umożliwia rozpoczęcie procesu autofagii również w odpowiedzi na wzrost stężenia w cytosolu jonów wapnia Ca^{2+} , w czym pośredniczy kinaza CaMKK β . Ponadto aktywność białka AMPK przyczynia się do zainicjowania procesu autofagii w komórkach znajdujących się w stanie hipoksji [15,100].

Rola p53 w regulacji autofagii w komórkach nowotworowych

Białko p53 kodowane jest przez gen *TP53*, który jest umiejscowiony na chromosomie 17. Jako czynnik transkrypcyjny, który ma właściwości supresora transformacji nowotworowej, białko to wiąże się do swoistych sekwencji DNA, przez co wpływa na ekspresję różnych białek. Tym samym jest ono zaangażowane w regulację wielu procesów komórkowych, a zwłaszcza w regulację przebiegu cyklu komórkowego, metabolizmu oraz indukcję apoptozy. Jednocześnie inaktywacja tego białka, w wyniku wzmoczonej degradacji proteosomalnej, czy też w wyniku mutacji genu lub nadmiernego wytwarzania jego inhibitorów, obserwowana jest w przeszło połowie ludzkich nowotworów. Białko p53 uczestniczy również w regulacji procesu autofagii, przy czym jego rola jest dwoista, co wiąże się z lokalizacją tego białka w komórce. W zależności od tego, czy białko p53 występuje w jądrze komórkowym czy cytoplazmie, może inicjować bądź hamować autofagię [81].

Indukcja autofagii przez białko p53

Indukcja autofagii, w której uczestniczy frakcja jądrowa białka p53, wiąże się z jego funkcją regulatorową transkrypcji genów kodujących białka AMPK, DAPK-1, DRAM, proapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2 (Bad, Bax, BNIP3, PUMA) oraz Sestrin1/2 (Sestryny) [74]. Białko DRAM bezpośrednio uczestniczy w indukcji autofagii niezależnej od kompleksu mTOR, w odpowiedzi na działanie substancji uszkadzających DNA. Z kolei białka Sestrin 1 i 2, których ekspresja przeważnie indukowana jest w wyniku uszkodzenia DNA bądź stresu oksydacyjnego, uczestniczą w indukcji autofagii poprzez aktywację białka AMPK [31].

Inhibicja autofagii przez białko p53

W odróżnieniu od puli jądrowej, cytoplazmatyczna frakcja białka p53 uczestniczy w hamowaniu procesu autofagii przez aktywację mTORC1, niezależnie od jego roli jako czynnika transkrypcyjnego. Tasdemir i wsp. jako pierwsi wykazali, że zahamowanie aktywności cytosolowego białka p53, przez inaktywację jego genu (knockout), zastosowanie siRNA oraz związków chemicznych, indukuje autofagię w komórkach ludzkich, mysich i nicienia *C. elegans* [91]. Jednocześnie wspomniani naukowcy zaobserwowali, że wiele pro-autofagicznych czynników, takich jak: stan głodzenia, hamowanie kompleksu mTOR przez rapamycynę, czy też stres retikuloendoplazmatyczny (stres ER), przyczynia się do proteosomalnej degradacji białka p53 z udziałem białka HDM2, co promuje autofagię.

Kolejne mocne przesłanki potwierdzające rolę białka p53 jako inhibitora w procesie autofagii wynikają z dalszych badań zespołu Tasdemira wykonanych na ludzkich komórkach raka jelita grubego pozbawionych białka p53, HCT116 p53^{-/-}, które charakteryzują się podwyższonym podstawowym poziomem autofagii. Zaobserwowano, że poziom autofagii obniża się w komórkach HCT116 p53^{-/-}, gdy przywrócona zostanie synteza białka p53 po wprowadzeniu genu typu dzikiego białka p53 (wt p53). Co ciekawe, białko p53 powoduje zahamowanie autofagii głównie w fazie G0/G1 i w mniejszym stopniu w fazie S cyklu komórkowego [92].

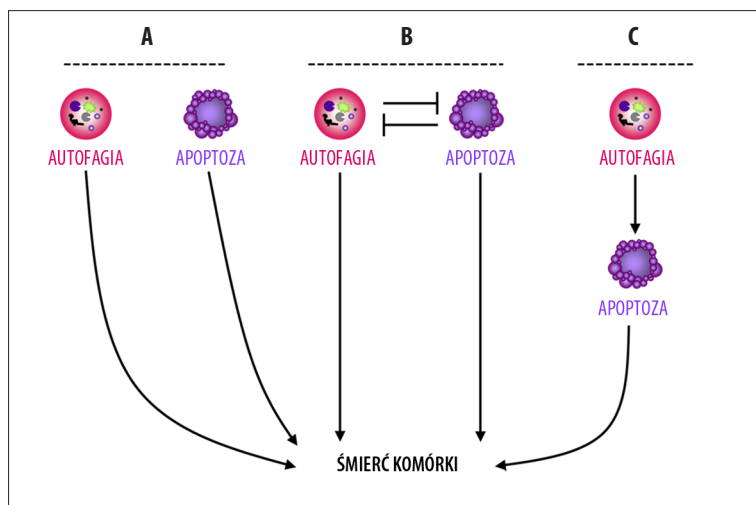
AUTOFAGIA I APOPTOZA – POWIĄZANIE NA POZIOMIE MOLEKULARNYM

Apoptoza i autofagia są procesami istotnymi dla prawidłowego rozwoju organizmu, które mają decydujący wpływ na losy komórek. Liczne badania wskazują, że różne bodźce zdolne są do aktywacji zarówno autofagii, jak i apoptozy i mimo wyraźnych różnic pomiędzy tymi dwoma procesami, ich regulacja na poziomie molekularnym jest powiązana.

Białka należące do rodziny Bcl-2 pełnią główną rolę w regulacji śmierci komórki za pośrednictwem apoptozy. Obecnie wiadomo również, że wpływają one na przebieg procesu autofagii. W komórkach zarówno mysich jak i ludzkich, białkiem uczestniczącym w procesie autofagii, które oddziałuje z rodziną białek Bcl-2 jest Beklina 1 [79]. Beklina 1 ma na swoim N-końcu domenę BH3, za pośrednictwem której łączy się z domeną receptorową BH3 białek antyapoptotycznych Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 oraz proapoptotycznych Bax, Bad, Bak, Bik, Nox, Puma i BimEL.

Białka Bcl-2 oraz Bcl-X_L działają jako inhibitory autofagii [105]. W niektórych rodzajach komórek, białka te po przyłączeniu do Bekliny 1, obniżają powinowactwo Bekliny 1 do białka PI3K III. Wydaje się, że rola, jaką pełnią wspomniane białka w inhibicji autofagii związana jest z tym, iż kompleks złożony z Bcl-2/Bcl-X_L-Beklina 1-PI3K (w porównaniu z kompleksem bez dołączonego białka Bcl-2 lub Bcl-X_L) ma zmniejszoną aktywność kinazową [33,58]. Oddziaływanie między Bekliną 1 a białkami Bcl-2 oraz Bcl-X_L regulowane jest przez ich stan ufosforylowania. Pod wpływem działania kinazy DAPK-1 Beklina 1 ulega fosforylacji (Thr 119), natomiast białko Bcl-2 fosforylowane jest przez kinazę JNK1 [96,103]. Prowadzi to do rozłączenia się tych białek, czego rezultatem jest indukcja autofagii. Jednocześnie ufosforylowane białko Bcl-2 łączy się z proapoptotycznym białkiem Bax, co hamuje apoptozę. Białko JNK1 może również powodować hiperfosforylację Bcl-2, które w takiej postaci odłącza się od białka Bax i w konsekwencji prowadzi to do śmierci komórki w wyniku apoptozy. Wspomniane białko DAPK-1 uczestniczy również w etapie „pączkowania” błony komórkowej poprzez oddziaływanie ze składnikami cytoszkieletu w czasie apoptozy [36,64].

