

Received: 2012.12.18  
Accepted: 2013.03.08  
Published: 2013.05.09

## Autofagia i białko BNIP3 w nowotworach\*

### Autophagy and BNIP3 protein in tumorigenesis

Ewelina Świderek, Leon Strządała

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

#### Streszczenie

Autofagia jest procesem niezbędnym do utrzymania homeostazy komórek w warunkach fizjologicznych, a także pod wpływem czynników stresowych, np. niedoboru składników odżywczych lub tlenu. Autofagia odgrywa także istotną rolę w procesie nowotworzenia, z jednej strony zapobiegając transformacji nowotworowej komórek, z drugiej zaś zapewniając komórkom nowotworowym możliwość adaptacji do niekorzystnych warunków oraz zwiększonego zapotrzebowania na glukozę, wspomagając utrzymanie metabolizmu komórkowego oraz przyspieszając wzrost guzów nowotworowych. Dotyczy to między innymi komórek transformowanych onkogenem Ras. W świetle ostatnich badań, BNIP3 wyłania się jako jedno z kluczowych białek w procesie autofagii. Białko to, choć zaliczane do grupy proapoptotycznych białek BOP (BH3-only proteins), wykazuje słabą aktywność proapoptotyczną, ma jednak zdolność indukcji bądź stymulacji autofagii oraz jej swoistej odmiany - mitofagii. W pracy omówiono rolę białka BNIP3 w autofagii, a także znaczenie tego procesu w progresji choroby nowotworowej. W sposób szczególny natomiast zwrócono uwagę na powiązanie pomiędzy autofagią a ekspresją BNIP3 indukowanymi pod wpływem aktywacji onkogenu Ras.

**Słowa kluczowe:** BNIP3 • autofagia • mitofagia • nowotwory

#### Summary

Autophagy is a process necessary for maintaining cell homeostasis in physiological conditions, as well as during certain stresses like nutrients or oxygen deprivation. Autophagy also plays an essential role in tumorigenesis. It prevents cell transformation, but on the other hand, autophagy enables existing cancer cells to adapt to harmful conditions and increased glucose demand, supports maintaining of cellular metabolism and accelerates tumor growth. Among others, it refers to Ras-transformed cells. Recent research unveiled BNIP3 protein as one of the key players involved in autophagy. Although BNIP3 is classified as proapoptotic member of BH3-only subfamily, its proapoptotic activity is questionable. However, BNIP3 demonstrates ability to induce or stimulate autophagy and its specific variant - mitophagy. This paper aims to summarize the existing body of knowledge related to the role of BNIP3 in autophagy, as well as the importance of this process in tumorigenesis. In particular, we emphasize the relation between autophagy and BNIP3 expression induced by Ras oncogene.

**Keywords:** BNIP3 • autophagy • mitophagy • cancer

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1048712>

**Word count:** 2435  
**Tables:** –  
**Figures:** 2  
**References:** 49

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

**Adres autorki:** dr Ewelina Świderek, Laboratorium Immunobiologii Molekularnej Nowotworów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: swoboda@iitd.pan.wroc.pl

**Wykaz skrótów:** **Atg8** – gen związany z autofagią 8 (autophagy-related gen 8); **BH3** – domena homologii z Bcl-2 3 (Bcl-2 homology 3); **BNIP3** – białko wiążące Bcl-2 i adenowirusowe białko E1B-19 kDa 3 (Bcl-2/adenovirus E1B-19 kDa interacting protein 3); **BNIP3L** – białko podobne do BNIP3 (BNIP3-like); **BOP** – białka mające wyłącznie domenę BH3 (BH3-only proteins); **HIF-1** – czynnik indukowany hipoksją 1 (hypoxia-inducible factor 1); **LC3** – białko związane z mikrotubulami (microtubule-associated protein light chain 3); **LIR** – region reagujący z białkiem LC3 (LC3-interacting region); **MALM** – akumulacja organelli podobnych do lizosomów wewnątrz mitochondriów indukowana przez białko Miep (Mieap-induced accumulation of lysosome-like organelles within mitochondria); **mTOR** – ssaczy cel rapamycyny (mammalian target of rapamycin); **NO** – tlenek azotu (nitric oxide); **PE** – fosfatydyloetanolamina (phosphatidylethanolamine); **PI3** – 3-kinaza fosfatydyloinozytolu (phosphatidylinositol 3-kinase); **ROS** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species); **TM** – (domena) transmembranowa (transmembrane (domain)).

## BIAŁKO BNIP3

BNIP3 (Bcl-2/adenovirus E1B-19kDa interacting protein 3, wcześniej Nip3) należy do rodziny białek Bcl-2, regulujących procesy programowanej śmierci komórek. Ze względu na obecność w jego strukturze jednej domeny BH (Bcl-2 homology) - BH3 [45], BNIP3 został zaliczony do podrodziny BOP (BH3-only proteins), obejmującej białka proapoptotyczne [21,40]. W związku z tym, wczesne badania nad funkcją tego białka były skoncentrowane na poszukiwaniu jego funkcji proapoptotycznych. Wykazano, że BNIP3 może indukować śmierć niektórych typów komórek prawidłowych, jak i nowotworowych (fibroblastów, komórek nabłonka ludzkiej nerki HEK 293T, komórek ludzkiego raka gruczołu sutkowego MCF-7) [10,43], jednak w większości przypadków nie obserwuje się aktywacji klasycznej apoptozy. Ginące komórki wykazują natomiast biochemiczne oraz morfologiczne cechy nekrozy, m.in. zwiększoną przepuszczalność błony komórkowej, powiększenie mitochondriów, spadek potencjału mitochondrialnego związany z nadmiernym wytwarzaniem reaktywnych form tlenu (ROS - reactive oxygen species). Dla obserwowanej śmierci komórkowej zaproponowano nazwę „necrosis-like” [43], później określono ją także terminem programowana nekroza [13]. Dalsze doniesienia wskazują jednak na niewielką aktywność proapoptotyczną białka BNIP3 lub jej brak. Zwłaszcza domena BH3 białka BNIP3 wykazuje nieistotną aktywność proapoptotyczną [48] w odróżnieniu od BH3 innych białek BOP.

