

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Vítězslav Pazour**

Význam autofagocytózy a její interakce s apoptotickou signalizací pro buněčné přežití a  
buněčnou smrt

The significance of autophagy and its communication with the apoptotic machinery for  
cellular survival or cell death

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Ladislav Anděra, Csc

Praha, 2013

**Poděkování:**

Rád bych poděkoval svému školiteli a všem, kdo mě při psaní podporovali.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 21.08.2013

Podpis

## Obsah

Abstrakt .....	3
Seznam použitých zkratk.....	5
1 Úvod.....	6
2 Autofagie.....	7
2.1 Druhy autofagie .....	7
2.1.1 Mikroautofagie .....	7
2.1.2 Chaperony zprostředkovaná autofagie .....	7
2.1.3 Makroautofagie .....	7
2.2 Význam autofagie.....	8
2.2.1 Stresové podmínky .....	8
2.2.2 Buněčná homeostáze .....	8
2.2.3 Další buněčné procesy.....	9
3 Mechanismus autofagie.....	10
3.1 Molekulární mechanismus autofagie.....	10
3.1.1 Indukce autofagie .....	10
3.2 Nukleace autofagozómu .....	11
3.3 Elongace autofagozómu .....	12
3.4 Fúze s lysozomem .....	13
4 Interakce autofagie s apoptotickou signalizací.....	15
4.1 Beclin-1 a Bcl-2 rodina.....	15
4.1.1 JNK.....	16
4.1.2 DAPK.....	16
4.1.3 HMGB-1.....	16
4.1.4 Bad, Bax .....	17
4.2 Vzájemná funkční ovlivňování apoptózy a autofagie .....	18
4.2.1 Exekuční vliv apoptotické signalizace na autofagii .....	18
4.2.2 Role autofagické degradace v apoptotické signalizaci.....	19
4.3 Interakce autofagie s vnější dráhou indukce apoptózy .....	20
4.4 Role miRNA v interakci autofagie a apoptózy.....	21

5	Autofagická buněčná smrt.....	22
5.1	Příklady naznačující existenci autofagické buněčné smrti .....	22
5.1.1	<i>Dictyostelium discoideum</i> .....	22
5.1.2	<i>Drosophila melanogaster</i> .....	22
5.1.3	Savčí buňky .....	23
5.2	Důvody popírající existenci autofagické buněčné smrti.....	24
6	Autofagie a rakovina .....	26
6.1	Tumorigenní účinky autofagie.....	26
6.2	Tumorosupresivní účinky autofagie .....	27
6.3	Význam autofagie při léčbě rakoviny.....	28
7	Závěr.....	30
8	Zdroje .....	31

## **Abstrakt**

Autofagie je buněčný proces umožňující, degradaci části cytoplasmy, proteinových agregátů nebo celých organel. Hlavní funkcí autofagie je udržování buněčné homeostáze, ochrana před stresem a mobilizace interních zdrojů. Má však také roli například v imunitě, vývoji a diferenciaci. Autofagická dráha také může interagovat s apoptotickou signalizací. Tato interakce probíhá na mnoha úrovních od interakce regulačních proteinů po vzájemnou degradaci a štěpení komponent obou signálních drah. Autofagie interaguje jak s dráhou vnitřní indukce apoptózy tak s dráhou vnější indukce apoptózy. Autofagie ale může za určitých okolností aktivovat buněčnou smrt. Tento děj se také nazývá programovaná buněčná smrt typu II a vyznačuje se vysokou vakuolizací a lysozomální autodestrukci buňky. Autofagická buněčná smrt byla dokumentována především při vývoji *Drosophily*, ale také u savčích buněk. Autofagie hraje také významnou roli v tumorigenezi, kde může rakovinné buňky jak chránit před stresem tak může přispívat k jejich smrti. Další výzkum autofagické signalizace a mechanismů interakce autofagie a apoptózy by kromě nových poznatků mohl také přispět k terapii rakoviny.

**Klíčová slova:** autofagie, apoptóza, Atg, Beclin-1, rakovina,

## **Abstract**

Autophagy is a cellular process, that allows degradation of a portion of cytoplasm, protein aggregates or entire organelles. Major function of autophagy is the maintenance of cellular homeostasis, the protection against stress and mobilization of internal resources. However, autophagy also has a role in immunity, development and differentiation. Autophagic signaling can interact with apoptotic machinery at several levels via regulatory proteins of both pathways or via mutual degradation or cleavage of the components of both pathways. Autophagy can communicate with both extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis. Under certain circumstances can autophagy by itself also induce cell death. Autophagic cell death called also programmed cell death of type II is accompanied by massive vacuolization and lysosomal autodestruction of the affected cell. Autophagic cell death was documented during *Drosophila* development but also in mammalian cells. Autophagy also play important role in tumorigenesis, where it can either protect tumor cells against various stresses or it can contribute to their death. Further research of autophagic signaling and mechanisms of communication between autophagy and apoptosis may not only extend our knowledge on these essential processes but can also contribute to cancer therapy.

**Key words:** autophagy, apoptosis Atg, Beclin-1, cancer

## Seznam použitých zkratek

Ambra1	activation molecule in Beclin-1-regulated autophagy
Atg	autophagy related gene
Bad	Bcl-2-associated death promoter protein
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 protein
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
Beclin-1	Bcl-2 interacting protein
BH3 doména	Bcl-2 homology domain
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interaction protein 3
DAPK	death associated protein kinase
DIF-1	differentiation factor 1
DISC	death-inducing signaling complex
ECM	extracellular matrix
ESCRT-III	endosomal sorting complex required for transport III
FADD	Fas-associated death domain
FIP200	focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa
FLIP	FLICE-like inhibitory protein
HMGB1	high mobility group box 1
HOPS	homotypic fusion and protein sorting
Hsc70	heat shock cognate 70kDa protein
IFN $\gamma$	interferon gamma
JNK	c-Jun terminal kinase
LAMP-2A	lysosome-associated membrane protein 2A
LC3	microtubule associated light chain 3
MHC	major histocompatibility complex
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
NAF-1	nutrient-deprivation autophagy factor-1
NBR1	neighbor of BRCA1 gene1
PAS	pre-autophagosomal structure
PE	phosphatidylethanolamine
PI3P	phosphatidyl-inositol-3-phosphate
PIK3C3	phosphatidyl -inositol-3-kinase class III
PINK1	PTEN - induced putative kinase 1
ROS	reactive oxygen species
Rubicon	RUN domain containing cysteine rich protein
SMERs	small-molecule enhancers of effects of rapamycin
SNARE	SNAP receptor
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
ULK1/ULK2	unc-51-like kinase 1/2
UVRAG	UV radiation resistance associated gene
VDAC	voltage-dependent anion channel

## 1 Úvod

Autofagie je jeden ze základních degradačních procesů v buňce. V současné době roste její obliba a přibývá studií, které se autofagií zabývají. Tyto studie odhalují nové a nové významy autofagie, např. v imunitním systému, vývoji nebo diferenciaci. Její poruchy jsou pozorovány při některých onemocněních. Interakce s apoptotickou signalizací, Autofagie byla pokládána hlavně za proces napomáhající přežití buňky, ale ukazuje se, že se podílí také na buněčné smrti a může být dokonce její příčinou.