Białka proapoptotyczne Bad, BNIP3 oraz mimetyki białek BH3 (np. ABT737), kompetytywnie hamują oddziaływanie pomiędzy Bekliną 1, a Bcl-2/Bcl-xL i stymulują autofagię [16,64]. W taki sposób białko BNIP3 indukuje degradację mitochondriów za pośrednictwem autofagii (mitofagia) w odpowiedzi na hipoksję. Podobnie białko



Ryc. 6. Schemat interakcji między autofagią a apoptozą, prowadzące do śmierci komórki (na podstawie [23] zmodyfikowano)

Puma pośredniczy w indukcji mitofagii w odpowiedzi na zmiany w potencjale mitochondrialnym zależnie od białek Bax/Bak [14].

Innym przykładem wzajemnego powiązania apoptozy oraz autofagii jest spostrzeżenie, że białko Atg5 (odgrywające ważną rolę w formowaniu autofagosomów) po przecięciu przez kalpainę ulega translokacji do mitochondrium i ma właściwości proapoptotyczne. W mitochondriach fragment ten łączy się z białkiem Bcl-X_L, przez co uczestniczy w indukcji apoptozy zależnej od mitochondriów. Przy czym, gdy nie dochodzi do translokacji Atg5 do mitochondrium, w komórkach inicjowany jest proces autofagii [72,102].

Uczestniczące w procesie apoptozy proteazy cysteinowe (kaspazy) biorą również udział w degradacji białek istotnych dla autofagii. Kaspazy 3, 7 i 8 poprzez proteolizę i inaktywację Bekliny 1 oraz kinazy PI3K III (główne komponenty kompleksu inicjującego autofagię) hamują autofagię, promując progresję apoptozy [21]. E. Wirawan i wsp. wykazali, że w wyniku przecięcia Bekliny 1 przez kaspazy powstają dwa produkty: N-końcowy (Beklina 1-N, aa 1-133) oraz C-końcowy (Beklina 1-C, aa 150-450), które tracą zdolność do indukcji autofagii [97]. Analiza rozmieszczenia obu fragmentów w komórce wykazała, że fragment N-końcowy przemieszcza się z cytoplazmy do jądra, a C-końcowy do mitochondrium. Co więcej, fragment C-końcowy Bekliny 1 po translokacji do mitochondrium, powoduje uwolnienie proapoptotycznych czynników, takich jak cytochrom c oraz białko HtrA2/Omi, przez co może wzmacniać sygnał indukujący apoptozę, jakim jest np. brak czynników wzrostu w pożywce [97].

Białko FLIP, które blokuje inicjację apoptozy na poziomie receptorów śmierci (szlak receptorowy, zewnętrzny), kontroluje również proces autofagii. Poprzez domeny DED białko FLIP rozpoznaje i przyłącza się do białka Atg3. W konsekwencji uniemożliwia to koniugację białka Atg3 z białkiem LC3 i blokuje autofagię na etapie tworzenia autofagosomu [56].

Apoptozę i autofagię łączą również podobne ścieżki aktywacji i inhibicji zależne od Akt/PKB [73] i mTOR [12].

Autofagia i apoptoza – interakcje w kontekście śmierci komórki

Różne bodźce są zdolne do aktywacji zarówno autofagii jak i apoptozy, a regulacja obu szlaków na poziomie molekularnym często zachodzi z udziałem tych samych białek. W kontekście śmierci komórki można wyróżnić trzy typy interakcji między autofagią i apoptozą.

Autofagia i apoptoza – partnerzy działający w skoordynowany lub kooperatywny sposób

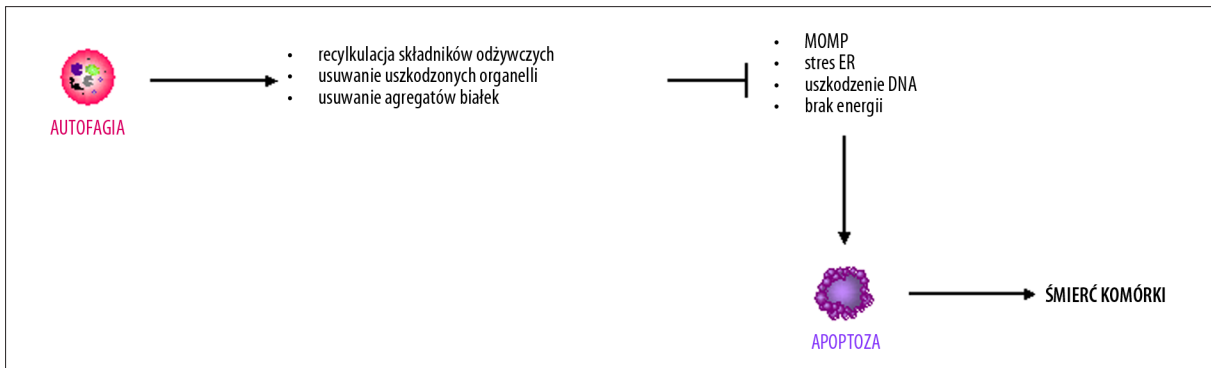
W tym przypadku autofagia i apoptoza wspólnie bądź jako dwa niezależne szlaki mogą prowadzić do eliminacji komórki (ryc. 6). Wynika z tego, że jeśli oba procesy zachodzą jednocześnie i jeden z nich zostanie zablokowany (w wyniku mutacji lub inhibicji farmakologicznej) wówczas drugi może przejąć główną rolę w procesie śmierci komórki (ryc. 6A). Alternatywnie, drugi proces może zostać uruchomiony tylko wtedy, gdy pierwszy z jakichkolwiek przyczyn zawiedzie (ryc. 6B). Możliwy jest również scenariusz, w którym do prawidłowego przebiegu śmierci komórki w wyniku apoptozy wymagana jest uprzednia aktywacja autofagii (rys. 6C) [23].

Autofagia – antagonistą apoptozy

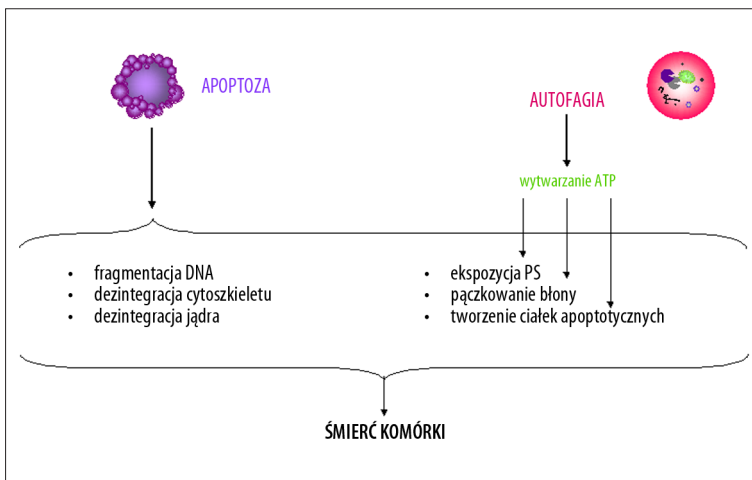
W tym przypadku, autofagia hamuje proces apoptozy, działając jako proces przeżyciowy (ryc. 7). Poprzez usuwanie uszkodzonych organelli, będących źródłem wolnych rodników i agregatów białkowych oraz przez degradację wielokocząsteczkowych substratów, będących źródłem składników odżywczych i energii, autofagia stwarza sprzyjające warunki do przeżycia. W ten sposób autofagia zapobiega powstaniu bodźców, które są niezbędne do indukcji apoptozy [23].

