

Received: 2012.12.21
Accepted: 2013.03.04
Published: 2013.05.20

Metody badania autofagii oparte na przemianach białek MAP1LC3 i p62/SQSTM1*

Detection of autophagy based on conversions of MAP1LC3 and p62/SQSTM1

Edyta Wysokińska, Wojciech Kałas

Laboratorium Immunobiologii Molekularnej Nowotworów
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu

Streszczenie

Autofagia jest procesem katabolicznym o fundamentalnym znaczeniu dla przetrwania okresów niedoborów składników odżywczych i w recyklingu organelli komórkowych. W ostatnim czasie obserwuje się bardzo znaczący wzrost zainteresowania badaniem autofagii, a zaburzenia w jej przebiegu towarzyszą wielu chorobom. Niestety, warsztat jakim dysponujemy w badaniu autofagii pozostaje stosunkowo mało znany i ubogi. W pracy omówiono najczęściej stosowane metody badania autofagii. Oprócz mikroskopii elektronowej przedstawiono metody (fluorescencyjne i Western blotting) oparte na obserwacji przemian białek MAP1LC3 i p62/SQSTM1 – należących do podstawowych markerów autofagii.

Słowa kluczowe:

MAP1LC3 • LC3 • autofagia • metody fluorescencyjne • Western blotting • p62/SQSTM1

Summary

Autophagy is a cellular process fundamental for the survival of nutrient deficiency periods and for organelle turnover. Recently much attention has been focused on autophagy as its impairment has been found in many human diseases. Unfortunately, our apparatus for study of the autophagy process is still unsatisfactory and not very well known. In this paper we would like to shed light on and discuss autophagy methods. We present the methods (fluorescence and Western blotting) based on conversions of MAP1LC3 and p62/SQSTM1 proteins, which are the most common markers of the autophagy process.

Keywords:

MAP1LC3 • LC3 • autophagy • fluorescence methods • Western blotting • p62/SQSTM1

Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1050029>

Word count:

2001

Tables:

–

Figures:

3

References:

34

*Praca powstała w ramach grantu 2011/01/B/NZ4/00938.

Adres autora: dr hab. Wojciech Kałas, prof. PAN, Laboratorium Immunobiologii Molekularnej Nowotworów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: kalas@iitd.pan.wroc.pl

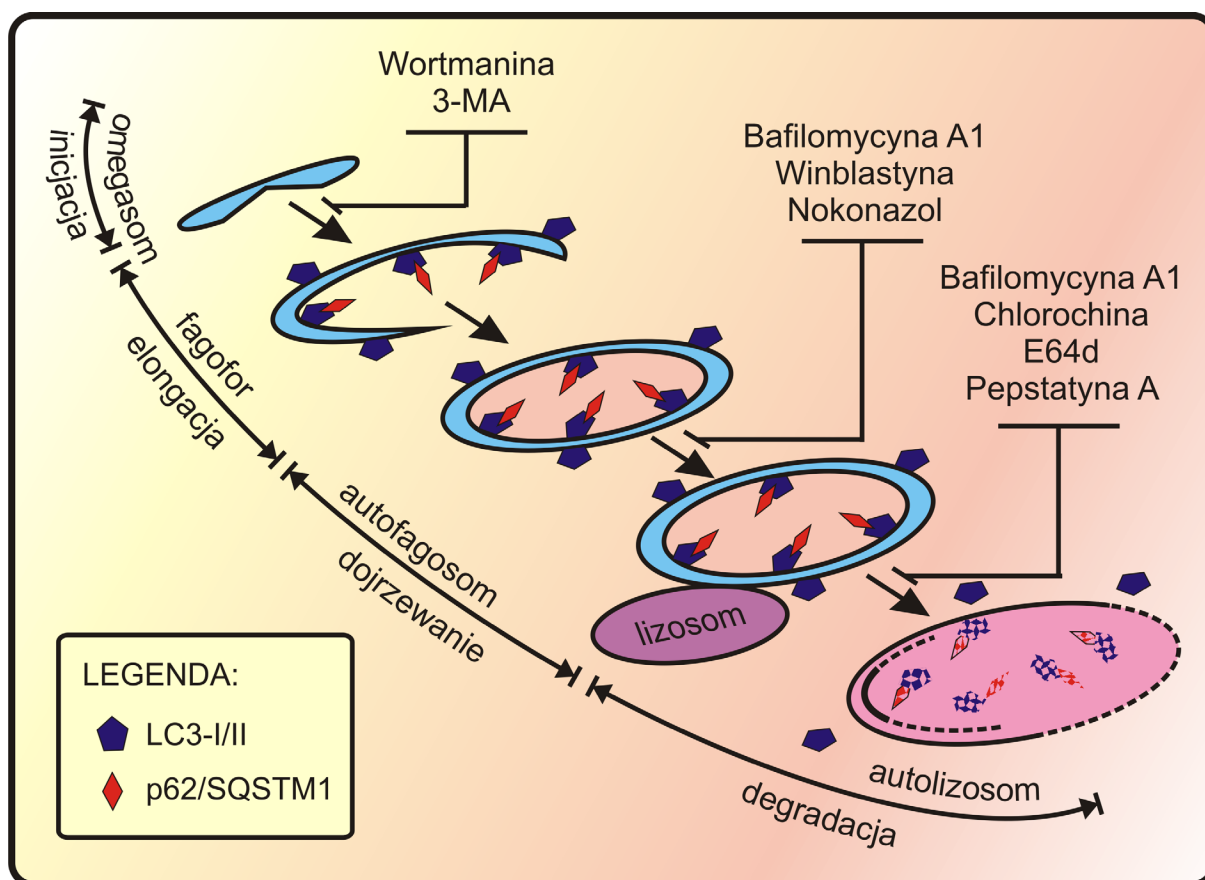
Wykaz skrótów: **3-MA** – 3-metyloadenina (3-methyladenine), **ATG12-ATG5-ATG16L** – geny związane z autofagią 12,5,16L (autophagy-related genes), **EGFP** – wzmacnione zielone białko fluorescencyjne (enhanced green fluorescent protein), **GFP** – zielone białko fluorescencyjne (green fluorescent protein), **MAP1LC3** – lekki łańcuch 3 białek związanych z mikrotubulami 1A/1B (microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3), **mTOR** – ssaczy cel rapamycyny, kinaza mTOR (mammalian target of rapamycin), **PE** – fosfatydyletanolamina (phosphatidylethanolamine), **RFP** – czerwone białko fluorescencyjne (red fluorescent protein), **SDS** – siarczan dodecylu sodu (sodium dodecyl sulfate), **SDS PAGE** – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z dodatkiem siarczanu dodecylu sodu (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).