W strukturze BNIP3 zidentyfikowano także domenę transmembranową TM, odpowiadającą za zachowanie jego lokalizacji mitochondrialnej [10], a także homodimeryzację w błonie mitochondrium. Obserwowaną niewielką aktywność proapoptotyczną białka BNIP3 przypisuje się działaniu domeny TM [10,38], jednak mechanizm indukcji programowanej śmierci za jej pośrednictwem pozostaje nieznan [40].

BNIP3 w warunkach fizjologicznych ulega ekspresji tylko w niektórych typach komórek: kardiomiocytach [19,28], komórkach mięśni szkieletowych [43], komórkach trzust-

ki i wątroby [35], chondrocytach [15], komórkach glejowych [8]. Jego ekspresja może być jednak indukowana pod wpływem różnych czynników, np. hipoksji, na drodze zależnej od czynnika transkrypcyjnego HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) [7,17] lub tlenku azotu (NO) [2,46]; może się także zmieniać w komórkach nowotworowych w porównaniu z komórkami prawidłowymi [5,9,33,35,41]. Zgodnie z tym, co napisano wyżej, ekspresja BNIP3 jest często obserwowana w komórkach niewykazujących oznak śmierci, dotyczy to zarówno komórek nowotworowych, jak i prawidłowych, także w hipoksji [32,36,42]. Pytaniem pozostaje zatem, jaką funkcję pełni BNIP3 w tych komórkach.

W ostatnich latach wykazano związki białka BNIP3 z procesem autofagii, przede wszystkim w hipoksji [6,47], jednak jego rola w tym procesie jest wciąż niewyjaśniona.

## PRZEBIEG I ZNACZENIE AUTOFAGII

Autofagia to proces samotrąwienia komórki, podczas którego porcje cytoplazmy wraz z organellami są zamykane w pęcherzyku zwanym autofagosomem. Pęcherzyk ulegając fuzji z lizosomem tworzy autolizosom, po czym enzymy lizosomalne trawią jego zawartość. Produkty powstałe w wyniku trawienia są ponownie wykorzystywane przez komórkę, głównie jako materiał energetyczny i budulcowy [3]. Autofagia zachodzi w większości komórek na niskim poziomie, co pozwala na bieżące usuwanie powstających w komórkach agregatów białkowych i uszkodzonych organelli. W pewnych warunkach autofagia ulega jednak stymulacji. Dotąd najlepiej scharakteryzowano autofagię aktywowaną w odpowiedzi na niedobór składników odżywczych. Wykazano także, że hipoksja, której konsekwencją jest niedobór energii, również prowadzi do aktywacji procesu autofagii [4].

Ponadto, autofagię zdefiniowano jako programowaną śmierć komórkową typu II, ponieważ w ginących komórkach stwierdza się często zwiększoną liczbę auto-

fagosomów. Wątpliwe jest jednak, aby śmierć komórek faktycznie następowała z powodu samostrawienia. Autofagia jest prawdopodobnie procesem towarzyszącym śmierci komórki, indukowanym jako próba uniknięcia śmierci, ponieważ jest to mechanizm przede wszystkim ochronny [14,20].

Proces autofagii można podzielić na 4 zasadnicze fazy: inicjację, elongację fagoforu, dojrzewanie autofagosomu oraz jego fuzję z lizosomem i trawienie zawartości, a w jego regulację i przebieg zaangażowane są produkty ponad 30 genów. Do inicjacji procesu niezbędna jest aktywność kinazy PI3 klasy III (Vps34), która oddziałuje z Bekliną 1, kluczowym białkiem kompleksu regulującego autofagię. Aktywność Bekliny 1, należącej do podrodziny BOP, może być hamowana przez oddziaływanie z antyapoptotycznymi białkami Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub>. Podwójna błona autofagosomu, zwana początkowo fagoforem, powstaje przez fuzję niewielkich pęcherzyków pochodzących przede wszystkim z retikulum endoplazmatycznego. Jednym z białek niezbędnych do elongacji fagoforu jest LC3, syntetyzowane w postaci prekursora, a następnie przekształcane przez cięcie proteolityczne do formy LC3-I, która z kolei ulega modyfikacji przez przyłączenie fosfatydyloetanolaminy (PE). W wyniku tej modyfikacji powstaje forma LC3-II, która może być przyłączona do błony autofagosomu. W komórkach, w których doszło do inicjacji autofagii, LC3 znakowane fluorescencyjnie obserwuje się w postaci niewielkich punkcików, odpowiadających tworzącym się autofagosomom. Następnie autofagosomy przemieszczają się wzdłuż mikrotubul do miejsc bogatych w lizosomy, gdzie dochodzi do fuzji, m.in. za pomocą białek SNARE czy UVRAG [37].