Autofagia umożliwia przebieg apoptozy

W tym przypadku, autofagia nie prowadzi do śmierci komórki *per se*, ale pośredniczy w indukcji śmierci w procesie apoptozy (ryc. 8). W czasie głodu, autofagia uczestniczy m.in. w zmianach morfologicznych zależnych od ATP, tj. translokacji fosfatydoseryny (PS) czy też pączkowaniu błony i tworzeniu ciałek apoptotycznych [23].



Ryc. 7. Schemat antagonisticznej interakcji między autofagią, a apoptozą (na podstawie [23] zmodyfikowano)



Ryc. 8. Schemat roli autofagii w indukcji śmierci komórkowej w wyniku apoptozy (na podstawie [23] zmodyfikowano)

AUTOFAGIA W PROCESACH PATOLOGICZNYCH

Autofagia zaangażowana jest m.in. w takie procesy jak biosynteza, regulacja metabolizmu (poprzez eliminację ściśle określonych enzymów), morfogeneza, różnicowanie komórkowe, przebudowanie tkanek, starzenie czy też ochrona komórki (np. przed patogenami). Proces ten jest również zaangażowany w usuwanie potencjalnie szkodliwych, uszkodzonych bądź funkcjonujących wadliwie organelli (mitochondria, retikulum endoplazmatyczne, lizosomy) oraz cytotoksycznych agregatów białkowych. Zaburzenia w tym procesie mogą więc prowadzić do stanów patologicznych. Zakłócenie autofagii na którymkolwiek z etapów jej przebiegu może prowadzić do rozwoju nowotworów, chorób immunologicznych, schorzeń wątroby, miopatii oraz chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona, Huntingtona oraz Alzheimerera [10,57,80].

Rozważając znaczenie autofagii w procesach patologicznych, niezależnie od swoistych czynników każdej choroby, wspólnym wyzwaniem jest rozróżnienie, czy w danym przypadku autofagia chroni komórkę, czy też prowadzi do jej śmierci. Nie jest to proste, gdyż w zależności od rodzaju komórek oraz czynników zewnętrznych działających na komórkę, autofagia może spełniać odmienną rolę.

Autofagia – supresor transformacji nowotworowej

Na podstawie dotychczasowych doniesień literaturowych nie można jednoznacznie określić roli, jaką pełni autofagia w kancerogenezie. Jednak większość uzyskanych wyników

badania ukazuje autofagię jako mechanizm, który zapobiega rozwojowi nowotworu. Większość białek uczestniczących w indukcji autofagii blokuje transformację nowotworową. Ponadto wiele genów związanych z autofagią jest nieczynnych w różnych typach nowotworów, bądź ich aktywność ulega obniżeniu [7].

Funkcja autofagii jako supresora transformacji nowotworowej, została po raz pierwszy zaobserwowana dzięki badaniom genetycznym prowadzonym nad genem *BECN1*, kodującym Beklinę 1. Ekspresja tego genu (ectopic expression) zmniejsza zarówno proliferację komórek nowotworowych *in vitro*, jak i potencjał nowotworzenia *in vivo*. Badania prowadzone na mysim modelu z monoalleliczną delecją genu kodującego Beklinę 1 (Beklina $1^{+/-}$) wykazały znaczący wzrost częstości występowania u tych zwierząt spontanicznych nowotworów płuc i wątroby oraz chłoniaków i białaczek w porównaniu do myszy mających oba allele dzikiego typu (Beklina $1^{+/+}$) [93]. Całkowita utrata genu *BECN1* przyczyniła się zaś do rozwoju nowotworu u myszy, chociaż następował on po długim okresie utajenia [14,20].

U ludzi delecję jednego z alleli genu *BECN1*, zlokalizowanego na chromosomie 17 (17q21), zaobserwowano w rakach piersi, prostaty, jajnika i mózgu. Zmniejszona ekspresja genu *BECN1* występuje natomiast w wielu innych typach komórek nowotworowych, w tym ludzkim nowotworze jelita grubego, nowotworach mózgu i wątroby oraz w raku szyjki macicy. Jednoczesne zmniejszenie ekspresji genów Bekliny 1 i białka LC3 występuje w ludzkich glejakach [35]. Ding

i wsp. wykazali natomiast, że zmniejszenie ekspresji genu *BECN1* związane jest również ze złą prognozą u pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem złośliwym wątroby [20]. Podsumowując, heterozygotyczna utrata genu *BECN1* promuje, zaś nadekspresja tego genu hamuje proces nowotworzenia.

W komórkach nowotworowych zidentyfikowano również zmiany w innych genach, których produkty są istotne w procesie autofagii. W komórkach nowotworów żołądka oraz jelita grubego znaleziono mutację nonsensową w genie *UVRAG*, kodującym białko oddziałujące z Bekliną 1. Nadekspresja tego genu w ludzkich komórkach rakach jelita przeszczepionych do myszy bezgranicznych (nude mice) zmniejsza ich proliferację i powoduje wolniejszy wzrost guza, co przemawia za supresorową rolą tego genu [60]. Gen *MAPI-LC3* zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 16 w pozycji 24.1 ulega częstym delecjom w rakach wątroby, piersi, prostaty oraz jajnika [38]. Natomiast myszy z inaktywowanym genem *Atg4* wykazują znaczną podatność na rozwój fibrosarkomy indukowanej przez chemiczne kancerogeny [14]. Zauważono również szybszy wzrost komórek nowotworowych niezdolnych do indukcji autofagii, przeszczepionych ortotopowo myszom bezgranicznym. Wzrost ten był jeszcze bardziej przyspieszony, gdy komórki niezdolne były również do indukcji procesu apoptozy [67].

Powyższe przykłady stanowią ważną przesłankę przemawiającą za supresorową rolą autofagii w rozwoju nowotworów. Jednocześnie wskazują, że zahamowanie tego procesu, zarówno częściowe, jak i całkowite może promować rozwój nowotworu. Dodatkowo za taką rolę autofagii przemawia to, iż jest ona regulowana negatywnie poprzez szlak PI3K-Akt-mTOR, a zmiany nowotworowe są często wynikiem mutacji, które zwiększają aktywność tego szlaku [57].

Autofagia – proces promujący rozwój nowotworu

Autofagia jest procesem, którego fizjologiczna funkcja polega na zapewnieniu dostępności wymaganych składników odżywczych i energetycznych niezbędnych do utrzymania metabolizmu na poziomie umożliwiającym przeżycie komórki w niekorzystnych warunkach. W czasie rozwoju guza komórki nowotworowe, ze względu na brak unaczynienia, znajdują się w stanie hipoksji (niedotlenienia) oraz stresu oksydacyjnego [44]. W panujących wewnątrz guza warunkach niedotlenienia autofagia przyczynia się do powstawania komórek nowotworowych o dużym potencjale przerzutowania, opornych na terapię przeciwnowotworową. Białkiem, które jest odpowiedzialne za indukcję autofagii w warunkach hipoksji jest czynnik indukowany przez hipoksję, HIF-1 α . Czynnik HIF-1 α indukuje transkrypcję genu proapoptotycznego białka BNIP3, biorącego udział w przekazywaniu wewnątrz komórki zróżnicowanych sygnałów wskazujących na wystąpienie czynników stresowych. Białko to ma również zdolność wiązania się do białek antyapoptotycznych, takich jak białko Bcl-2 czy też Bcl-X_L, które poprzez interakcję z Bekliną 1 regulują autofagię. Na skutek konkurencji o wiązanie Bcl-2 i Bcl-X_L, za pośrednictwem domen BH3, białko BNIP3, powoduje osłabienie tej interakcji, a oddysocjowana Beklina 1 uczestniczy w indukcji procesu autofagii [6,62].