WSTĘP

W ostatnim czasie obserwuje się bardzo znaczący wzrost zainteresowania badaniem autofagii. Zaburzenia procesu autofagii zaobserwowano w przebiegu chorób nowotworowych, neurodegeneracyjnych, a także w schorzeniach wieńcowo-naczyniowych i w zakażeniach drobnoustrojami [6,32]. Niestety, warsztat jakim dysponujemy w badaniu autofagii pozostaje stosunkowo ubogi. W pracy chcemy przybliżyć i omówić stosowane metody badania autofagii oparte na przemianie jednego z podstawowych markerów autofagii – białka LC3 (MAP1LC3 – microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3).

Autofagia jest procesem katabolicznym o fundamentalnym znaczeniu dla przetrwania okresów niedoborów składników odżywczych i w recyklingu organelli komórkowych [18]. Termin autofagia został wprowadzony w latach sześćdziesiątych ub.w. przez Christiana De Duve jako określenie trawienia części komórek w ich wnętrzu i pochodzi od greckiego słowa φαγεῖν (jeść) i przedrostka αὐτο- (sam, samo) i oznacza „samozjadanie” [12,15].

Można wyróżnić trzy typy autofagii: makroautofagię, mikroautofagię i autofagię zależną od białek opiekuńczych



Ryc. 1. Schematyczny przebieg procesu autofagii z uwzględnieniem degradacji białek LC3-I/LC3-II, p62/SQSTM1 i inhibitorów przydatnych w badaniu autofagii

[2,21]. W wielu pracach termin „autofagia” jest używany jako określenie makroautofagii, tak też będzie stosowany w naszej pracy.

OPIS PROCESU AUTOFAGII ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM PRZEMIAN BIAŁKA LC3

Proces autofagii można podzielić na cztery etapy (ryc. 1):