### **ROLA BNIP3 W AUTOFAGII**

Dane dotyczące roli białka BNIP3 w autofagii są wciąż ubogie i często sprzeczne. Mechanizm indukcji autofagii przez BNIP3 nie jest znany, nie wiadomo także czy jest on związany z tymi samymi funkcjami, co indukcja programowanej śmierci komórki. Zdarzenia prowadzące do śmierci komórki mogą jednocześnie indukować autofagię, mogą być jednak zupełnie niezależne [49].

Depolaryzacja błony mitochondrialnej na skutek aktywacji BNIP3, prowadząca do uszkodzenia mitochondriów i ostatecznie do śmierci komórki [43], może prowadzić także do indukcji autofagii mającej na celu usuwanie uszkodzonych mitochondriów i obronę przed śmiercią. Jednak BNIP3 może brać czynny udział w usuwaniu uszkodzonych mitochondriów poprzez interakcję zakotwiczonego w błonie mitochondrialnej BNIP3 z białkiem dokującym w autofagosomach (ryc. 1C) [42]. BNIP3, poprzez interakcję z Bcl-2 lub Bcl-xL powoduje uwolnienie Bekliny 1 [30], co wskazuje na jego funkcję już na etapie inicjacji autofagii, podobnie jak zaobserwowane hamowanie przez BNIP3 aktywności mTOR, inhibitora autofagii, na skutek bezpośredniego oddziaływania z białkiem Rheb (ryc. 1 A, B) [29].

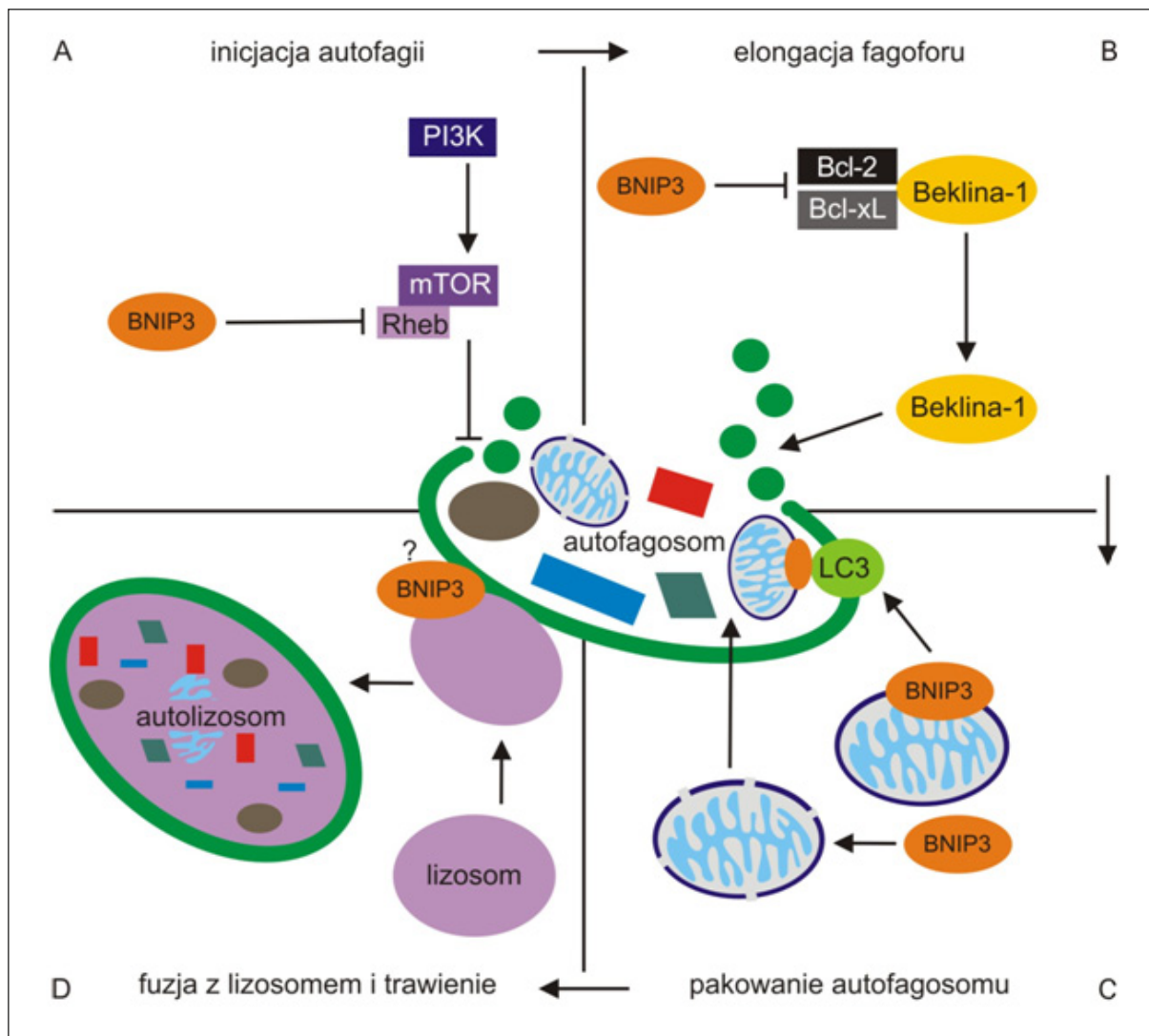
Rolę BNIP3 we wczesnych etapach autofagii zdają się potwierdzać dane z pracy Zhang i wsp., mówiące o zahamowaniu tworzenia punkcików LC3 przy braku ekspresji BNIP3 [47]. Obserwacja ta jednak pozostaje w sprzeczności z danymi z innych prac. Zahamowanie ekspresji BNIP3 przez formę „dominant negative” w hipoksji powoduje zmniejszenie liczby kwaśnych wakuoli, natomiast nie hamuje aktywacji LC3 [4], co może wskazywać na rolę w późniejszych etapach autofagii, np. fuzji autofagosomów z lizosomami (ryc. 1D). Potwierdzają to dane z pracy Chen i wsp. [11], w której wykazano, że w hipoksji akumulacja aktywowanej formy LC3 poprzedza w czasie akumulację BNIP3.