Autofagia – przykład programowanej śmierci typu II

Autofagia umożliwia komórkom przeżycie w sytuacjach stresowych, przez co postrzegana jest głównie jako

mechanizm chroniący komórkę. Jednak, gdy intensywność lub czas trwania autofagii jest zbyt długi, proces ten może prowadzić do degradacji komórki. Wówczas autofagia określana jest mianem programowanej śmierci typu II – PCD II lub autofagiczną śmiercią komórki [46]. Na poziomie komórkowym, śmierć w wyniku autofagii jest niezależna od kaspaz i charakteryzuje się częściową kondensacją chromatyny i brakiem międzynukleosomalnej fragmentacji DNA oraz degradacją retikulum endoplazmatycznego i aparatu Golgiego. Ponadto, w przeciwieństwie do apoptozy, autofagia jest procesem, który można odwrócić, gdy na komórkę przestanie działać induktor tego procesu. Rola autofagii w śmierci komórkowej została zaproponowana na podstawie obserwacji obecności dużej liczby autofagosomów w umierających komórkach wielu gatunków zwierząt. Ten rodzaj śmierci powszechnie występuje w czasie rozwoju organizmu, m.in. podczas metamorfozy owadów, w rozwoju ślinianek u *Drosophila*, morfogenezie zawiązków kończyn u ptaków, czy też w czasie zamknięcia podniebienia u ssaków [27].

Autofagia – alternatywny do apoptozy sposób eliminacji komórki nowotworowej

Główną przyczyną niepowodzenia wielu stosowanych terapii jest oporność komórek nowotworowych na apoptozę. W komórkach, w których apoptoza jest zahamowana, autofagia może być alternatywnym procesem prowadzącym do eliminacji zmienionej nowotworowo komórki z organizmu.

Intensywne nagromadzenie autofagosomów, charakteryzujące śmierć za pośrednictwem autofagii, zostało udokumentowane w różnych komórkach nowotworowych traktowanych m.in. związkami alkilującymi (np. aktynomycyna D, As₂O₃), związkami stosowanymi w terapii hormonalnej (np. tamoksyfen, analogii witaminy D), związkami naturalnymi (resweratrol, cytokiny, IFN γ), czy też po zastosowaniu terapii genowej.

W wyniku działania tamoksyfenu na komórki ludzkiego raka sutka MCF-7 zaobserwowano znaczną akumulację autofagosomów, która częściowo hamowana była przez inhibitor autofagii, 3-metyloadeninę. Jednocześnie tamoksyfen nasilał ekspresję Bekliny 1, a tym samym indukował proces autofagii [9].

Trójtlenek arsenu (As₂O₃) jest powszechnie stosowanym w klinice chemioterapeutycznym w leczeniu białaczek. Cytotoksyczny mechanizm działania As₂O₃ polega na indukcji apoptozy w wyniku uwolnienia cytochromu c z mitochondriów i aktywacji kaspaz. Obecnie dowiedziono również, że cytotoksyczny mechanizm działania tego związku związany jest też z indukcją autofagii w komórkach ludzkiej białaczki wywodzącej się z limfocytów T. As₂O₃ wykazuje również działanie wobec opornego na inne chemioterapeutyki glejaka złośliwego. Związek ten zastosowany w dawce klinicznej (2 μ M) powodował zahamowanie wzrostu komórek glejaka, a ponadto indukował ich śmierć w wyniku wzmożonej autofagii. Co ciekawe, gdy zahamowano przebieg autofagii przez zastosowanie bafilomycyny A w komórkach glejowych, indukowana była apoptoza [42,43].

Śmierć w wyniku autofagii została zaobserwowana również w komórkach, w których zablokowana była aktywność

kaspaz lub ekspresja genów białek z rodziny Bcl-2 uległa modyfikacji. Wykazano, że inhibicja kaspaz chroni komórki białaczki limfoblastycznej Jurkat T przed śmiercią w wyniku apoptozy indukowanej przez białko Bax, ale powoduje ich śmierć w wyniku autofagii. Obniżenie aktywności białka Bcl-2 w komórkach HL-60 indukuje autofagię, prowadząc do ich śmierci. W tym przypadku proces ten najprawdopodobniej zależy od aktywności Bcl-2, która kontroluje autofagię poprzez klasę III kinaz PI3 i oddziałuje z białkiem Bcl-2 [78,101].

W wielu przypadkach do końca nie jest pewne, czy autofagia pełni aktywną rolę w śmierci komórki czy jest tylko przejawem próby jak najdłuższego utrzymania funkcji życiowych umierającej komórki. Dlatego też rozpatrując autofagię w kontekście śmierci, należy rozważyć dwa istotne aspekty, a mianowicie czy mamy do czynienia ze śmiercią komórki w wyniku autofagii czy też ze śmiercią komórki, której towarzyszy autofagia [53].

Autofagia – rola w rozwoju oporności na terapie przeciwnowotworowe

Wyjątkowo dużą przeszkodą w skuteczności leczenia nowotworów z wykorzystaniem leczenia chemicznego jest oporność komórek nowotworowych na stosowane leki. Komórki nowotworowe nabywają oporność na chemoterapię poprzez wiele różnorodnych mechanizmów, których działanie obejmuje:

- zmniejszenie lub zahamowanie przedostawania się leków do wnętrza komórki;
- zwiększenie efektywności usuwania leków z wnętrza komórki;
- aktywację systemów neutralizacji substancji toksycznych;
- zmiany w białkach, z którymi docelowo wiążą się leki;
- zaburzenia procesów związanych ze zmianami struktury DNA;
- blokowanie apoptozy [54].

Autofagia jest kolejnym z mechanizmów, który może być odpowiedzialny za nabywanie oporności przez komórki nowotworowe w odpowiedzi na terapię. Zaobserwowano, że zarówno radioterapia, jak i stosowane chemoterapeutyki, np. doksorubicyna, temozolamid, etopozyd, imatinib, rapamycyna, leki antyestrogenowe indukują autofagię w wielu ludzkich komórkach nowotworowych, co przyczynia się do wzrostu ich oporności na stosowaną terapię i do ich przeżycia, m.in. przez wpływanie na proces apoptozy. W takim przypadku inhibicja autofagii w wyniku wyciszenia ekspresji genów *Atg5*, *BECN1*, *Atg10*, *Atg12* poprzez zastosowanie siRNA bądź użycie inhibitorów farmakologicznych (3-metyloadenina, chlorochinon, hydroksychlorochinon, bafilomycyna A1) może zwiększyć efektywność stosowanej terapii [20].

Efekt inhibicji autofagii w połączeniu z obecnie stosowanymi lekami w terapii przeciwnowotworowej został przebadany na komórkach wielu rodzajów nowotworów, takich jak: glejak [63,84,85], szpiczak mnogoci [83] rak piersi [1,94], rak jelita grubego [2,11] oraz rak prostaty [47].