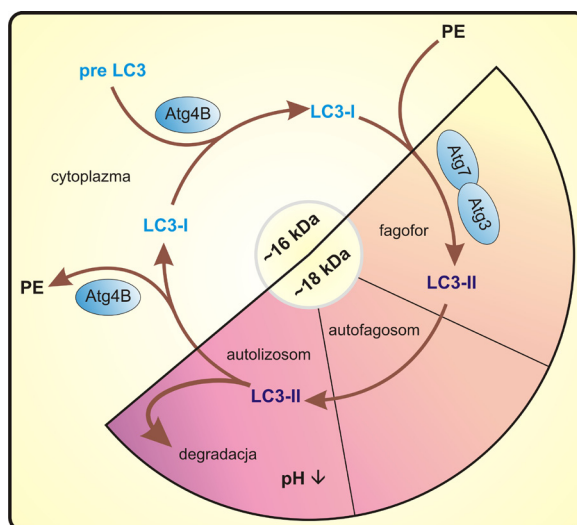
- inicjację – podczas której z fragmentu membrany tworzony jest omegasom,
- elongację – obejmuje tworzenie się fagoforu, jego powiększanie i zamknięcie wraz z zawartością – czyli kształtowanie się autofagosomu,
- dojrzewanie autofagosomu – gdy następuje fuzja ze wewnętrzną błoną autofagosomu z lizosomem i powstaje autolizosom,
- degradację autolizosomu – ostateczny etap autofagii, podczas którego zawartość autolizosomu jest degradowana przez enzymy lizosomalne i uwalniana do cytoplazmy [17,30].

Procesy te regulują białka kodowane przez geny ATG (autophagy-related genes), które zostały dokładnie scharakteryzowane u drożdży, a ich funkcje w dużym stopniu można odnieść do komórek eukariotycznych [2].

Indukcja autofagii jest złożonym procesem, w którym główną rolę odgrywa kompleks białka mTOR i jest ona szczegółowo opisana w literaturze [2,6,26]. Podczas inicjacji następuje formowanie się omegasomu z membran komórkowych. Źródłem błony komórkowej służącej jako zaczątek omegasomu mogą być aparat Golgiego, retikulum endoplazmatyczne, błona komórkowa lub mitochondrialna [15,25].

W czasie wydłużania fagoforu przyłącza się do niego białko LC3, będące ssaczym homologiem białka Atg8 obecnego w *Saccharomyces cerevisiae* [30]. Aby białko LC3 mogło się przyłączyć do fagoforu, musi ulec modyfikacji (ryc. 2). Polega to na odcięciu przez białko Atg4B C-końcowego fragmentu LC3 w taki sposób, że dochodzi do ekspozycji reszty glicyny i powstania tzw. postaci cytosolowej LC3-I. W czasie przebiegu autofagii z udziałem Atg7 i Atg3 oraz kompleksu Atg12-Atg5-Atg16L zachodzi koniugacja LC3-I z fosfatydyloetanoliną (PE) za pośrednictwem wyeksponowanej reszty glicyny. Powstała w ten sposób lipidowa postać LC3 - LC3-II [10] zdolna jest do połączenia się z wewnętrzną i zewnętrzną błoną fagoforu [9,14]. Dodatkowo, LC3-II znajdujące się na fagoforze jest zaangażowane w interakcję z białkiem p62/SQTM1 biorącym udział w załadunku autofagosomu. Białko p62/SQTM1, poprzez domenę UBA (ubiquitin-associated domain) zlokalizowaną na C-końcu łączy się ze składnikami komórki przeznaczonymi do degradacji [4], umiejscawiając je, wraz z LC3-II, po wewnętrznej stronie fagoforu [8]. W wyniku elongacji następuje zamknięcie fagoforu i powstaje autofagosom – struktura, która podwójną membraną otacza składniki komórki przeznaczone do degradacji. Po zamknięciu się fagoforu kompleks Atg12-Atg5-Atg16L stopniowo oddziela się od autofagosomu i następuje fuzja

autofagosomu z lizosomem. W jej wyniku powstaje autolizosom, którego zawartość wraz z LC3-II i p62/SQTM1 jest degradowana przez katepsyny i lipazy [30]. Produkty trawienia zawartych w autolizosomie składników komórki, w postaci najprostszych molekuł, takich jak aminokwasy, kwasy tłuszczowe, nukleotydy są uwalniane z powrotem do cytoplazmy i mogą zostać wykorzystane ponownie [10]. W rezultacie poziom LC3-II i p62/SQTM1 wewnątrz autolizosomu maleje po procesie autofagii (ryc. 2). Natomiast LC3-II znajdujące się na zewnątrz membrany zostaje uwolnione przez Atg4B i ponownie przekształcone w postać LC3-I [ryc. 2]



Ryc. 2. Transformacje białka LC3, do których dochodzi w czasie przebiegu autofagii. PE: fosfatydyloetanoliną