### **UZALEŻNIENIE NOWOTWORÓW OD AUTOFAGII**

Zaburzenia autofagii są związane z wieloma stanami patologicznymi, m.in. neurodegeneracją spowodowaną akumulacją agregatów białkowych; uszkodzeniami mięśni wywołanymi akumulacją autofagosomów osłabiającymi działanie komórki; chorobami wątroby wywołanymi nadmierną autofagią mitochondriów, a także nowotworami [31], jednak rola autofagii w procesie nowotworzenia nie jest w pełni poznana i może być zależna od wielu czynników, np. stadium choroby [16].

Autofagia jest niezbędna do zapobiegania inicjacji nowotworu. Poprzez usuwanie uszkodzonych mitochondriów proces ten przyczynia się do zminimalizowania stresu oksydacyjnego oraz obniżenia częstości mutacji. O zasadniczej roli procesu autofagii w zapobieganiu nowotworom świadczy to, że utrata jednego allele Bekliny 1, genu kluczowego dla autofagii, prowadzi do rozwoju licznych spontanicznych nowotworów u myszy, a wyciszenie ekspresji tego genu stwierdza się również w wielu typach nowotworów u ludzi [25]. Natomiast w zaawansowanych stadiach choroby, gdy komórki są narażone na różnego rodzaju czynniki stresowe, autofagia wydaje się niezbędna do ich przeżycia [16]. Nowotworowe naczynia krwionośne są często upośledzone i niefunkcjonalne, co wiąże się z powstawaniem rejonów słabo ukrwionych, a przez to niedotlenionych i z ograniczonym dostępem do składników odżywczych [24]. Autofagia zapewnia adaptację do tych warunków m.in. poprzez usuwanie uszkodzonych w hipoksji mitochondriów oraz ograniczanie wytwarzania reaktywnych form tlenu i zapobieganie uwalnianiu czynników proapoptotycznych z mitochondriów [42]. Ponadto, komórki nowotworowe mają zwiększone zapotrzebowanie na glukozę – dzięki autofagii mogą pozyskać zmagazynowane we własnych strukturach składniki odżywcze w warunkach ich ograniczonego dopływu [22].

Autofagia indukowana na skutek hipoksji jest zależna od czynnika HIF-1. Wykazano, że HIF-1 aktywowany w hipoksji prowadzi do wzbudzenia ekspresji białka BNIP3, a także jego homologa – BNIP3L, które uczestniczą w indukcji autofagii [6]. Proces ten sprzyja przeżyciu komórek w niekorzystnych warunkach, o czym świadczy wzrost liczby komórek ginących po zahamowaniu ekspresji



Ryc. 1. Udział białka BNIP3 w procesie autofagii. A - BNIP3 może hamować aktywność białka mTOR, inhibitora autofagii, poprzez oddziaływanie z białkiem Rheb. B - BNIP3, poprzez oddziaływanie z białkami Bcl-2 i/lub Bcl-xL powoduje uwolnienie i aktywację Bekliny 1. C - BNIP3 zlokalizowany w błonie mitochondrium, poprzez oddziaływanie z białkiem LC3 prowadzi do specyficznej degradacji mitochondriów. Możliwy jest również pośredni udział BNIP3 w mitofagii, tzn. powodowanie uszkodzeń mitochondriów skutkujące ich degradacją. D - spekuluje się także, że BNIP3 bierze udział w fuzji lizosomu z autofagosomem

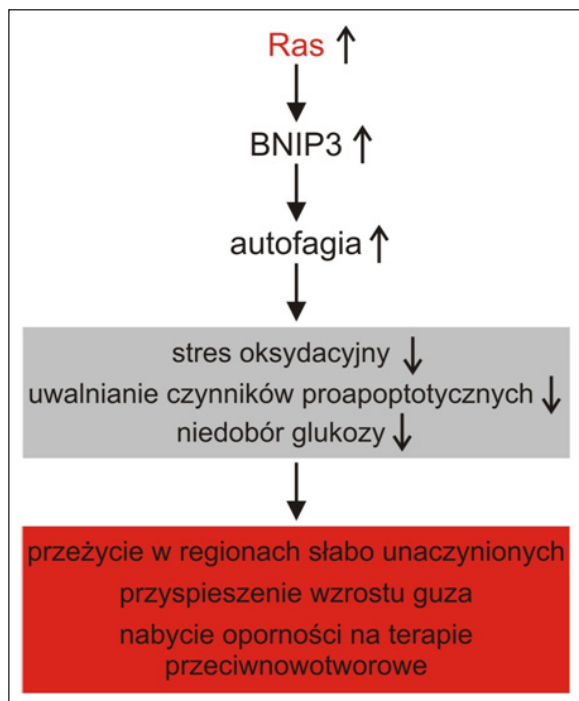
BNIP3 i BNIP3L, podobnie jak po zahamowaniu ekspresji Bekliny 1. Ukazuje to nową, antyapoptyczną funkcję BNIP3 – zdolność indukcji autofagii. Potwierdzeniem tej właściwości jest obserwacja, że w normoksji można aktywować autofagię poprzez ekspresję egzogennych BNIP3 i BNIP3L. Bellot i wsp. wysunęli teorię, według której nietypowe domeny BH3 tych białek zostały „zaprojektowane” w taki sposób, aby indukować autofagię poprzez rozerwanie kompleksu Bcl-2/Beklina 1, ale bez inicjacji programowanej śmierci komórki. Ekspresja obu białek osobno prowadzi jedynie do częściowej indukcji autofagii [6].