Samaddar i wsp. inkubowali komórki ludzkiego raka piersi MCF-7 z tamoksyfenem we wzrastającym stężeniu aż do czasu uzyskania komórek zdolnych do proliferacji

w obecności leku. W porównaniu z wyjściowymi komórkami MCF-7, uzyskane komórki odporne wykazywały zwiększony poziom autofagii, który dodatkowo zwiększał się, gdy komórki poddawano ponownej inkubacji z tamoksyfenem. Zastosowanie 3-metyloadeniny bądź wyciszenie ekspresji genu *Becl-1* powodowało śmierć tych komórek w wyniku apoptozy po działaniu tamoksyfenu [82]. Podobne rezultaty uzyskano w komórkach raka piersi SKBR3 z nadekspresją receptora HER2, w których wywołano oporność na trastuzumab. Z badań tych wynika, że w opornych komórkach SKBR3 proces autofagii zachodzi na zwiększonym poziomie w porównaniu z komórkami wyjściowymi. Zahamowanie autofagii, poprzez wyciszenie ekspresji genu kodującego białko LC3, przywróciło wrażliwość badanych komórek opornych na działanie trastuzumabu [94].

Związki hamujące autofagię na poziomie lizosomów, bafilomycyna A1 oraz chlorochinon, zwiększały odsetek komórek ludzkiego glejaka U251, szczerzego glejaka C6 oraz mysiej fibrosarkomy L929 umierających w procesie apoptozy indukowanej przez cisplatynę, czemu towarzyszył wzrost poziomu zarówno mRNA *Bax* i *Bcl-2*, jak i stosunek obu białek (*Bax/Bcl-2*). Zastosowanie wortmaniny, hamującej aktywność kinazy PI3K, jako inhibitora autofagii również prowadziło do apoptozy komórek powyższych linii nowotworowych [67]. Wzmoczoną apoptozę zaobserwowano także w estrogenozależnych komórkach raka piersi linii MCF-7 oraz T47D traktowanych kamptotecyną (inhibitor topoisomazy I DNA), w których autofagia została zablokowana 3-metyloadeniną [1]. Inne badania wskazują, że inhibicja autofagii powoduje śmierć komórek raka jelita grubego opornego na działanie 5-fluorouracylu (5-FU). W komórkach różnych nowotworów jelita grubego inkubowanych z 5-FU, które poddano jednocześnie działaniu 3-metyloadeniny lub wyciszono ekspresję genu *Atg7* zaobserwowano cechy charakterystyczne dla apoptozy. Ponadto zaobserwowano synergistyczne działanie 3-metyloadeniny oraz 5-FU *in vivo*, które przejawiało się zmniejszeniem rozmiarów guza jelita grubego zbudowanego z komórek DLD-1 przeszczepionych myszom [59].

Jednym z kolejnych przykładów potwierdzających skuteczność takiego podejścia terapeutycznego są wyniki uzyskane w badaniach prowadzonych na komórkach przewlekłej białaczki szpikowej CML. Powszechnie stosowanym lekiem w leczeniu chorych z przewlekłą białaczką szpikową jest imatinib (Glivec), będący inhibitorem kinazy Bcr-Abl. Obecnie wiadomo, że jednym z mechanizmów działania tego leku jest indukcja autofagii [24]. Bellodi i wsp. w swoich badaniach wykazali, że jednocześnie zastosowanie imatinibu i chlorochinonu (CQ) lub wyciszenie ekspresji genów *Atg5* czy też *Atg7* w sposób znaczący zwiększa odsetek umierających komórek CML [5,41].

Podobny rezultat zaobserwowano, gdy posługując się odpowiednim siRNA wyciszono ekspresję genów *Atg5* oraz *Atg7* w komórkach pobranych od pacjentów. Co ważniejsze jednocześnie zastosowanie imatinibu i CQ powodowało śmierć komórek uzyskanych od pacjentów, znajdujących się w trzech różnych stadiach rozwoju choroby: od pacjenta z dopiero zdiagnozowaną chorobą, pacjenta leczonego imatinibem oraz pacjenta z nawrotem choroby, zawierającego mutację powodującą występowanie u niego oporności na ten lek [14].

Imatinib indukuje również autofagię w ludzkich komórkach nowotworowych gleju U87-MG i U737-MG. Co ważniejsze, zablokowanie autofagii w tych komórkach na etapie tworzenia autofagosomów (przez 3-metyloadeninę lub wyciszenie ekspresji genu *Atg5*) powodowało zmniejszenie odsetka umierających komórek. Natomiast zahamowanie autofagii na etapie łączenia się autofagosomów z lizosomami (przez bafilomycynę A1 lub RTA203) powodowało wzrost ilości komórek umierających, czemu towarzyszył spadek potencjału mitochondrialnego. Tym samym uzyskane wyniki wykazują, że blokowanie autofagii na różnym jej etapie może wywołać różne i niekiedy przeciwstawne efekty [84,85].

PODSUMOWANIE

Liczne wyniki badań wskazują, że zarówno indukcja jak i inhibicja autofagii może mieć wymierne korzyści z punktu widzenia terapii przeciwnowotworowej. Poszukiwanie

związków, które wpływają na proces autofagii, tzw. modulatorów autofagii, może dostarczyć nie tylko nowych narzędzi ułatwiających walkę z chorobami nowotworowymi, ale również może się przyczynić do rozwoju lepszych strategii terapeutycznych. Dla powodzenia terapii przeciwnowotworowej ważne jest również, aby określić typ komórek nowotworowych podatnych na autofagię w odpowiedzi na podjęty rodzaj leczenia oraz aby określić, czy w danym przypadku autofagia prowadzi do śmierci tych komórek, czy też przyczynia się do ich oporności na zastosowaną terapię [17].