METODY BADANIA AUTOFAGII

Mikroskopia elektronowa

Pierwszą metodą obserwacji autofagii była transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM). Nadal pozostaje ona najbardziej niezawodną i czułą metodą obserwacji autofagii. Polega na wykrywaniu i identyfikacji otoczonych podwójną membraną autofagosomów, zawierających fragmenty nienaruszonych organelli i otoczonych pojedynczą błoną kwaśnych autolizosomów [1,20]. TEM umożliwia przede wszystkim jakościową analizę autofagii, jednak są podejmowane próby ilościowego badania autofagii za pomocą tej metody [1]. Podstawową zaletą mikroskopii elektronowej jest bezpośrednia obserwacja autofagosomów, natomiast niewątpliwą wadą jest trudność w różnieniu autofagosomów i autolizosomów od innych podobnych struktur wewnątrzkomórkowych (np. mitochondriów i lizosomów) [5,13] i wymaga dużego doświadczenia. Inną przeszkodą w stosowaniu tej metody jest to, że mikroskop elektronowy nie należy do standardowego instrumentarium biologii molekularnej. Z tego względu dużą popularność zyskały metody oparte na molekularnych markerach autofagii.

Przemiany LC3 badane metodą Western blotting

Przemiany i translokacje białka LC3 są podstawą większości metod wykrywania autofagii. Wśród nich jedną z najbardziej znanych jest wykrywanie różnych postaci białka LC3 - LC3-I i LC3-II metodą Western blotting. W komórkach ssaków występują trzy izoformy białka LC3 - LC3A, LC3B oraz LC3C. Ich dystrybucja jest różna w zależności od rodzaju tkanki [7]. W badaniu Western blotting oraz w metodach opartych o immunofluorescencję zaleca się używanie przeciwciała anty-LC3B [14]. W czasie przebiegu autofagii obecne w cytosolu LC3-I zostaje zmodyfikowane jak opisano to wyżej w postać lipidową LC3-II. W procedurze SDS-PAGE Western blotting LC3-II migruje szybciej niż LC3-I. W ten sposób w obrazie Western blotting uzyskuje się dwa oddzielne prążki LC3-II (16 kD) oraz LC3-I (18 kD) [22]. Wzrost ekspresji LC3-II można interpretować jako następstwo aktywacji procesu autofagii, natomiast poziom ekspresji LC3-II zazwyczaj odzwierciedla liczbę autofagosomów [9,23]. Należy jednak pamiętać, że wzrost ekspresji LC3-II nie jest trwały. Po utworzeniu autolizosomów poziom LC3-II zmniejsza się na skutek degradacji LC3-II znajdującego się wewnątrz autolizosomów. Jego poziom obniża się także w wyniku rekonwersji przez białko Atg4B postaci LC3-II znajdującej się po zewnętrznej stronie autolizosomu w LC3-I [14]. W związku z tym, w ocenie autofagii odpowiednie dobranie czasu traktowania LC3-II jest krytyczne dla właściwej interpretacji wyników Western blotting LC-II/LC3-I. Aby uniknąć tego problemu niektórzy autorzy zalecają stosowanie inhibitorów proteaz lizosomalnych [14,31]. Pozwala to na łatwiejszą obserwację akumulacji postaci LC3-II – wskazującej na powstawanie autolizosomów, gdyż nie dochodzi wtedy do jego degradacji wewnątrz autolizosomów.

Ponieważ często przedmiotem analizy jest relacja ilościowa LC3-II w LC3-I należy zwrócić uwagę na odpowiednie przygotowanie próbek. Częstym zaleceniem jest korzystanie z frakcji cytoplazmatycznej, a nie z lizatu całokomórkowego [14]. Lizaty muszą być podgrzane do temperatury 95-98°C w obecności 1% SDS w celu całkowitej i jednakowej solubilizacji obu postaci LC3, ponieważ np. 1% Triton X100 tylko częściowo rozpuszcza LC3-II [32]. Warto także zwrócić uwagę na wrażliwość LC3-I na wielokrotne zamrażanie i na degradację LC3-I pod wpływem SDS. Z tego względu nie zaleca się powtórnego zamrażania lizatów [14].

Przeprowadzając analizę ekspresji białka LC3 metodą Western blotting należy uwzględnić to, że linie komórkowe mogą się różnić między sobą poziomem białka LC3-II. W liniach nowotworowych HeLa, A431, MDA-MB-231 nawet w optymalnych warunkach hodowli stwierdza się obecność LC3-II [31].

W analizie wzajemnego stosunku ekspresji LC3-II/LC3-I niebagatelnym źródłem błędów może być różna zdolność wiązania się przeciwciała anty-LC3 z jego lipidową postacią LC3-II i cytosolową LC3-I [22].