Ve své práci bych chtěl shrnout základní poznatky o molekulárním mechanismu autofagie a stručně uvést některé funkce, které v buňce autofagie může plnit. Avšak především bych se chtěl zaměřit na interakci autofagické dráhy s dráhou apoptózy hlavně jejím molekulárním mechanismu. Dále bych se chtěl ve své práci zabývat fenoménem autofagické buněčné smrti a roli autofagie v nádorech.

## **2 Autofagie**

Autofagie je proces během něhož je část cytoplasmy, agregované proteiny nebo jsou celé organely transportovány a následně degradovány v lysozomech (vakuolách – u kvasinek), přičemž dochází k recyklaci degradačních produktů (aminokyseliny, nukleotidy, mastné kyseliny atd.) zpět do cytoplasmy. Autofagie je vysoce konzervovaný a esenciální proces, probíhající u všech eukaryotických buněk. Na základě iniciace autofagie a způsobu transportu do lysozomů můžeme odlišit tři druhy autofagie.

### **2.1 Druhy autofagie**

#### **2.1.1 Mikroautofagie**

Je typem autofagie, kdy je část cytoplasmy přímo pohlcována lysozomem. Membrána lysozomu invaginuje, díky tomu se dovnitř lysozomu dostane část cytoplasmy, která je podškrtně degradována. Molekulární mechanismus tohoto procesu není zřetelně definován.

#### **2.1.2 Chaperony zprostředkovaná autofagie**

Při tomto druhu autofagie jsou degradovány solubilní cytoplasmatické proteiny nesoucí pentapeptidový motiv KFERQ. Dále se tohoto procesu účastní chaperonový protein Hsc70 (heat shock cognate 70 kDa protein), který rozeznává předešlý motiv a spolu se svými ko-chaperony zprostředkovává transport karga k lysozomu. Zde tento proteino-chaperonový komplex interaguje s lysozomálním membránovým proteinem LAMP-2A (lysosome associated membrane protein 2) a je jím translokován do lysozomu, kde je degradován (Kaushik et al., 2011).

#### **2.1.3 Makroautofagie**

Nejčastějším a nejlépe probádaným typem je makroautofagie. Probíhá tak, že část cytoplasmy či celé organely obklopí dvojvrstvá membrána a vytvoří tzv. autofagozom, který je poté transportován k lysozomu se kterým fúzuje v autofagolysozom. Zde pak dochází k degradaci obsahu autofagozomu a jeho vnitřní membrány pomocí lysozomálních hydroláz. Podrobnější popis procesu a molekulárního mechanismu makroautofagie bude následovat v dalších kapitolách. Tato práce je dále věnována pouze makroautofagii a bude na ni odkazováno jako na autofagii.

## **2.2 Význam autofagie**

Autofagie má široké spektrum funkcí především na buněčné, ale i organismové úrovni. Následuje krátký výčet příkladů funkcí, které autofagie umožňuje a biologických procesů, kterých se účastní.

### **2.2.1 Stresové podmínky**

Nejnámější funkcí autofagie je udržování buněčného metabolismu v chodu za stresových podmínek. Při nedostatku určitých živin dochází ke zvýšené aktivaci autofagie, která umožní recyklaci některých součástí buňky a vznik stavebních jednotek (aminokyseliny, nukleotidy apod.) pro udržení metabolismu buňky. Tím napomáhá přežití buňky či celého organismu. Například kvasinky s defektní autofagií vystavené nedostatku dusíku mají celkově sníženou proteosyntézu a sníženou koncentraci některých aminokyselin pod kritickou mez oproti kvasinkám s fungující autofagií (Onodera and Ohsumi, 2005). Příkladem u savců je myš nesoucí mutace v esenciálních genech autofagické dráhy, která umírá během jednoho dne po narození. V době po narození dochází k přerušení zásobení živinami placentou a autofagie je nezbytná pro udržení dostatečné hladiny aminokyselin, dokud není obnoven příjem živin z okolí (Kuma et al., 2004). Dalším stresovým faktorem, se kterým autofagie napomáhá vyrovnat se, je u savců nedostatek růstových faktorů. Lymfocyty vystaveny nedostatku růstových faktorů nemohou získávat živiny ze svého okolí. Díky autofagii mohou lymfocyty tyto nepříznivé podmínky po omezenou dobu schopny překonat (Lum et al., 2005).

### **2.2.2 Buněčná homeostáze**

Druhou obecnou a důležitou funkcí autofagie je udržování buněčné homeostáze. Autofagií jsou konstitutivně odstraňovány špatně sbalené proteiny a proteinové agregáty, které nemohou být odstraněny proteazomovým degradačním systémem. Touto svojí funkcí autofagie zabraňuje hromadění špatně sbalených proteinů, které může vést k poruchám buněčných funkcí. V buňkách s nefunkční autofagií se pak hromadí proteinové agregáty či poškozené organely (Komatsu et al., 2005). Dalším důkazem důležitosti konstitutivní autofagie je vznik neurodegenerativních poruch u myši s nervovými buňkami s nefunkční autofagií (Hara et al., 2006). Autofagie je také součástí některých signálních drah. Příkladem může být vzájemné propojení drah s apoptózou, které je detailněji popsáno v samostatné kapitole.

Autofagie není zaměřena pouze na proteiny a další molekuly, ale jako jediný buněčný degradativní proces je schopna likvidovat celé poškozené organely. Autofagií mohou být degradovány mitochondrie (mitofagie), peroxisomy (pexofagie), endoplasmatické retikulum (retikulofagie), jádro (nukleofagie). Poškozené mitochondrie působí zvýšení koncentrace ROS (reactive oxygen species), což vede ke zvýšení aktivity mitofagie (Okamoto et al., 2009). Odstraňováním poškozených mitochondrií se buňka brání před poškozeními, která jsou způsobená jejich disfunkcí.