PODZIĘKOWANIA

Serdeczne podziękowania składam panu prof. dr hab. inż. Jerzemu Konopie za inspirację do napisania tej publikacji oraz pani dr Ewie Augustin za pomoc redakcyjną i nadanie pracy ostatecznego kształtu.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abedin M.J., Wang D., McDonnell M.A., Lehmann U., Kelekar A.: Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death Differ.*, 2007; 14: 500–510
- [2] Apel A., Herr I., Schwarz H., Rodemann H.P., Mayer A.: Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy. *Cancer Res.*, 2008; 68: 1485–1494
- [3] Arias E., Cuervo A.M.: Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2011; 23: 184–189
- [4] Axe E.L., Walker S.A., Manifava M., Chanda P., Roderick H.L., Habermann A., Griffiths G., Kistakis N.T.: Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*, 2008; 182: 685–701
- [5] Bellodi C., Lidonnici M.R., Hamilton A., Helgason G.V., Soliera A.R., Ronchetti M., Galavotti S., Young K.W., Selmi T., Yacobi R., Van Etten R.A., Donato N., Hunter A., Dinsdale D., Tirrò E., Vigneri P., Nicotera P., Dyer M.J., Holyoake T., Salomoni P., Calabretta B.: Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *J. Clin. Invest.*, 2009; 119: 1109–1123
- [6] Bellot G., Garcia-Medina R., Gounon P., Chiche J., Roux D., Pouyssegur J., Mazure N.M.: Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol. Cell Biol.*, 2009; 29: 2570–2581
- [7] Brech A., Ahlquist T., Lothe R.A., Stenmark H.: Autophagy in tumor suppression and promotion. *Mol. Oncol.*, 2009; 3: 366–375
- [8] Burman C., Kistakis N.T.: Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Lett.*, 2010; 584: 1302–1312
- [9] Bursch W., Ellinger A., Kienzl H., Török L., Pandey S., Sikorska M., Walker R., Hermann R.S.: Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis*, 1996; 17: 1595–607
- [10] Bursch W., Karwan A., Mayer M., Dornetshuber J., Fröhwein U., Schulte-Hermann R., Fazi B., Di Sano F., Piredda L., Piacentini M., Petrovski G., Fésüs L., Gerner C.: Cell death and autophagy: cytokines, drugs, and nutritional factors. *Toxicology*, 2008; 254: 147–157
- [11] Carew J.S., Medina E.C., Esquivel J.A. II, Mahalingam D., Swords R., Kelly K., Zhang H., Huang P., Mita A.C., Mita M.M., Giles F.J., Nawrocki S.T.: Autophagy inhibition enhances vorinostat-induced apoptosis via ubiquitinated protein accumulation. *J. Cell Mol. Med.*, 2009; 14: 2448–2459
- [12] Castedo M., Ferri K.F., Kroemer G.: Mammalian target of rapamycin (mTOR): pro- and anti-apoptotic. *Cell Death Differ.*, 2002; 9: 99–100
- [13] Cecconi F., Levine B.: The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death. *Dev. Cell*, 2008; 15: 344–357
- [14] Chen N., Debnath J.: Autophagy and tumorigenesis. *FEBS Lett.*, 2010; 584: 1427–1435
- [15] Chen N., Karantza V.: Autophagy as a therapeutic target in cancer. *Cancer Biol. Ther.*, 2011; 11: 157–168
- [16] Chen N., Karantza-Wadsworth V.: Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009; 1739: 1516–1523
- [17] Codogno P., Meijer A.J.: Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ.*, 2005; 12, Suppl. 2: 1509–1518
- [18] Cuervo A.M.: Autophagy: Many paths to the same end. *Mol. Cell Biochem.*, 2004; 263: 55–72
- [19] Cuervo A.M.: Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2010; 21: 142–150
- [20] Dalby K.N., Tekedereli I., Lopez-Berestein G., Ozpolat B.: Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. *Autophagy*, 2010; 6: 322–329
- [21] Djavaheri-Mergny M., Maiuri M.C., Kroemer G.: Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. *Oncogene*, 2010; 29: 1717–1719
- [22] Efeyan A., Sabatini D.M.: mTOR and cancer: many loop in one pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2010; 22: 169–176
- [23] Eisenberg-Lerner A., Bialik S., Simon H.U., Kimchi A.: Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ.*, 2009; 16: 966–975
- [24] Ertmer A., Huber V., Gilch S., Yoshimori T., Erfle V., Duyster J., Elsässer H.P., Schätzl H.M.: The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. *Leukemia*, 2007; 21: 936–942
- [25] Fimia G.M., Stoykova A., Romagnoli A., Giunta L., Di Bartolomeo S., Nardacci R., Corazzari M., Fuoco C., Ucar A., Schwartz P., Gruss P., Piacentini M., Chowdhury K., Cecconi F.: Ambra1 regulates autophagy and development of nervous system. *Nature*, 2007; 447: 1121–1125
- [26] Glick D., Barth S., Macleod K.F.: Autophagy: cellular and molecular mechanism. *J. Pathol.*, 2010; 221: 3–12
- [27] Gozuacik D., Kimchi A.: Autophagy and cell death. *Curr. Topics Dev. Biol.*, 2007; 78: 217–245
- [28] Gutierrez M.G., Munafo D.B., Beron W., Colombo M.I.: Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J. Cell Sci.*, 2004; 117: 2687–2697
- [29] Hailey D.W., Rambold A.S., Satpute-Krishnan P., Mitra K., Sougrat R., Kim P.K., Lippincott-Schwartz J.: Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*, 2010; 141: 656–667
- [30] Hara T., Takamura A., Kishi C., Iemura S., Natsume T., Guan J.L., Mizushima N.: FIP200, a ULK1 interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J. Cell Biol.*, 2008; 181: 497–510
- [31] Hay N., Sonenberg N.: Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.*, 2004; 18: 1926–1945
- [32] Hayashi-Nishino M., Fujita N., Noda T., Yamaguchi A., Yoshimori T., Yamamoto A.: A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell Biol.*, 2009; 11: 1433–1437
- [33] He C., Levine B.: The Beclin 1 interactome. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2010; 22: 140–149