Jednak autofagia indukowana pod wpływem hipoksji może sprzyjać śmierci komórek. Traktowanie komórek glejaka lub raka gruczołu sutkowego, które giną w hipoksji niezależnie od kaspaz, inhibitorem autofagii 3-mety-

loadeniną (3-MA) powoduje częściowe zahamowanie ich śmierci. Podobny efekt uzyskuje się poprzez wyciszenie ekspresji Bekliny 1 [4]. W guzach hipoksja jest bardzo dynamicznym procesem, dlatego nawet w obrębie tej samej zmiany autofagia może wywoływać przeciwstawne skutki [31].

Niedawno wykazano, że transformacja komórek onkogenem Ras prowadzi do stymulacji autofagii i generuje uzależnienie od tego procesu („autophagy addiction”). Autofagia jest niezbędna do zachowania prawidłowego metabolizmu mitochondrialnego oraz przeżycia komórek w niekorzystnych warunkach, a także przyspiesza rozwój guzów [16]. W warunkach kryzysu energetycznego komórki transformowane Ras ginęły w sposób zależny od kaspaz, w przeciwieństwie do komórek prawidłowych, jeśli autofagia była zahamowana. Hamo-





Ryc. 2. Konsekwencje stymulacji autofagii przez onkogen Ras oraz domniemana rola białka BNIP3 w komórkach transformowanych

wanie autofagii prowadziło również do spowolnienia wzrostu guzów [16,44].

Badania prowadzone w naszym laboratorium wykazały, że duża aktywność onkogeny Ras prowadzi do indukcji bądź silnej stymulacji ekspresji BNIP3 [26]. Komórki nowotworowe wykazujące wysoki poziom BNIP3 pozostawały żywotne. Ponadto, w ludzkich komórkach raka okrężnicy wykazaliśmy korelację między ekspresją BNIP3 zależną od Ras a intensywnością autofagii (dane własne, niepublikowane), co może świadczyć o tym, że BNIP3 jest mediatorem stymulującego wpływu Ras na autofagię, a tym samym bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na progresję choroby nowotworowej oraz skuteczność terapii przeciwnowotworowej (ryc. 2).

### ROLA AUTOFAGII W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Autofagia wpływa na efektywność terapii przeciwnowotworowych. Promieniowanie jonizujące indukuje autofagię w komórkach raka gruczołu sutkowego, gruczołu krokowego i okrężnicy. Podanie bafilomycyny A1, inhibitora autofagii, powoduje uwrażliwienie komórek na radioterapię poprzez indukcję apoptozy. Autofagia indukowana promieniowaniem wydaje się zatem procesem chroniącym komórki nowotworowe przed programowaną śmiercią, obniżającym skuteczność terapii [27]. Jednak tlenek arsenu indukuje autofagię w komórkach glejaka, bez widocznych oznak apoptozy. Hamowanie autofagii powoduje spadek liczby komórek ginących na skutek terapii, co świadczy o tym, że autofagia działa w tym przypadku jako program śmierci

lub mechanizm jej sprzyjający [4]. Hydroksychlorochina (HCQ), która zaburza funkcje lizosomów, hamując tym samym autofagię, znajduje się w końcowych fazach badań klinicznych. Badania mają na celu stwierdzenie, czy hamowanie autofagii wpłynie na skuteczność terapii u ludzi [16].

Autofagia jest związana również z nabywaniem przez komórki nowotworowe oporności na terapię antyangiogenną. Po zniszczeniu naczyń krwionośnych w guzie pojawia się hipoksja, która prowadzi do śmierci części komórek. Jednak, jak wykazano na komórkach glioblastomy, część komórek adaptuje się do nowych warunków, m.in. dzięki autofagii zależnej od BNIP3 [23]. Także komórki nowotworowe, które są odporne na apoptozę indukowaną czynnikami alkilującymi (np. cyklofosfamidem) są uzależnione od autofagii, a jej zahamowanie za pomocą chlorochiny (CC) powoduje apoptozę komórek oraz spowolnienie wzrostu guza [1].

### MITOFAGIA

Przez długi czas uważano, że autofagia jest procesem nieswoistym. Dziś jednak wiadomo, że przynajmniej niektóre organella (mitochondria, retikulum endoplazmatyczne, peroksysony) mogą być selektywnie trawione w wyniku autofagii [20]. Co więcej, autofagia jest jedynym znanym mechanizmem zdolnym dostarczyć do lizosomu strukturę wielkości mitochondrium. Odmiana autofagii, podczas której swoiście degradowane są mitochondria jest nazywana mitofagią [25].