### **2.2.3 Další buněčné procesy**

Autofagie se podílí na mnoha dalších biologických procesech. Důležitou roli má například v imunitním systému. Napomáhá likvidaci intracelulárních parazitů. Tento děj se nazývá xenofagie. Buněčný parazit, který se vyhnul klasické cestě degradace skrz cestu přes endozóm, je rozeznán, obalen do autofagozomů a transportován do lysozomu. Pomáhá likvidovat jak parazity mikrobiální (Nakagawa et al., 2004), virové (Talloczy et al., 2006), tak i prvoky (Andrade et al., 2006). Autofagie také slouží k prezentaci endogenních peptidů na MHC tř. II (major histocompatibility complex). Dále je autofagie důležitá při vývoji a diferenciaci některých organismů. U nižších organismů se účastní morfologických přestaveb během metamorfózy. U *D. melanogaster* se účastní degradace slinných žláz (Berry and Baehrecke, 2007). V tomto případě je autofagie často spojována s buněčnou smrtí, autofagií jako možným mechanismem buněčné smrti je věnována jedna z následujících kapitol. U vyšších eukaryot je pak důležitá během morfologických změn uvnitř buňky při diferenciaci některých buněčných typů. Autofagie hraje roli také při diferenciaci erytrocytů (Mortensen and Simon, 2010).

### 3 Mechanismus autofagie

Obecný průběh autofagie má několik fází a začíná vznikem autofagozomu, z izolační membrány, která je také nazývána fagofor. Postupným prodlužováním fagoforu okolo cílové části cytoplasmy či organely vzniká dvou membránový autofagozom (Mizushima, 2007). U kvasinek je vznik fagoforu a formace autofagozomu lokalizována v pre-autofagozomální struktuře (PAS) poblíž vakuoly. Naopak u savců může docházet k formování autofagozomu v různých částech cytoplasmy (Wirawan et al., 2012) a ekvivalent PAS nebyl objeven. Původ membrán při formování autofagozomu není zatím znám, spíše se zdá, že zdrojů těchto membrán je hned několik. Studie naznačují, že jím může být endoplasmatické retikulum (Axe et al., 2008), Golgiho aparát (Young et al., 2006), mitochondrie (Hailey et al., 2010), plasmatická membrána (Ravikumar et al., 2010) nebo za určitých podmínek dokonce jaderný obal (English et al., 2009).

Vzniklý autofagozom následně může fúzovat s endozomem za vzniku amfizomu, který poté fúzuje s lysozomem nebo rovnou fúzuje s lysozomem, přičemž jak už bylo řečeno, vzniká autolysozom. V autolysozomu dochází k degradaci součástí autofagozomu na makromolekuly, které jsou transportovány zpět do cytoplasmy.

#### 3.1 Molekulární mechanismus autofagie

Na autofagie se podílí velké množství proteinů a díky extensivnímu výzkumu autofagie jejich neustále přibývá. Geny, které sespecificky účastní autofagie jsou označovány zkratkou atg (autophagy-related gene) (Klionsky et al., 2003). Většina Atg proteinů byla nejdříve objevena u kvasinek a následně byli charakterizováni jejich homology i u dalších eukaryot včetně savců, což dokazuje konzervovanost autofagie.

Dále budou při popisu molekulárního mechanismu autofagie používány především názvy savčích proteinů autofagie.

Molekulární mechanismus autofagie se dá rozdělit na několik částí: indukce, nukleace autofagozomu, elongace autofagozomu a fúze s lysozomem.

##### 3.1.1 Indukce autofagie

Autofagie představuje obranný proces proti stresovým podmínkám a významně se podílí na udržování buněčné homeostáze. Mezi indukční signály autofagie náleží například stresové podněty jako nízké hladiny živin, růstových faktorů, hormonů, koncentrace  $Ca^{2+}$ ,

ATP, hypoxie a také hromadění špatně sbalených proteinů v cytoplasmě (Wirawan et al., 2012). Působení většiny těchto signálů je zprostředkováno přes proteinový komplex mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) (Sengupta et al., 2010). Při nestresových podmínkách, tedy například při dostatku aminokyselin, růstových faktorů je mTORC1 aktivní a inhibuje ULK komplex. ULK komplex je složen z několika proteinů (ULK1/ULK2, Atg13, FIP200 a Atg101) a mTORC1 ho inhibuje přímou vazbou a fosforylací některých jeho komponent (Hosokawa et al., 2009). Naopak při stresových podmínkách nebo při dodání rapamycinu (inhibitor mTORC1) dochází k represí mTORC1 a k jejímu uvolnění od ULK komplexu, který je tímto aktivovaný a podílí se na dalších procesech autofagie (Ganley et al., 2009), (Jung et al., 2009).

Aktivní ULK komplex umožňuje uvolnění komplexu fosfatidylinositol-3-kinázy třetí třídy (PIK3C3), který je jinak připojen přes protein Ambra1 (activation molecule in Beclin-1-regulated autophagy) a přes dynein k mikrotubulu. ULK komplex fosforyluje Ambra1 a fosforylovaný Ambra1 již neinteraguje s dyneinem. (Di Bartolomeo et al., 2010). Uvolněný PIK3C3 komplex je důležitý pro nukleaci autofagozomu.

Existují i další způsoby indukce vedle mTORC1. SMERs (small-molecule enhancers of cytostatic effects of rapamycin) vyvolávají indukci autofagie nezávislé na mTORC1 (Sarkar et al., 2007).