- [34] Hosokawa N., Sasaki T., Iemura S.I., Natsume T., Hara T., Mizushima N.: Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy*, 2009; 5: 973–979
- [35] Huang X., Bai H.M., Chen L., Li B., Lu Y.C.: Reduced expression of LC3B and Beclin 1 in glioblastoma multiforme indicates a down-regulated autophagy capacity that relates to the progression of astrocytic tumors. *J. Clin. Neurosci.*, 2010; 17: 1515–1519
- [36] Inbal B., Bialik S., Sabanay I., Shani G., Kimchi A.: DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J. Cell Sci.*, 2002; 157: 455–468
- [37] Itakura E., Kishi C., Inoue K., Mizushima N.: Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol. Biol. Cell*, 2008; 19: 5360–5372
- [38] Jin S.: Autophagy, mitochondrial quality control and oncogenesis. *Autophagy*, 2006; 2: 80–84
- [39] Jung C.H., Ro S.H., Chao J., Otto N.M., Kim D.H.: mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.*, 2010; 584: 1287–1295
- [40] Kabeya Y., Mizushima N., Yamamoto A., Oshitani-Okamoto S., Ohsumi Y., Yoshimori T.: LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J. Cell Sci.*, 2004; 117: 2805–2812
- [41] Kamitsuji Y., Kuroda J., Kimura S., Toyokuni S., Watanabe K., Ashihara E., Tanaka H., Yui Y., Watanabe M., Matsubara H., Mizushima Y., Hiraumi Y., Kawata E., Yoshikawa T., Maekawa T., Nakahata T., Adachi S.: The Bcr-Abl kinase inhibitor INNO-406 induces autophagy and different modes of cell death execution in Bcr-Abl-positive leukemias. *Cell Death Differ.*, 2008; 15: 1712–1722
- [42] Kanzawa T., Kondo Y., Ito H., Kondo S., Germano I.: Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res.*, 2003; 63: 2103–2108
- [43] Kanzawa T., Zhang L., Xiao L., Germano I.M., Kondo Y., Kondo S.: Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene*, 2005; 24: 980–991
- [44] Karantzis-Wadsworth V., Patel S., Kravchuk O., Chen G., Mathew R., Jin S., White E.: Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev.*, 2007; 21: 1621–1635
- [45] Kaushik S., Bandyopadhyay U., Sridhar S., Kiffin R., Martinez-Vicente M., Kon M., Orenstein S.J., Wong E., Cuervo A.M.: Chaperon-mediated autophagy at a glance. *J. Cell Sci.*, 2011; 124: 495–499
- [46] Kim R.: Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer*, 2005; 103: 1551–1560
- [47] Kim R.H., Coates J.M., Bowles T.L., McNerney G.P., Sutcliffe J., Jung J.U., Gandour-Edwards R., Chuang F.Y., Bold R.J., Wang H.J.: Arginine deiminase as a novel therapy for prostate cancer induces autophagy and caspase-independent apoptosis. *Cancer Res.*, 2009; 69: 700–708
- [48] Kirisako T., Ichimura Y., Okada H., Kabeya Y., Mizushima N., Yoshimori T., Ohsumi M., Takao T., Noda T., Ohsumi Y.: The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell Biol.*, 2000; 151: 263–276
- [49] Klionsky D.J.: The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell Sci.*, 2005; 118: 7–18
- [50] Klionsky D.J., Abeliovich H., Agostinis P., Agrawal D.K., Aliev G., Askew D.S., Baba M., Baehrecke E.H., Bahr B.A., Ballabio A., Bamber B.A., Bassham D.C., Bergamini E., Bi X., Biard-Piechaczyk M., Blum J.S., Bredesen D.E., Brodsky J.L., Brummell J.H., Brunk U.T., Bursch W., Camougrand N., Cebollero E., Cecconi F., Chen Y., Chin L.S., Choi A., Chu C.T., Chung J., Clarke P.G., Clark R.S., Clarke S.G., Clavé C., Cleveland J.L., Codogno P., Colombo M.I., Coto-Montes A., Crehly J.M., Cuervo A.M., Debnath J., Demaeche P., Dennis P.B., Dennis P.A., Deretic V., Devenish R.J., Di Sano F., Dice J.F., Difiglia M., Dinesh-Kumar S., Distelhorst C.W., Djavaheri-Mergny M., Dorsey F.C., Dröge W., Dron M., Dunn W.A. Jr., Duszenko M., Eissa N.T., Elazar Z., Esclatine A., Eskelinen E.L., Fésüs L., Finley K.D., Fuentes J.M., Fucyo J., Fujisaki K., Galliot B., Gao F.B., Gewirtz D.A., Gibson S.B., Gohla A., Goldberg A.L., Gonzalez R., González-Estévez C., Gorski S., Gottlieb R.A., Häussinger D., He Y.W., Heidenreich K., Hill J.A., Høyer-Hansen M., Hu M., Huang W.P., Iwasaki A., Jäättelä M., Jackson W.T., Jiang X., Jin S., Johansen T., Jung J.U., Kadowaki M., Kang C., Kelekar A., Kessel D.H., Kiel J.A., Kim H.P., Kimchi A., Kinsella T.J., Kiselyov K., Kitamoto K., Knecht E., Komatsu M., Kominami E., Kondo S., Kovács A.L., Kroemer G., Kuan C.Y., Kumar R., Kundu M., Landry J., Laporte M., Le W., Lei H.Y., Lenardo M.J., Levine B., Lieberman A., Lim K.L., Lin F.C., Liou W., Liu L.F., Lopez-Berestein G., López-Otín C., Lu B., Macleod K.F., Malorni W., Martinet W., Matsuoka K., Mautner J., Meijer A.J., Meléndez A., Michels P., Miotto G., Mistiaen W.P., Mizushima N., Mograbi B., Monastyrska I., Moore M.N., Moreira P.I., Moriyasu Y., Motyl T., Münz C., Murphy L.O., Naqvi N.I., Neufeld T.P., Nishino I., Nixon R.A., Noda T., Nürnberg B., Ogawa M., Oleinick N.L., Olsen L.J., Ozpolat B., Paglin S., Palmer G.E., Papsideri I., Parkes M., Perlmutter D.H., Perry G., Piacentini M., Pinkas-Kramski R., Prescott M., Proikas-Cezanne T., Raben N., Rami A., Reggiori F., Rohrer B., Rubinsztein D.C., Ryan K.M., Sadoshima J., Sakagami H., Sakai Y., Sandri M., Sasakawa C., Sass M., Schneider C., Seglen P.O., Seleverstov O., Settleman J., Shacka J.J., Shapiro I.M., Sibirny A., Silva-Zacarin E.C., Simon H.U., Simone C., Simonsen A., Smith M.A., Spanel-Borowski K., Srinivas V., Steeves M., Stenmark H., Stromhaug P.E., Subauste C.S., Sugimoto S., Sulzer D., Suzuki T., Swanson M.S., Tabas I., Takeshita F., Tallbot N.J., Tallóczy Z., Tanaka K., Tanida I., Taylor G.S., Taylor J.P., Terman A., Tettamanti G., Thompson C.B., Thumm M., Tolkovsky A.M., Tooze S.A., Truant R., Tumanovska L.V., Uchiyama Y., Ueno T., Uzcátegui N.L., van der Klei I., Vaquero E., Vellai T., Vogel M.W., Wang H.G., Webster P., Wiley J.W., Xi Z., Xiao G., Yahalom J., Yang J.M., Yap G., Yin X.M., Yoshimori T., Yu L., Yue Z., Yuzaki M., Zabirnyk O., Zheng X., Zhu X., Deter R.L.: Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 2008; 4: 151–175
- [51] Kochl R., Hu X.W., Chan E.Y., Tooze S.A.: Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic*, 2006; 7: 129–145
- [52] Kondo Y., Kanzawa T., Sawaya R., Kondo S.: The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2005; 5: 726–734
- [53] Kroemer G., Levine B.: Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008; 9: 1004–1010
- [54] Kulbacka J., Saczko J., Chwiłkowska A.: Rak jelita grubego – charakterystyka i oporność na leczenie. *Onkol. Prakt. Klin.*, 2008; 4: 135–140
- [55] Lamparska-Przybylska M., Motyl T.: Autofagia – narzędzie przeżycia czy śmierci komórki nowotworowej? *Post. Biol. Komórki*, 2005; 32: 13–22
- [56] Lee J.S., Li Q., Lee J.Y., Lee S.H., Jeong J.H., Lee H.R., Chang H., Zhou F.C., Gao S.J., Liang C., Jung J.U.: FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nat. Cell Biol.*, 2009; 11: 1355–1362
- [57] Levine B., Kroemer G.: Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 2008; 132: 27–42
- [58] Levine B., Sinha S., Kroemer G.: Bcl-2 family members. Dual role of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, 2008; 4: 600–606
- [59] Li J., Hou N., Faried A., Tsutsumi S., Kuwano H.: Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer *in vitro* and *in vivo* model. *Eur. J. Cancer*, 2010; 46: 1900–1909
- [60] Liang C., Feng P., Ku B., Dotan I., Canaan D., Oh B.H., Jung J.U.: Autophagy and tumor suppressor activity of a novel Beclin 1-binding protein UVRAG. *Nat. Cell Biol.*, 2006; 8: 688–699
- [61] Liang C., Jung J.U.: Autophagy genes as tumor suppressors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2010; 22: 226–233
- [62] Liu X.W., Su Y., Zhu H., Cao J., Ding W.J., Zhao Y.C., He Q.J., Yang B.: HIF-1 α -dependent autophagy protects HeLa cells from fenretinide (4-HPR)-induced apoptosis in hypoxia. *Pharmacol. Res.*, 2010; 62: 416–425
- [63] Lomonaco S.L., Finniss S., Xiang C., Decarvalho A., Umansky F., Kalkanis S.N., Mikkelsen T., Brodie C.: The induction of autophagy by γ -radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells. *Int. J. Cancer*, 2009; 125: 717–722
- [64] Maiuri M.C., Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G.: Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007; 8: 741–752
- [65] Mariño G. i López-Otín C.: Autophagy: molecular mechanism, physiological functions and relevance in human pathology. *Cell Mol. Life Sci.*, 2004; 61: 1439–1454
- [66] Matsunaga K., Saitoh T., Tabata K., Omori H., Satoh T., Kurotori N., Maejima I., Shirahama-Noda K., Ichimura T., Isobe T., Akira S., Noda T., Yoshimori T.: Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat. Cell Biol.*, 2009; 11: 385–396
- [67] Maycotte P., Thorburn A.: Autophagy and cancer therapy. *Cancer Biol. Ther.*, 2011; 11: 127–137
- [68] Mehrpour M., Esclatine A., Beau I., Codogno P.: Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res.*, 2010; 20: 748–762
- [69] Mercer C.A., Kaliappan A., Dennis P.B.: A novel human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*, 2009; 5: 649–662