W ostatnim czasie opisano kilka mechanizmów aktywowanych w komórce w odpowiedzi na niekorzystne warunki, które są związane z przemianami mitochondriów. W wielu z nich kluczową rolę odgrywa białko BNIP3. Procesy te są jednak jeszcze stosunkowo słabo poznane, a dane ich dotyczące niejednokrotnie sprzeczne. Wykazano, że w hipoksji następuje spadek liczby mitochondriów i ograniczenie oddychania tlenowego w sposób zależny od HIF-1 i BNIP3 poprzez autofagię. Zahamowanie ekspresji BNIP3 lub hamowanie autofagii w hipoksji powoduje znaczący wzrost poziomu ROS prowadzący do apoptotycznej [47] lub nekrotycznej [39] śmierci komórek.

Pytaniem pozostaje, w jaki sposób BNIP3 selektywnie prowadzi do degradacji mitochondriów. Zaproponowano, że białka na organellach, które mają zostać poddane trawieniu są rozpoznawane przez białka z grupy Atg8 (autophagy-related 8, np. LC3, GABARAP), wiążące się z motywem LIR (LC3-interacting region). BNIP3 zawiera motyw LIR na N-końcu, który po zakotwiczeniu białka w mitochondrium pozostaje w cytosolu. BNIP3 wykazuje powinowactwo do LC3, silniejsze w formie dimeru. Osłabienie oddziaływania BNIP3 z LC3 powoduje zahamowanie procesu mitofagii, nie powoduje jednak ogólnego osłabienia autofagii [20].

Według innych badań BNIP3 hamuje fuzję mitochondriów, prowadząc tym samym do ich fragmentacji, co

sprzysia mitofagii, ponieważ mniejsze mitochondria łatwiej zamknąć w autofagosomie. Zahamowanie fragmentacji powoduje akumulację nieaktywnych mitochondriów [18]. Wykazano także redukcję poziomów białek zaangażowanych w oddychanie, prowadzące do ograniczenia fosforylacji oksydacyjnej pod wpływem BNIP3. Permeabilizacja błony mitochondrialnej nie poprzedza, ani nie zachodzi w czasie mitofagii indukowanej przez BNIP3, nie jest aktywowany również żaden szlak śmierci [39]. BNIP3 i BNIP3L są także konieczne do utrzymania prawidłowej jakości mitochondriów za pośrednictwem procesu MAM (Mieap-induced accumulation of lysosome-like organelles within mitochondria), który służy eliminacji białek uszkodzonych przez utlenienie. Jest to proces indukowany przez reaktywne formy tlenu i odbywa się przez bezpośrednie oddziaływanie domeny BH3 z białkiem Mieap [34].

Z drugiej strony, w komórkach nowotworowych w hipoksji zaobserwowano zmianę struktury sieci mitochondriów, zachodzącą na skutek ich fuzji i powstawania powiększonych mitochondriów, które jednak pozostają funkcjonalne. Potencjał mitochondrialny i wytwarzanie ATP jest zachowane, ponadto proces ten jest odwracalny, co świadczy o tym, że nie wiąże się z uszkodzeniem mitochondriów. Fuzja mitochondriów w hipoksji jest zależna od HIF-1, a także BNIP3 i BNIP3L. Zaproponowanym przez autorów pracy mechanizmem działania tych białek jest bezpośrednie oddziaływanie domeny BH3 z białkiem Mfn1 odpowiedzialnym za fuzję mitochondriów. Co więcej, komórki z powiększonymi mitochondriami hodowane w warunkach hipoksji były odporne na działanie staurosporyny i etopozydnu. Zablockowanie fuzji mitochondriów wiązało się natomiast z większą wrażliwością na bodźce proapoptotyczne [12].

Powyższe dane sugerują, że usuwanie niefunkcyjnych mitochondriów, a przez to utrzymanie ich prawidłowej populacji jest konieczne do przeżycia komórki, szczególnie w warunkach hipoksji. W świetle ostatnich badań

udział w kontroli jakości mitochondriów wydaje się jedną z najważniejszych funkcji białka BNIP3.

## PODSUMOWANIE

Przedstawione w pracy dane ukazują związek białka BNIP3 z autofagią, a także złożoną rolę tego procesu w nowotworzeniu. Badania prowadzone w ostatnich latach wykazały wiele sprzeczności dotyczących zarówno roli BNIP3 w komórkach, w tym w komórkach nowotworowych, a także dotyczących znaczenia autofagii w progresji nowotworów i terapii przeciwnowotworowej. Przyczyną tego stanu rzeczy może być nieuwzględnianie ważnych czynników stanowiących kontekst konkretnego modelu doświadczalnego, takich jak hipoksja, zakwaszenie, czy też aktywacja poszczególnych onkogenów. Może to także generować różnice między wynikami uzyskiwanymi na modelach *in vitro*, w których kontrola warunków jest łatwiejsza i *in vivo*. Szczególnie potencjalne cytostatyki, dające obiecujące wyniki w badaniach *in vitro*, często wykazują znacznie mniejszą efektywność *in vivo*. Dopiero kompleksowe rozpatrywanie wpływu wielu czynników, wpływających na funkcjonowanie komórek nowotworowych w różnych warunkach pozwoli na wyjaśnienie istniejących niejasności i poprawę skuteczności terapii.