Stąd wniosek, że ze względu na wiele źródeł artefaktów, doświadczenia mające na celu analizę ekspresji LC3-I i LC3-II metodą Western blotting należy bardzo dokładnie planować i ostrożnie analizować.

Zmiany ekspresji p62/SQSTM1 jako marker przebiegu autofagii

Alternatywnym białkiem stosowanym do oceny przebiegu autofagii metodą Western blotting jest białko p62/SQSTM1, które jest wielodomenowym białkiem adaptorowym o wielu funkcjach. Załadowane polibikwitynowanymi białkami p62/SQSTM1 za pomocą domeny LRS/LIR (LC3 recognition sequence/LC3-interacting region) wiąże się z LC3-II i wraz z nim umieszcza się po wewnętrznej stronie fagoforu [8,16,24]. Po zamknięciu się autofagosomu i jego fuzji z lizosomem p62/SQSTM1 znajdujące się wewnątrz autolizosomu jest degradowane wraz z innymi białkami [3]. W ten sposób obserwowany metodą Western blotting spadek ekspresji p62/SQSTM1 można przypisać aktywnemu procesowi autofagii [14]. Badając ekspresję p62/SQSTM1 należy jednak pamiętać, że białko to ma wiele funkcji niezwiązanych z samą egzekucją procesu autofagii i jego ekspresja może ulegać zmianom pod wpływem stresu oksydacyjnego i reaktywnych form tlenu [24]. Nie jest również pewne czy p62/SQSTM1 jest degradowane jedynie w procesie autofagii czy także przez system proteasomu [14]. Dlatego dobrą praktyką przy badaniu zmian ekspresji p62/SQSTM1 związanych z autofagią jest skorzystanie z inhibitorów autofagii zapobiegających degradacji białek w autolizosomie np. Bafilomycyny A1 (ryc. 1). Indukcja autofagii w obecności Bafilomycyny A1 prowadzi wtedy do kumulacji p62/SQSTM1, a różnicę ekspresji p62/SQSTM1 w komórkach nietraktowanych i traktowanych Bafilomycyną A1 można przypisywać „natężeniu autofagii” (autophagy flux) [3]. W licznych badaniach wyniki uzyskane po zastosowaniu p62/SQSTM1 korelują z innymi parametrami świadczącymi o przebiegu autofagii, co potwierdza użyteczność tej metody w jej badaniu.

Przemiany LC3 badane metodami fluorescencyjnymi

Kolejną metodą analizy autofagii z pomocą białka LC3 jest mikroskopia fluorescencyjna. W swojej najprostszej wersji polega na jedno- lub dwustopniowym barwieniu preparatów na obecność białka LC3. Analiza obrazu fluorescencyjnego opiera się na określeniu wzrostu punktowego gromadzenia się znakowanego białka LC3, co odpowiada formowaniu się autofagosomu. Należy jednak pamiętać, iż LC3-II nie łączy się tylko z błoną autofagosomu, może także występować na fagoforze, a poziom jego ekspresji może wzrastać nawet wtedy, gdy nie prowadzi to do utworzenia autofagosomu [14].