### **3.2 Nukleace autofagozomu**

Jádro PIK3C3 komplex je složeno z proteinů Ambra1, Beclinu-1 (Bcl-2 interacting protein), p150 a PIK3C3 (Wirawan et al., 2012). Beclin-1 je důležitý regulační protein autofagie. Zprostředkovává interakci několika proteinů. Interakcí s PIK3C3 vytváří komplex, který je nezbytný pro nukleaci autofagozomu (Kihara et al., 2001). Vazby dalších proteinů na Beclin-1 ovlivňují tento komplex Beclin-1/PIK3C3 a tím regulují autofagii. (Pyo et al., 2012). Mezi proteiny, které vazbou na Beclin-1 pozitivně regulují autofagii patří Atg14L a UVRAG (UV radiation resistance associated gene) oba se váží pouze v nepřítomnosti druhého (Itakura et al., 2008). Naopak negativně regulují autofagii například Rubicon (RUN domain containing cysteine rich protein) (Matsunaga et al., 2009). Další negativní regulátory vázající Beclin-1 patří do Bcl-2, ty zároveň zprostředkovávají interakci mezi autofagickou a apoptotickou dráhou. (viz. Kapitola 4.1)

PIK3C3 v komplexu katalyzuje fosforylacifosfatidylinositolu a vzniká fosfatidylinositol-3-fosfát (PI3P). PI3P umožňuje lokalizaci dalších Atg proteinů do místa vzniku autofagozomu. Jejich funkce v procesu autofagie není zatím známá (Wirawan et al., 2012).

### 3.3 Elongace autofagozómu

Elongace je proces, při kterém dochází k protahování fagoforu, až úplně obklopí cílovou strukturu, ať už se jedná o organelu nebo část cytoplasmy. Tohoto procesu se účastní dva ubiquitin-like konjugační systémy. Při prvním je nejdříve Atg12 pomocí Atg7 (E1-like enzym) aktivován, následně přenesen k Atg10 (E2-like enzym), který zprostředkuje konjugaci Atg12 s lysinem 130 proteinu Atg5 (Glick et al., 2010). Konjugát Atg5-Atg12 poté vytváří trimer s Atg16L a vzniká Apg16L1 komplex (Mizushima et al., 2003). Tento komplex se dočasně váže na vnější stranu vznikající autofagozomální membrány a nejspíše určuje její zakřivení. Dále tento komplex funguje ve druhém ubiquitin-like komplexu jako E3 ligáza (Fujita et al., 2008).

V druhém ubiquitin-like konjugačním systému je nejdříve LC3 (microtubule associated light chain 3) štěpen cysteinovou proteázou Atg4 a následně aktivován Atg7 (E1-like enzym). Aktivovaný LC3 je přenesen k Atg3 (E2-like enzym) a pomocí Atg16L1 komplexu vzniklého v prvním ubiquitin-like konjugačním komplexu je LC3 připojen k fosfatidylethanolaminu (PE). Vzniklý LC3-PE se také nazývá LC3-II. LC3-II je při dokončování autofagozomu odstraněn pomocí Atg4 procesem tzv. dekonjugace. LC3-II zůstává na vnitřní straně membrány autofagozomu (Kabeya et al., 2004). Díky tomu a díky svému specifickému výskytu na membráně autofagozomů se LC3-II používá jako marker autofagie.

Autofagie může probíhat buď nespecificky, kdy jsou pomocí ní degradovány víceméně náhodné části cytoplasmy nebo specificky, kdy dochází k degradaci konkrétních struktur. Mechanismy, které umožňují specifickou autofagii, zatím nejsou zcela objasněny. Některé výzkumy v této oblasti naznačují jeden z možných principů, jak jsou specificky odstraňovány ubiquitinované proteinové agregáty (Pankiv et al., 2007). Tyto proteinové agregáty vznikají polymerací a shluknutím špatně složených proteinů a jsou tak velké, že nemohou být degradovány proteazomem. Na ně se váží ubiquitin vazebné proteiny p62 a NBR1 (neighbor of BRCA1 gene1). Oba proteiny obsahují LC3-interagující domény, což jim umožňuje cílit tyto ubiquitinované proteinové agregáty do vznikajících autofagozomů. Dále jsou pomocí specifické autofagie degradovány organely. Příkladem může být mitofagie. Regulace mitofagie je zprostředkována PINK1/Parkin dráhou. PINK1 (PTEN - induced putative

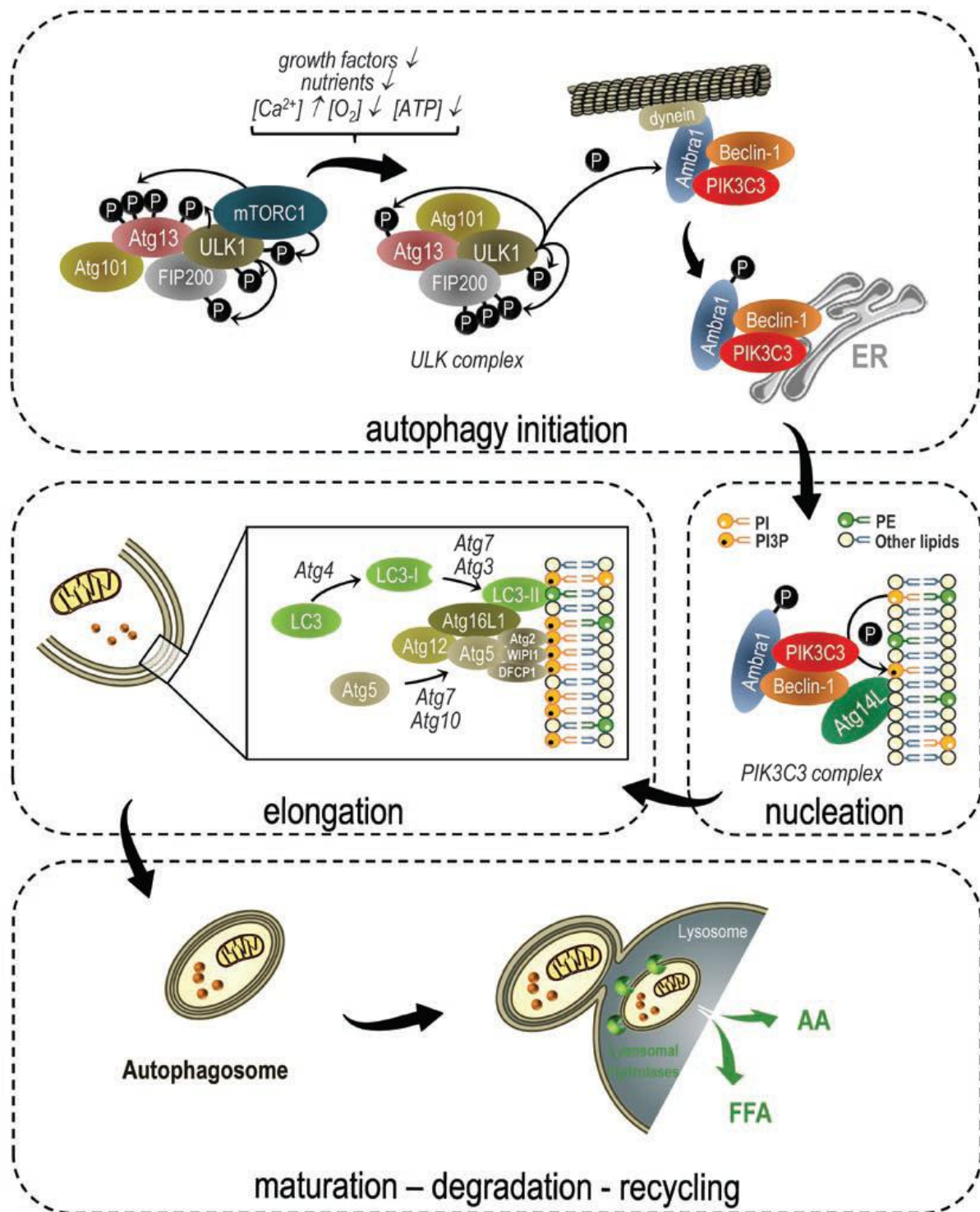
kinase 1) je kináza, která při depolarizaci mitochondriální membrány umožňuje navázání Parkinu na mitochondrie. Ve zdravých polarizovaných mitochondriích probíhá proteolitické štěpení PINK1 a tím je udržována jeho nízká hladina. Při depolarizaci se začne PINK1 hromadit, což umožní navázání Parkinu (Narendra et al., 2010). Parkin je E3 ubikvitin ligáza a ubikvitinuje molekuly na povrchu mitochondrií, např. VDAC (voltage-dependent anion channel). Ubikvitinace funguje jako signál pro mitofagii (Geisler et al., 2010). Na cílení mitochondrií do autofagozomu se pak podílí nejspíše také p62, neboť snížená exprese p62 vede k inhibici autofagie. Mechanismus tohoto procesu je nejspíše podobný jako při cílení ubikvitinovaných proteinových agregátů. Na ubikvitinované proteiny na povrchu mitochondrií se váže přes ubikvitin vazebnou doménu p62. Přes LC3 vazebnou doménu se p62 pak váže na LC3 a tím mitochondrie cílí do autofagozomu. Existuje však i na Parkinu nezávislá mitofagie. Té se účastní proteiny NIX a BNIP3, které jsou na mitochondriích a fungují jako autofagické receptory. Oba zprostředkovávají vazbu s LC3 (Hanna et al., 2012; Novak et al., 2010).