Dane uzyskane z literatury, a także naszych badań wskazują, że aktywacja onkogeny Ras wpływa na intensywność autofagii, a przez to na wiele procesów komórkowych. Obserwuje się także różnice pomiędzy skutkami autofagii w komórkach transformowanych hodowanych w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, a doświadczających np. niedoboru glukozy. Ważnym czynnikiem modyfikującym odpowiedź komórki na aktywację onkogeny Ras wydaje się białko BNIP3, które może pełnić rolę mediatora wpływu Ras na autofagię, a tym samym wpływać na zdolność komórek do przeżycia w niesprzyjającym środowisku, a także na ich zdolność do rozsiewu w organizmie oraz przyspieszać wzrost guzów i zapewniać oporność na terapię przeciwnowotworową.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Amaravadi R.K., Yu D., Lum J.J., Bui T., Christophorou M.A., Evan G.I., Thomas-Tikhonenko A., Thompson C.B.: Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J. Clin. Invest.*, 2007; 117: 326-336
- [2] An H.J., Maeng O., Kang K.H., Lee J.O., Kim Y.S., Paik S.G., Lee H.: Activation of Ras up-regulates pro-apoptotic BNIP3 in nitric oxide-induced cell death. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 33939-33948
- [3] Apel A., Zentgraf H., Büchler M.W., Herr I.: Autophagy – a double-edged sword in oncology. *Int. J. Cancer*, 2009; 125: 991-995
- [4] Azad M.B., Chen Y., Henson E.S., Cizeau J., McMillan-Ward E., Israels S.J., Gibson S.B.: Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3. *Autophagy*, 2008; 4: 195-204
- [5] Bacon A.L., Fox S., Turley H., Harris A.L.: Selective silencing of the hypoxia-inducible factor 1 target gene BNIP3 by histone deacetylation and methylation in colorectal cancer. *Oncogene*, 2007; 26: 132-141
- [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] Bruick R.K.: Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 9082-9087
- [8] Burton T.R., Eisenstat D.D., Gibson S.B.: BNIP3 (Bcl-2 19 kDa interacting protein) acts as transcriptional repressor of apoptosis-inducing factor expression preventing cell death in human malignant gliomas. *J. Neurosci.*, 2009; 29: 4189-4199
- [9] Burton T.R., Gibson S.B.: The role of Bcl-2 family member BNIP3 in cell death and disease: NIPPING at the heels of cell death. *Cell Death Differ.*, 2009; 16: 515-523
- [10] Chen G., Ray R., Dubik D., Shi L., Cizeau J., Bleackley R.C., Saxena S., Gietz R.D., Greenberg A.H.: The E1B 19K/Bcl-2-binding protein