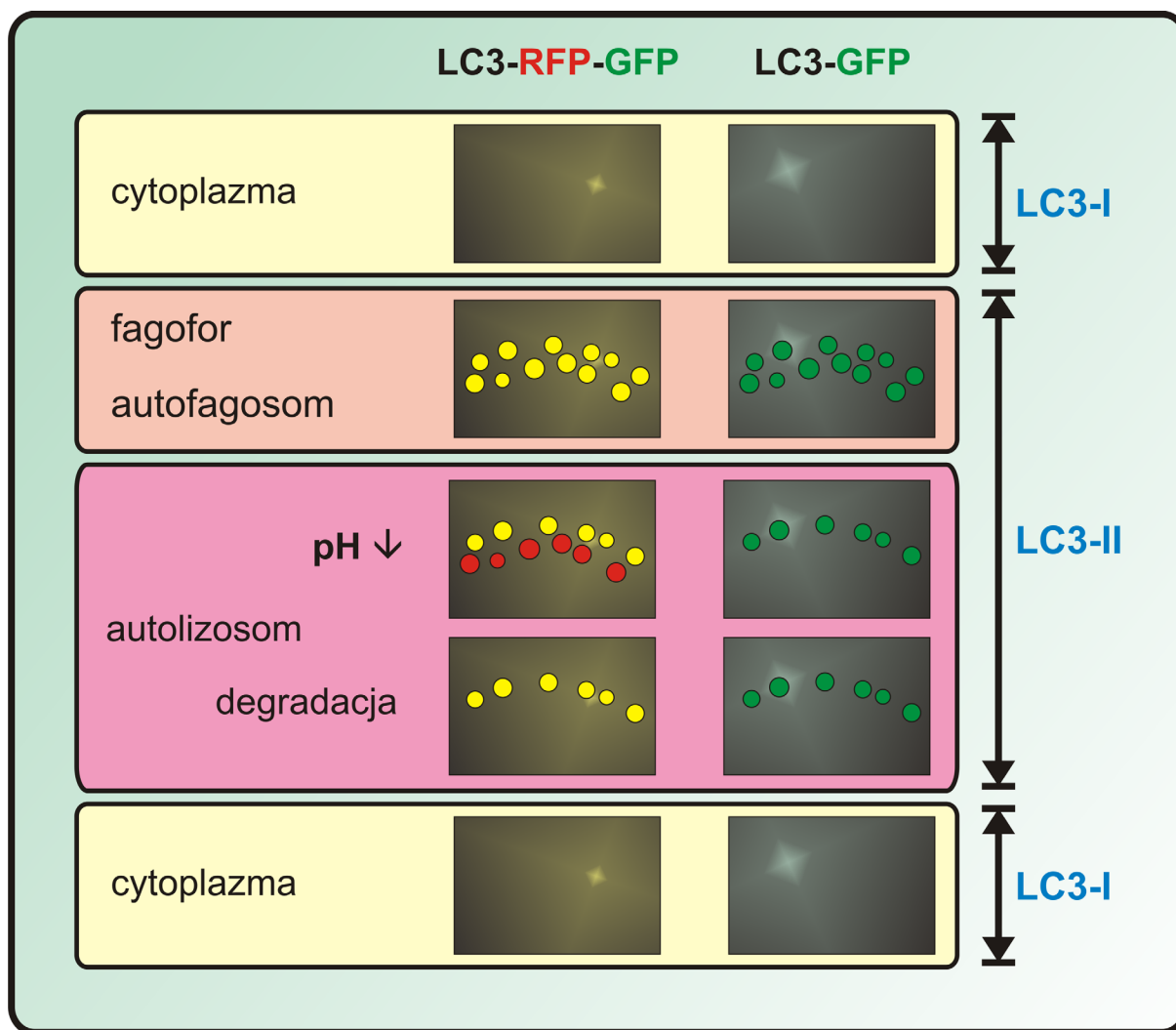
Bardziej zaawansowaną wersją tej metody jest zastosowanie białka fuzyjnego LC3 połączonego z białkiem fluorescencyjnym GFP. Konstrukty taki pozwala na obserwa-

cję powstawania autofagosomów, w podobny sposób jak w barwieniu przeciwciałem, uwidocznionych jako punkty gromadzenia się znakowanego białka LC3. Natomiast podczas łączenia się autofagosomu z lizosomem GFP jest degradowane, a sygnał pochodzący od niego wygaszany (ryc. 3). Jest to spowodowane małą stabilnością białka GFP w warunkach niskiego pH, jakie występuje w lizosomach (pH około 5,0) [11]. Zatem zastosowanie GFP ogranicza badanie procesu autofagii do czasu powstania autolizosomu. Problem ten częściowo można ominąć przez zastosowanie konstruktów białka LC3 z innymi białkami fluorescencyjnymi, o większej stabilności w kwaśnym środowisku. Do takich białek należą, np. RFP (red fluorescence protein) lub mCherry [27]. Inną metodą poradzenia sobie z zanikiem fluorescencji w autolizosomie jest zastosowanie inhibitorów autofagii lub inhibitorów proteaz lizosomalnych (ryc. 1). Wtedy to, podobnie jak w przypadku Western blotting, będzie dochodziło do akumulacji LC3-II i autolizosomów.

Należy wspomnieć, że pewne trudności w analizie sprawia ustalenie wielkości agregatu LC3, który będzie

świadczą o autofagii, a dodatkowym utrudnieniem jest zdolność GFP-LC3 i prawdopodobnie również i innych białek fuzyjnych, do łączenia się z ubikwitynowanymi agregatami białkowymi [4]. Jedną z przyczyn tego zjawiska może być nadekspresja konstruktów po przejściowej transfekcji [11], a także stres komórkowy związany z samą transfekcją [29]. Dlatego często zalecanym sposobem uniknięcia tego artefaktu jest stosowanie stabilnych transfektantów [14]. Pewnym sposobem uniknięcia problemów interpretacyjnych związanych z użyciem konstruktów LC3 z białkami fluorescencyjnymi jest użycie kontrolnego konstruktów ze zmutowanym białkiem LC3 (LC3ΔG), z którego została usunięta glicyna odpowiedzialna za lipidację. Pozwala to na obserwację nieswoistych oddziaływań konstruktów niezwiązanych z przebiegiem procesu autofagii [33].