- [70] Mijaljica D., Prescott M., Devenish R.J.: Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, 2011; 7: 673–682
- [71] Mizushima N.: The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2010; 22: 132–139
- [72] Mizushima N., Levine B., Cuervo A., Klionsky D.J.: Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 2008; 451: 1069–1075
- [73] Mochizuki T., Asai A., Saito N., Tanaka S., Katagiri H., Asano T., Nakane M., Tamura A., Kuchino Y., Kitanaka C., Kirino T.: Akt protein kinase inhibitors non-apoptotic programmed cell death induced by ceramide. *J. Biol. Chem.*, 2001; 277: 2790–2797
- [74] Morselli E., Galluzzi L., Kepp O., Vicencio J.M., Criollo A., Maiuri M.C., Kroemer G.: Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Bioch. Biophys. Acta*, 2009; 1793: 1524–1532
- [75] Nakatogawa H., Suzuki K., Kamada Y., Ohsumi Y.: Dynamics and diversity in autophagy mechanism: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2009; 10: 458–467
- [76] Nishida Y., Arakawa S., Fujitani K., Yamaguchi H., Mizuta T., Kanaseki T., Komatsu M., Otsu K., Tsujimoto Y., Shimizu S.: Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature*, 2009; 461: 654–658
- [77] Pattingre S., Espert L., Biard-Piechaczyk M., Codogno P.: Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complex. *Biochimie*, 2008; 90: 313–323
- [78] Pattingre S., Levine B.: Bcl-2 inhibition of autophagy: A new route to cancer? *Cancer Res.*, 2006; 66: 2885–2888
- [79] Pattingre S., Tassa A., Qu X., Garuti R., Liang X.H., Mizushima N., Packer M., Schneider M.D., Levine B.: Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1 dependent autophagy. *Cell*, 2005; 122: 927–939
- [80] Ravikumar B., Moreau K., Jahreiss L., Puri C., Rubinsztein D.C.: Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat. Cell Biol.*, 2010; 12: 747–757
- [81] Ryan K.M.: p53 and autophagy in cancer: guardian of the genome meets guardian of the proteome. *Eur. J. Cancer*, 2011; 47: 44–50
- [82] Samadder J.S., Gaddy V.T., Duplantier J., Thandavan S.P., Shah M., Smith M.J., Barrett J.T., Scoenlein P.V.: A role for macroautophagy in protection against 4-hydroxytamoxifen-induced cell death and the development of antiestrogen resistance. *Mol. Cancer Ther.*, 2008; 7: 2977–2987
- [83] Shanmugam M., McBrayer S.K., Qian J., Raikoff K., Avram M.J., Singhal S., Gandhi V., Schumacker P.T., Krett N.L., Rosen S.T.: Targeting glucose consumption and autophagy in myeloma with the novel nucleoside analogue 8-aminoadenosine. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 26816–26830
- [84] Shingu T., Fujiwara K., Bogler O., Akiyama Y., Moritake K., Shinojima N., Tamada Y., Yokoyama T., Kondo S.: Stage-specific effect of inhibition of autophagy on chemotherapy-induced cytotoxicity. *Autophagy*, 2009; 5: 537–539
- [85] Shingu T., Fujiwara K., Bogler O., Akiyama Y., Moritake K., Shinojima N., Tamada Y., Yokoyama T., Kondo S.: Inhibition of autophagy at a late stage enhances imatinib-induced cytotoxicity in human malignant glioma cells. *Int. J. Cancer*, 2009; 124: 1060–1071
- [86] Shinojima N., Yokoyama T., Kondo Y., Kondo S.: Roles of the Akt/mTOR/p70S6K and ERK1/2 signaling pathways in curcumin-induced autophagy. *Autophagy*, 2007; 3: 635–637
- [87] Sun Q., Fan W., Chen K., Ding X., Chen S., Zhong Q.: Identification of Barkor as a mammalian autophagy – specific factor for Beclin1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 19211–19216
- [88] Tanaka Y., Guhde G., Suter A., Eskelinen E.L., Hartmann D., Lüllmann-Rauch R., Janssen P.M.L., Blanz J., von Figura K., Saftig P.: Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*, 2000; 406: 902–906
- [89] Tanida I.: Autophagy basics. *Microbiol. Immunol.*, 2011; 55: 1–11
- [90] Tanida I., Minematsu-Ikeguchi N., Ueno T., Kominami E.: Lysosomal turnover, but not a cellular level of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy*, 2005; 1: 84–91
- [91] Tasdemir E., Maiuri M.C., Galluzzi L., Vitale I., Djavaheri-Mergny M., D'Amelio M., Criollo A., Morselli E., Zhu C., Harper F., Nannmark U., Samara C., Pinton P., Vicencio J.M., Carnuccio R., Moll U.M., Madeo F., Paterlini-Brechot P., Rizzuto R., Szabadkai G., Pierron G., Blomgren K., Tavernarakis N., Codogno P., Cecconi F., Kroemer G.: Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat. Cell Biol.*, 2008; 10: 676–687
- [92] Tasdemir E., Maiuri M.C., Orhon I., Kepp O., Morselli E., Criollo A., Kroemer G.: p53 represses autophagy in a cell cycle-dependent fashion. *Cell Cycle*, 2008; 7: 3006–3011
- [93] Turcotte S., Giaccia A.J.: Targeting cancer cells through autophagy for anticancer therapy. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2010; 22: 246–251
- [94] Vazquez-Martin A., Oliveras-Ferreros C., Menendez J.A.: Autophagy facilitates the development of breast cancer resistance to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab. *PLoS One*, 2009; 4: e6251
- [95] Wang C., Wang Y., McNutt M.A., Zhu W.G.: Autophagy process is associated with anti-neoplastic function. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 2011; 43: 425–432
- [96] Wei Y., Sinha S., Levine B.: Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy*, 2008; 4: 949–951
- [97] Wirawan E., Vande Walle L., Kersse K., Cornelis S., Claeu S., Vanoverberghe I., Roelandt R., De Rycke R., Verspurten J., Declercq W., Agostinis P., Vanden Berghe T., Lippens S., Vandenberghe P.: Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of pro-apoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis.*, 2010; 1: e18
- [98] Wong C.H., Iskandar K.B., Yadav S.K., Hirpara J.L., Loh T., Pervaiz S.: Simultaneous induction of non-canonical autophagy and apoptosis in cancer cells by ROS-dependent ERK and JNK activation. *PLoS One*, 2010; 5: e9996
- [99] Yang Y.P., Liang Z.Q., Gu Z.L., Qin Z.H.: Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2005; 26: 1421–1434
- [100] Yang Z., Klionsky D.J.: Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2010; 22: 124–131
- [101] Yip K.W., Reed J.C.: Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*, 2008; 27: 6398–6406
- [102] Yousefi S., Perozzo R., Schmid I., Ziemiecki A., Schaffner T., Scapozza L., Brunner T., Simon H.U.: Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat. Cell Biol.*, 2006; 8: 1124–1132
- [103] Zalckvar E., Berissi H., Mizrachi L., Idelchuk Y., Koren I., Eisenstein M., Sabanay H., Pinkas-Kramarski R., Kimchi A.: DAP-kinase mediated phosphorylation on the BH3 domain of Beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO*, 2009; 10: 285–292
- [104] Zhong Y., Wang Q.J., Li X., Yan Y., Backer J.M., Chait B.T., Heintz N., Yue Z.: Distinct regulation of autophagic activity by Atg 14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat. Cell Biol.*, 2009; 11: 468–476
- [105] Zhou F., Yang Y., Xing D.: Bcl-2 and Bcl-XL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *FEBS J.*, 2011; 278: 403–413

Autorka deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.