### **3.4 Fúze s lysozomem**

Autofagozom může fúzovat jak přímo s lysozomem, tak nejdříve s časným nebo pozdním endozomem vytvořit amfizom a až následně fúzovat s lysozomem (Berg et al., 1998). Před samotným sfúzováním je potřeba dopravit autofagozomy k lysozomům. Jedním z proteinů účastnících se transportu autofagosomu k lysozomu je ESCRT-III (endosomal sorting complex required for transport) neboť jeho inaktivace způsobuje hromadění autofagozomů v buňce (Lee et al., 2007). Dalšími buněčnými komponenty, které mají podíl na transportu k lysozomu, jsou mikrotubuly. Indukovanou depolimerací mikrotubulů pomocí nocodazolu a vinblastinu dochází ke zpomalení fúze autofagozomu a lysozomu (Tong et al., 2010).

Samotná fúze je pak zprostředkována proteiny SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor), HOPS (homotypic fusion and protein sorting), které se podílí hlavně na počáteční fázi fúze a Rap proteiny (Tong et al., 2010).

Po degradaci obsahu autofagozomu lysozomálními degradačními enzymy jsou produkty degradace transportovány zpět do cytoplasmy přes transportéry. Příklad jednoho takového transportéru je Atg22, který se podílí na transportu aminokyselin (Yang et al., 2006).



Obrázek č. 1 Schématické shrnutí jednotlivých fází molekulárního mechanismu autofagie  
 V první části je zobrazen průběh indukce autofagie, mTORC1 komplex je vázán ULK komplex a fosforyluje některé jeho součásti, snížená koncentrace růstových faktorů, živin,  $Ca^{2+}$ , hypoxie a nižší hladina ATP vede k uvolnění mTORC1 komplexu a k fosforylaci Ambra1, což způsobí uvolnění celého PIK3C3 komplexu a jeho vazbě na endoplasmatické retikulum, v části nukleace můžeme vidět jak PIK3C3 komplex fosforyluje fosfatidylinositol na fosfoinositol-3-fosfát. Následuje znázornění dvou ubiquitin-like konjugáčnických drah, které vedou ke vzniku konjugátu Atg5-Atg12-Atg16L a LC3-PE při procesu elongace, poslední díl obsahuje schématické zobrazení fúze autofagozomu s lysozomem a degradaci pomocí lysozomálních hydroláz a následnou recyklaci aminokyselin a mastných kyselin. Převzato z (Wirawan et al., 2012).

## 4 Interakce autofagie s apoptotickou signalizací

Autofagie je ve svém základním principu proces, který napomáhá buněčnému přežití. Ať už se jedná o její funkci při adaptaci na stresové prostředí, či udržování buněčné homeostáze. Naproti tomu apoptóza je jeden z hlavních mechanismů programované buněčné smrti. Zejména z tohoto hlediska jsou tyto dvě dráhy z principu antagonistické. Již na počátku výzkumu autofagie byly objeveny komplexní interakce mezi oběma drahami a postupem času se ukazovalo, že vzájemná regulace probíhá na nejrůznějších úrovních obou drah (Gordy and He, 2012). Dochází k regulacím pomocí interakcí regulačních proteinů obou drah například interakce regulátoru autofagie Beclinu-1 a proteinů Bcl-2 rodiny, které tvoří důležitou součást apoptotické dráhy. Dále dochází k vzájemným degradacím a štěpením elementů jednotlivých drah. K interakci mezi apoptotickou a autofagickou signalizací dochází i na úrovni regulace exprese jejich komponent pomocí (Xu et al., 2012).