Udoskonaloną metodą monitorowania autofagii opartą na przemianach i translokacjach białka LC3 jest zastosowanie białka fuzyjnego z dwoma białkami fluorescencyjnymi, o różnej barwie i różniących się stabilnością w zakwaszonym środowisku. Wykorzystuje ona zjawisko małej



Ryc. 3. Zasada działania białek fuzyjnych LC3-RFP-GFP oraz LC3-GFP jako markerów autofagii

stabilności GFP w kwaśnym środowisku autolizosomu. Dzięki temu możliwe jest monitorowanie powstawania fagoforu i autofagosomu, jego fuzji z lizosomem i późniejszego rozpadu białek.

Przykładem takiego tandemu jest mRFP-GFP-LC3. Po nałożeniu na siebie obrazów zielonej i czerwonej fluorescencji obecność żółtych punktów pochodzących ze wspólnego świecenia GFP i mRFP wskazuje na powstawanie autofagosomów. Następnie w czasie przebiegu autofagii pojawiają się czerwone punkty, które świadczą o obecności autolizosomów, wewnątrz których fluorescencja GFP jest wygaszona na skutek niskiego pH. Natomiast przy trawieniu zawartości autolizosomu zanika również czerwona fluorescencja (ryc. 3) [11].

Podobnie jak w przypadku użycia techniki Western blotting, aby uniknąć problemów z odpowiednim dobraniem czasu obserwacji możemy posłużyć się inhibitorami fuzji autofagosomu z lizosomem lub inhibitorami proteaz lizosomalnych (ryc. 1). I tak, jeśli zablokujemy powstawanie autolizosomów np. przez użycie Bafilomycyny A1 będziemy obserwować tylko wzrost liczby żółtych punktów związanych z powstawaniem autofagosomów, natomiast powstawanie czerwonych punktów związanych

z degradacją GFP zostanie zahamowane [11]. Na tej samej zasadzie działa również inne białko reporterowe, w którym GFP zastąpiono zielonym białkiem mWasabi, a jego fluorescencja jest jeszcze bardziej wygaszana w kwaśnym środowisku [34].

Badania z użyciem białek fuzyjnych LC3 z białkami fluorescencyjnymi można prowadzić również wykorzystując cytometrię przepływową. W przypadku konstruktu LC3-GFP można obserwować spadek fluorescencji związany z wygaszaniem aktywności GFP podczas fuzji autofagosomu z lizosomem [19,28].

Podobnie jak w przypadku mikroskopii fluorescencyjnej w cytometrii przepływowej również wykorzystywane są tandemy fluorescencyjne złożone z białek o różnej wrażliwości na pH środowiska. Zasada ich działania oraz łączenia kilku białek fluorescencyjnych jest taka sama. Zaletą zastosowania cytometrii przepływowej jest możliwość ilościowej analizy obserwowanego zjawiska.

Biorąc pod uwagę brak uniwersalnego/idealnego białka, na którym można oprzeć wyniki warto potwierdzić je wykrywając jednocześnie inne białko, bądź wykorzystać dodatkową metodę badania autofagii.