- Nip3 is a dimeric mitochondrial protein that activates apoptosis. *J. Exp. Med.*, 1997; 186: 1975-1983
- [11] Chen J.L., Lin H.H., Kim K.J., Lin A., Forman H.J., Ann D.K.: Novel roles for protein kinase C $\delta$ -dependent signaling pathways in acute hypoxic stress-induced autophagy. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 34432-34444
- [12] Chiche J., Rouleau M., Gounon P., Brahim-Horn M.C., Pouyssegur J., Mazure N.M.: Hypoxic enlarged mitochondria protect cancer cells from apoptotic stimuli. *J. Cell. Physiol.*, 2010; 222: 648-657
- [13] Galluzzi L., Kroemer G.: Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*, 2008; 135: 1161-1163
- [14] Galluzzi L., Vicencio J.M., Kepp O., Tasdemir E., Maiuri M.C., Kroemer G.: To die or not to die: that is the autophagic question. *Curr. Mol. Med.*, 2008; 8: 78-91
- [15] Giatromanolaki A., Koukourakis M.I., Sowter H.M., Sivridis E., Gibson S., Gatter K.C., Harris A.L.: BNIP3 expression is linked with hypoxia-regulated protein expression and with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10: 5566-5571
- [16] Guo J.Y., Chen H.Y., Mathew R., Fan J., Strohecker A.M., Kararli-Uzunbas G., Kamphorst J.J., Chen G., Lemons J.M., Karantza V., Collier H.A., Dipaola R.S., Gelinas C., Rabinowitz J.D., White E.: Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev.*, 2011; 25: 460-470
- [17] Guo K., Searfoss G., Krolkowski D., Pagnoni M., Franks C., Clark K., Yu K.T., Jaye M., Ivashchenko Y.: Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3. *Cell Death Differ.*, 2001; 8: 367-376
- [18] Gustafsson A.B.: Bnip3 as a dual regulator of mitochondrial turnover and cell death in the myocardium. *Pediatr. Cardiol.*, 2011; 32: 267-274
- [19] Hamacher-Brady A., Brady N.R., Logue S.E., Sayen M.R., Jinno M., Kirshenbaum L.A., Gottlieb R.A., Gustafsson A.B.: Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death Differ.*, 2007; 14: 146-157
- [20] Hanna R.A., Quinsay M.N., Orogo A.M., Giang K., Rikka S., Gustafsson A.B.: Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. *J. Biol. Chem.*, 2012; 287: 19094-19104
- [21] Hartman M.E., Czyż M.: Mimetyki BH3 jako terapia wspomagająca konwencjonalne leki przeciwnowotworowe. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2012; 66: 67-77
- [22] Hippert M.M., O'Toole P.S., Thorburn A.: Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer Res.*, 2006; 66: 9349-9351
- [23] Hu Y.L., DeLay M., Jahangiri A., Molinaro A.M., Rose S.D., Carbone W.S., Aghi M.K.: Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma. *Cancer Res.*, 2012; 72: 1773-1783
- [24] Jain R.K.: Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, 2005; 307: 58-62
- [25] Jin S.: Autophagy, mitochondrial quality control, and oncogenesis. *Autophagy*, 2006; 2: 80-84
- [26] Kalas W., Świderek E., Rapak A., Kopij M., Rak J., Strzadala L.: H-ras up-regulates expression of BNIP3. *Anticancer Res.*, 2011; 31: 2869-2875
- [27] Kondo Y., Kondo S.: Autophagy and cancer therapy. *Autophagy*, 2006; 2: 85-90
- [28] Kubasiak L.A., Hernandez O.M., Bishopric N.H., Webster K.A.: Hypoxia and acidosis activate cardiac myocyte death through the Bcl-2 family protein BNIP3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 12825-12830
- [29] Li Y., Wang Y., Kim E., Beemiller P., Wang C.Y., Swanson J., You M., Guan K.L.: Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with Rheb. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 35803-35813
- [30] Mazure N.M., Pouyssegur J.: Atypical BH3-domains of BNIP3 and BNIP3L lead to autophagy in hypoxia. *Autophagy*, 2009; 5: 868-869
- [31] Mazure N.M., Pouyssegur J.: Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2010; 22: 177-180
- [32] Mellor H.R., Rouschop K.M., Wigfield S.M., Wouters B.G., Harris A.L.: Synchronised phosphorylation of BNIP3, Bcl-2 and Bcl-xL in response to microtubule-active drugs is JNK-independent and requires a mitotic kinase. *Biochem. Pharmacol.*, 2010; 79: 1562-1572
- [33] Murai M., Toyota M., Suzuki H., Satoh A., Sasaki Y., Akino K., Ueno M., Takahashi F., Kusano M., Mita H., Yanagihara K., Endo T., Hinoda Y., Tokino T., Imai K.: Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in colorectal and gastric cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 1021-1027
- [34] Nakamura Y., Kitamura N., Shinogi D., Yoshida M., Goda O., Murai R., Kamino H., Arakawa H.: BNIP3 and NIX mediate Mitoap-induced accumulation of lysosomal proteins within mitochondria. *PLoS One*, 2012; 7: e30767
- [35] Okami J., Simeone D.M., Logsdon C.D.: Silencing of the hypoxia-inducible cell death protein BNIP3 in pancreatic cancer. *Cancer Res.*, 2004; 64: 5338-5346
- [36] Papandreou I., Krishna C., Kaper F., Cai D., Giaccia A.J., Denko N.C.: Anoxia is necessary for tumor cell toxicity caused by a low-oxygen environment. *Cancer Res.*, 2005; 65: 3171-3178
- [37] Ravikumar B., Sarkar S., Davies J.E., Futter M., Garcia-Arencibia M., Green-Thompson Z.W., Jimenez-Sanchez M., Korolchuk V.I., Lichtenberg M., Luo S., Massey D.C., Menzies F.M., Moreau K., Narayanan U., Renna M., Siddiqi F.H., Underwood B.R., Winslow A.R., Rubinsztein D.C.: Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.*, 2010; 90: 1383-1435
- [38] Ray R., Chen G., Vande Velde C., Cizeau J., Park J.H., Reed J.C., Gietz R.D., Greenberg A.H.: BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 1439-1448
- [39] Rikka S., Quinsay M.N., Thomas R.L., Kubli D.A., Zhang X., Murphy A.N., Gustafsson A.B.: Bnip3 impairs mitochondrial bioenergetics and stimulates mitochondrial turnover. *Cell Death Differ.*, 2011; 18: 721-731
- [40] Swoboda E., Strządala L.: BNIP3 jako nietypowy przedstawiciel rodziny Bcl-2. Część 1: BNIP3 – regulator nieapoptotycznej programowanej śmierci komórek. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 409-417
- [41] Tan E.Y., Campo L., Han C., Turley H., Pezzella F., Gatter K.C., Harris A.L., Fox S.B.: BNIP3 as a progression marker in primary human breast cancer; opposing functions in situ versus invasive cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2007; 13: 467-474
- [42] Tracy K., Macleod K.F.: Regulation of mitochondrial integrity, autophagy and cell survival by BNIP3. *Autophagy*, 2007; 3: 616-619
- [43] Vande Velde C., Cizeau J., Dubik D., Alimonti J., Brown T., Israels S., Hakem R., Greenberg A.H.: BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol. Cell. Biol.*, 2000; 20: 5454-5468
- [44] Yang S., Wang X., Contino G., Liesa M., Sahin E., Ying H., Bause A., Li Y., Stommel J.M., Dell'antonio G., Mautner J., Tonon G., Haggis M., Shirihai O.S., Doglioni C., Bardeesy N., Kimmelman A.C.: Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev.*, 2011; 25: 717-729
- [45] Yasuda M., Theodorakis P., Subramanian T., Chinnadurai G.: Adenovirus E1B-19K/BCL-2 interacting protein BNIP3 contains a BH3 domain and a mitochondrial targeting sequence. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 12415-12421

[46] Yook Y.H., Kang K.H., Maeng O., Kim T.R., Lee J.O., Kang K.I., Kim Y.S., Paik S.G., Lee H.: Nitric oxide induces BNIP3 expression that causes cell death in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 321: 298-305

[47] Zhang H., Bosch-Marce M., Shimoda L.A., Tan Y.S., Baek J.H., Wesley J.B., Gonzalez F.J., Semenza G.L.: Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 10892-10903

[48] Zhang J., Ney P.A.: Mechanisms and biology of B-cell leukemia/lymphoma 2/adenovirus E1B interacting protein 3 and Nip-like protein X. *Antioxid. Redox Signal.*, 2011; 14: 1959-1969

[49] Zhang J., Ney P.A.: Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ.*, 2009; 16: 939-946

---

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.