### 4.1 Beclin-1 a Bcl-2 rodina

Beclin-1 je důležitou součástí autofagické dráhy. (viz kapitola 2.1.1). Naopak Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) rodina, tvoří proteiny, které jsou nezbytné pro regulaci vnitřní dráhy spouštění apoptózy. Proteiny této rodiny jsou charakteristické přítomností čtyř různých homologických domén, označovaných BH (Bcl-2 homology) domény. Podle zastoupení jednotlivých domén a podle toho zda působí pro či anti apoptoticky se dají rozdělit do tří skupin: multidoménové antiapoptotické (např. Bcl-2, Bcl-xL), multidoménové proapoptotické (např. Bax, Bak) a proapoptotické proteiny obsahující pouze BH3 doménu (např. Bim, Bid, Bad). Proapoptotické proteiny napomáhají permeabilizaci mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu c, který aktivuje cytoplasmatické kaspázy, které dále aktivují efekty apoptotické dráhy. Naproti tomu skupina antiapoptotických proteinů inhibuje tyto proapoptotické proteiny (Chipuk et al., 2010). Proapoptotické proteiny nesoucí pouze BH3 doménu působí tak, že blokují tyto antiapoptotické proteiny nebo napomáhají aktivaci apoptotických proteinů Bak (Bcl-2 associated X protein) a Bax (Bcl-2-associated death promoter protein) (Happo et al., 2012).

Schopnost Beclinu-1 interagovat s Bcl-2 je známa již celkem dlouho (Liang et al., 1998). Přičemž se později ukázalo, že tato interakce vede k inhibici autofagie (Patingre et al., 2005). Dále bylo zjištěno, že Beclin-1 interaguje také s Bcl-xL. Beclin-1 je protein nesoucí BH3 doménu (Feng et al., 2007; Oberstein et al., 2007) a interakce mezi Beclinem-1 a Bcl-2,

Bcl-xL probíhá právě přes BH3 doménu. Inaktivační mutace v BH3 doméně tuto interakci inhibují (Maiuri et al., 2007).

Recentně byl popsán protein NAF-1 (nutrient-deprivation autophagy factor-1) ovlivňující vazbu Beclinu-1 a Bcl-2. Tento protein stabilizuje vazbu těchto dvou proteinů (Chang et al., 2010). Zároveň pokud je redukována exprese tohoto proteinu dochází k přerušení vazby Beclinu-1 a Bcl-2 a dochází k indukci autofagie (Chang et al., 2010).

Naproti tomu existují proteiny, které inhibují vazbu mezi Bcl-2 a Beclinem-1 a umožňují tak iniciovat autofagii během stresových podmínek. Patří mezi ně JNK (c-Jun Terminal kinase), DAPK (death associated protein kinase) HMGB1 (high mobility group box 1). Dále je tato interakce ovlivňována proapoptotickými proteiny Bad a Bax z rodiny Bcl-2.

#### **4.1.1 JNK**

JNK je nezbytný pro indukci autofagie v buňce při nedostatku živin. Mechanismus působení JNK, spočívá v tom, že JNK fosforyluje regulační smyčku v Bcl-2 a tím naruší interakci Bcl-2 s Beclinem-1 a odblokuje tím inhibici autofagie. Pokud nějakým způsobem zabráníme této fosforylaci, mutací v regulační smyčce Bcl-2 nebo ztrátou JNK, buňka není schopná při nedostatku živin spustit autofagii. Zároveň pokud v buňkách s dostatečným přísunem živin zvýšíme expresi JNK, také dojde k indukci autofagie (Wei et al., 2008).

#### **4.1.2 DAPK**

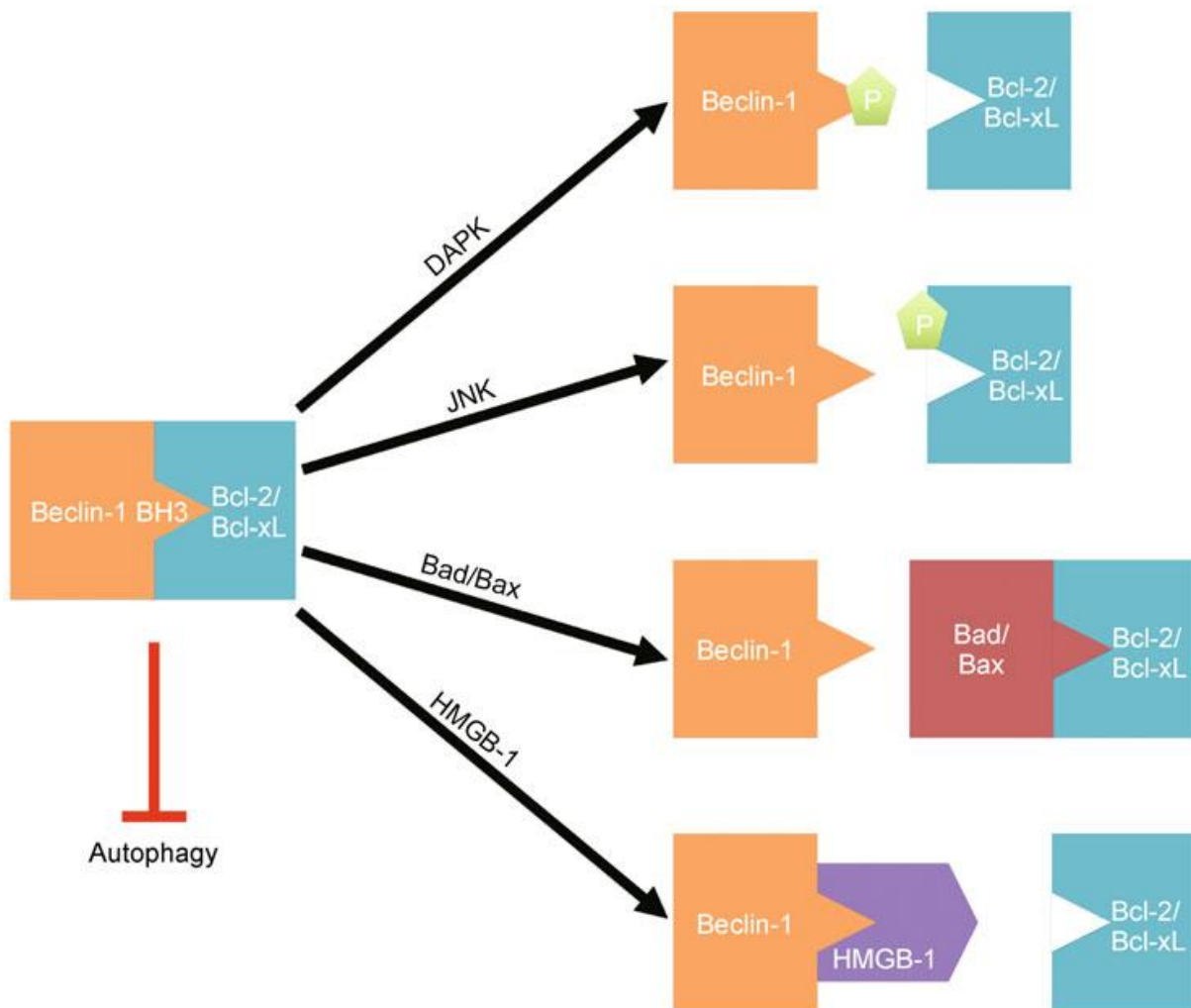
Podobně jako JNK DAPK způsobuje disociaci Beclinu-1 a Bcl-2. Oproti JNK však fosforyluje Beclin-1. Ten je fosforylován na své BH3 doméně přes kterou dochází k interakci mezi oběma proteiny. Fosforylaci mimikující mutace v BH3 doméně také přispívá ke zvýšení indukce autofagie (Zalckvar et al., 2009).