PIŚMIENICTWO

- [1] Barth S., Glick D., Macleod K.F.: Autophagy: assays and artifacts. *J. Pathol.*, 2010; 221: 117-124
- [2] Benbrook D.M., Long A.: Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis. *Exp. Oncol.*, 2012; 34: 286-297
- [3] Bjørkøy G., Lamark T., Pankiv S., Øvervatn A., Brech A., Johansen T.: Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol.*, 2009; 452: 181-197
- [4] Clausen T.H., Lamark T., Isakson P., Finley K., Larsen K.B., Brech A., Øvervatn A., Stenmark H., Bjørkøy G., Simonsen A., Johansen T.: p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. *Autophagy*, 2010; 6: 330-344
- [5] Eskelinen E.L.: To be or not to be? Examples of incorrect identification of autophagic compartments in conventional transmission electron microscopy of mammalian cells. *Autophagy*, 2008; 4: 257-260
- [6] He C., Klionsky D.J.: Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.*, 2009; 43: 67-93
- [7] He H., Dang Y., Dai F., Guo Z., Wu J., She X., Pei Y., Chen Y., Ling W., Wu C., Zhao S., Liu J.O., Yu L.: Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 29278-29287
- [8] Ichimura Y., Komatsu M.: Selective degradation of p62 by autophagy. *Semin. Immunopathol.*, 2010; 32: 431-436
- [9] Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T., Kominami E., Ohsumi Y., Yoshimori T.: LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.*, 2000; 19: 5720-5728
- [10] Kimmelman A.C.: The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev.*, 2011; 25: 1999-2010
- [11] Kimura S., Noda T., Yoshimori T.: Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy*, 2007; 3: 452-460
- [12] Klionsky D.J.: Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy*, 2008; 4: 740-743
- [13] Klionsky D.J., Abdalla F.C., Abeliovich H., Abraham R.T., Acevedo-Arozena A., Adeli K., Agholme L., Agnello M., Agostinis P., Aguirre-Ghiso J.A., Ahn H.J., Ait-Mohamed O., Ait-Si-Ali S., Akematsu T., Akira S. i wsp.: Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 2012; 8: 445-544
- [14] 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. i wsp.: Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 2008; 4: 151-175
- [15] Knævelsrud H., Simonsen A.: Lipids in autophagy: constituents, signaling molecules and cargo with relevance to disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1821: 1133-1145
- [16] Komatsu M., Kageyama S., Ichimura Y.: p62/SQSTM1/A170: physiology and pathology. *Pharmacol. Res.*, 2012; 66: 457-462
- [17] Kost A., Kasprowska D., Labuzek K., Wiaderekiewicz R., Gabryel B.: Autofagia w niedokrwieniu mózgu. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 524-533
- [18] Kubli D.A., Gustafsson Å.B.: Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ. Res.*, 2012; 111: 1208-1221
- [19] Lee J.S., Lee G.M.: Monitoring of autophagy in Chinese hamster ovary cells using flow cytometry. *Methods*, 2012; 56: 375-382
- [20] Martinet W., Schrijvers D.M., Timmermans J.P., Bult H., De Meyer G.R.: Immunohistochemical analysis of macroautophagy: recommendations and limitations. *Autophagy*, 2013; 9: 386-402

- [21] Mizushima N., Ohsumi Y., Yoshimori T.: Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.*, 2002; 27: 421-429
- [22] Mizushima N., Yoshimori T.: How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 2007; 3: 542-545
- [23] Mizushima N., Yoshimori T., Levine B.: Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 2010; 140: 313-326
- [24] Moscat J., Diaz-Meco M.T.: p62: a versatile multitasker takes on cancer. *Trends Biochem. Sci.*, 2012; 37: 230-236
- [25] Orsi A., Polson H.E., Tooze S.A.: Membrane trafficking events that partake in autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2010; 22: 150-156
- [26] Polewska J.: Autofagia – mechanizm molekularny, apoptoza i nowotwory. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2012; 66: 921-936
- [27] Shaner N.C., Steinbach P.A., Tsien R.Y.: A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods*, 2005; 2: 905-909
- [28] Shvets E., Fass E., Elazar Z.: Utilizing flow cytometry to monitor autophagy in living mammalian cells. *Autophagy*, 2008; 4: 621-628
- [29] Szeto J., Kaniuk N.A., Canadien V., Nisman R., Mizushima N., Yoshimori T., Bazett-Jones D.P., Brumell J.H.: ALIS are stress-induced protein storage compartments for substrates of the proteasome and autophagy. *Autophagy*, 2006; 2: 189-199
- [30] Tanida I.: Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid. Redox Signal.*, 2011; 14: 2201-2214
- [31] 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
- [32] Tanida I., Ueno T., Kominami E.: LC3 and autophagy. *Methods Mol. Biol.*, 2008; 445: 77-88
- [33] Tanida I., Yamaji T., Ueno T., Ishiura S., Kominami E., Hanada K.: Consideration about negative controls for LC3 and expression vectors for four colored fluorescent protein-LC3 negative controls. *Autophagy*, 2008; 4: 131-134
- [34] Zhou C., Zhong W., Zhou J., Sheng F., Fang Z., Wei Y., Chen Y., Deng X., Xia B., Lin J.: Monitoring autophagic flux by an improved tandem fluorescent-tagged LC3 (mTagRFP-mWasabi-LC3) reveals that high-dose rapamycin impairs autophagic flux in cancer cells. *Autophagy*, 2012; 8: 1215-1226

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.