#### **4.1.3 HMGB-1**

HMGB-1 patří mezi jaderné DAMP (damage associated molecular pattern). Z jadra je translokován při stresových podmínkách. Působí rozpad komplexu Beclin-1-Bcl-2, tak že se váže na Beclin-1. Jeho inhibice vede ke snížení autofagie, což dokazuje, že se tímto způsobem podílí na její indukci. (Tang et al., 2010).

#### 4.1.4 Bad, Bax

Bad (Bcl-2 associated death promotor) i Bax (Bcl-2 asociated X protein)ovlivňují vazbu Beclin-1-Bcl-2, ale každý s jiným výsledným účinkem na autofagii. Bad vazbou na Bcl-2 způsobuje pozitivní regulaci autofagie, zatímco při vazbě Baxu dochází k její inhibici (Luo and Rubinsztein, 2010; Maiuri et al., 2007). Inhibiční efekt Baxu je nejspíše způsoben, tím, že aktivuje apoptotickou signalizaci jejímž důsledkem je štěpení Beclinu-1 aktivovanou kaspázou 3(Luo and Rubinsztein, 2010).



Obrázek č. 2 Schématické znázornění působení DAPK, JNK, Bad/Bax, HMGB-1 na komplex Beclin-1-Bcl-2. DAPK fosforyluje BH3 doménu Beclinu-1, JNK fosforyluje regulační smyčku Bcl-2, HMGB-1 se váže na Beclin-1. Převzato z (Gordy and He, 2012)

## **4.2 Vzájemná funkční ovlivňování apoptózy a autofagie**

Jak autofagie tak apoptóza jsou ve své podstatě degradační procesy. Autofagie je determinována degradací obsahu autofagozomu v lysozomu a v apoptické dráze jsou esenciálními cystein obsahující a za aspartátem štěpící proteázy z rodiny kaspáz. Níže jsou rozvedeny doposud zjištěné poznatky o vzájemném exekčním ovlivňování autofagie a apoptózy (Gordy and He, 2012).

### **4.2.1 Exekční vliv apoptotické signalizace na autofagii**

Fragmenty vzniklé štěpením Atg proteinů apoptotickými proteázami mohou vést k inhibici autofagie a v některých případech k indukci apoptózy a tím řídit přepínání mezi autofagií a apoptózou. Příkladem takto štěpeného Atg proteinu je Atg5. Jeho funkci v autofagické dráze jsme si naznačili dříve (viz. Kapitola 2.3). Atg5 protein je štěpenproteázou kalpainem 1 a 2. Vzniklý N-terminální produkt není schopen indukovat autofagii (Yousefi et al., 2006). Ale na druhou stranu byl detekován v lidských neutrofilech, které umírali spontánní apoptózou. U několika dalších buněčných typů byl detekován v mitochondriích. V nich pakasocioval s inhibítozem apoptózy Bcl-xL, což mělo za následek inhibici anti-apoptické funkce Bcl-xL a naopak umocňovalo proapoptotickou signalizace. Při zvýšené expresy tohoto proteinové fragmentu docházelo k jaderné kondenzaci, která je jedním ze znaků apoptózy (Yousefi et al., 2006). Všechny tyto experimenty poukazují na to, že N-terminální fragment Atg5 je schopen indukovat apoptózu.

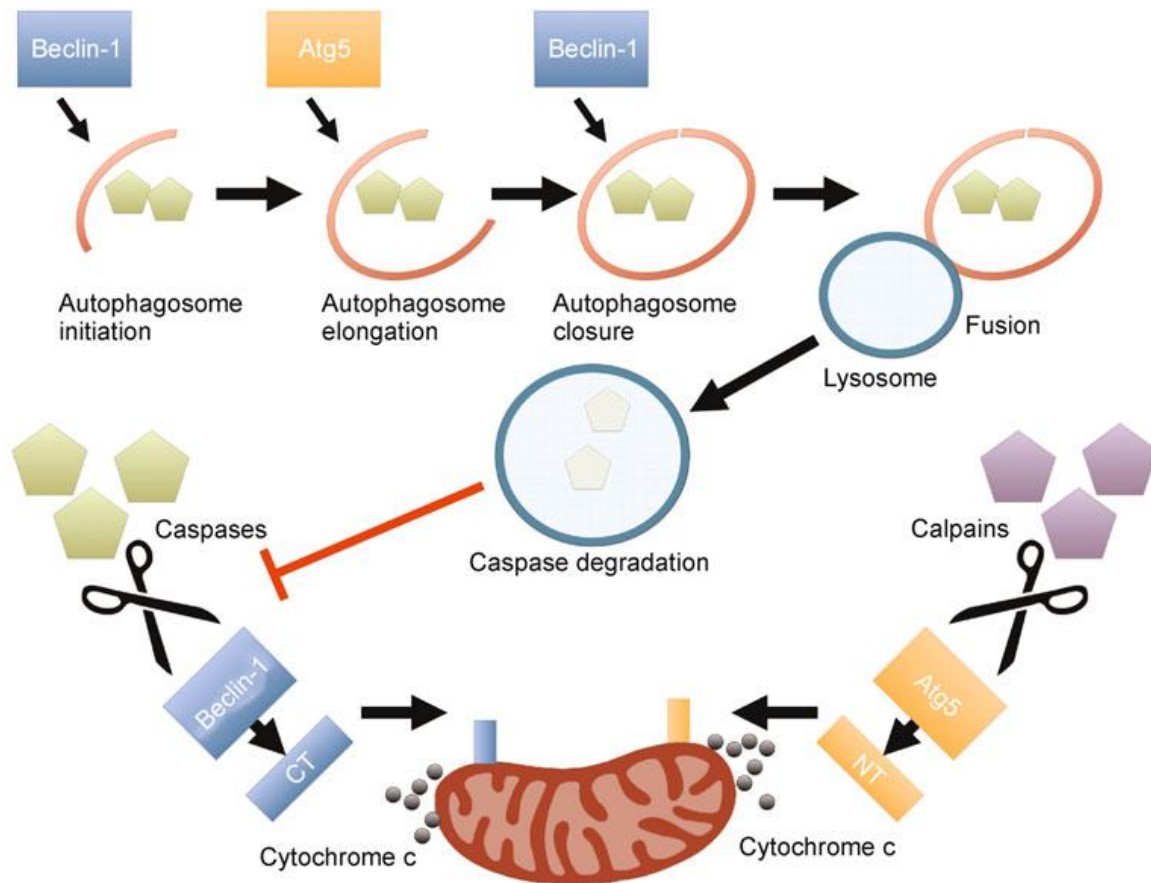
Dalším proteinem autofagie u kterého bylo zaznamenáno štěpení apoptotickými proteázami je také Beclin-1. Jeho štěpení kaspázami vede, podobně jako v případě štěpení Atg5, k inhibici autofagie a zároveň k aktivaci apoptózy. Jeho fragmenty jsou lokalizovány do mitochondrií a spoluaktivují permeabilizaci vnější mitochondriální membrány (Wirawan et al., 2010; Zhu et al., 2010). Na druhou stranu se zdá, že štěpení Beclinu-1 se nějakým způsobem podílí i na autofagii. Naznačuje to experiment, při kterém je v buňkách přerušena exprese normálního Beclinu-1 a je v ní exprimován pouze mutovaný Beclin-1, který nelze štěpit. Takové buňky pak nejsou schopné autofagie (Zhu et al., 2010).

#### 4.2.2 Role autofagické degradace v apoptotické signalizaci

Při oogenzi *D. melanogaster* dochází k degradaci apoptotického inhibitoru dBruce. Tato degradace umožní v pozdní fázi oogeneze odstranění sesterských buněk a je nejspíše prováděna autofagií. Tím, že dojde k degradaci inhibitoru apoptózy tyto buňky pak prodělávají buněčnou smrt (Nezis et al., 2010).

Dalším příkladem autofagické degradace složek apoptotické dráhy je degradace kaspázy-8. (Hou et al., 2010). K tomuto procesu dochází v nádorových buňkách odolných proti aktivaci apoptózy přes TRAIL (TNF-related ligand) (více viz kapitola 4.3).

Příklady ukazující vzájemnou degradaci složek obou drah, poukazují na možnost existence mechanismu vzájemné negativní regulace autofagie a apoptózy. Kdy autofagie degraduje důležité složky apoptotické dráhy, čímž ji inhibuje. Naproti tomu proteázy apoptotické dráhy degradují proteiny účastníci se autofagie a tím ji inhibují (Gordy and He, 2012). (viz obrázek č. 3).



Obr. č. 3: Schematické znázornění možného mechanismu vzájemné regulace autofagie a apoptózy na úrovni vzájemné degradace a štěpení složek jejich drah. V horní části obrázku je znázorněna degradace kaspáz, které se v jednotlivých fázích účastní Beclin-1 a Atg5. Tím že jsou kaspázy degradovány, nedochází ke štěpení Beclinu-1, které jinak vede ke vzniku C-terminálního fragmentu tohoto štěpení (CT), který po lokalizaci do mitochondrií napomáhá při vylití cytochromu c do cytoplasmy, což vede k dalším krokům apoptotické dráhy. Obdobně je štěpen Atg5 kalpainy za vzniku N-terminálního fragmentu Atg5 (NT), který má stejný účinek jako CT fragment Beclinu-1. Převzato z Gordy and He, 2012.

### 4.3 Interakce autofagie s vnější dráhou indukce apoptózy

Na začátku vnější dráhy apoptózy je receptor smrti (death receptor) z rodiny TNFR, na který se váže death ligand, což vede ke vzniku DISC (death-inducing signaling complex). Jeho součástí je FADD (Fas-associated protein with death domain) a pro-kaspáza-8, která je štěpena a vzniká volná aktivovaná kaspáza-8. Kaspáza-8 je zodpovědná za štěpení dalších složek apoptotické dráhy, což vede až k samotné buněčné smrti. Na DISC se může vázat regulátor FLIP (FLICE-like inhibitory protein) (Gordy and He, 2012).

Interakce autofagie s vnější dráhou indukce apoptózy lze pozorovat například u buněk s nějakým způsobem nefunkční vnitřní dráhou aktivace apoptózy. Například nefunkční FADD nebo kaspáza-8 vede u T-buněk ke zvýšené aktivitě autofagie (Bell et al., 2008).

Regulátor vnější dráhy aktivace apoptózy FLIP, se zároveň účastní regulace autofagie. Inhibuje autofagii tím, že se váže na Atg3, který je důležitý při procesu elongace autofagozomu (Lee et al., 2009).

TRAIL receptor je jedním z death-receptorů, který se účastní aktivace vnější dráhy apoptózy. TRAIL receptor po navázání TRAILu spouští apoptózu. Toto působení je specifické vůči nádorům. Existují však nádory, které jsou proti tomuto způsobu indukce apoptózy odolné (Gordy and He, 2012). Tato odolnost je nejspíše způsobena, tím, že po vazbě TRAILu na jeho receptor je kaspáza-8 transportována do lysozomu a degradována a to pomocí autofagické dráhy (Han et al., 2008; Hou et al., 2010). Přesný mechanismus cílení kaspázy-8 do autofagozomu není zatím znám.

#### **4.4 Role miRNA v interakci autofagie a apoptózy**

Molekuly miRNA jsou oligonukleotidy, které účastní regulace mnoha buněčných procesů, tím že se podílejí na inhibici genové exprese. Regulují apoptózu i autofagii a jak se zdámohou se účastnit i interakce těchto dvou drah i když tento proces nebyl zatím přímo dokázán. Micro RNA regulují genovou expresy proteinů, které tuto interakci přímo zprostředkovávají. Příkladem může být Beclin-1 jehož exprese je inhibována MIR30A (Zhu et al., 2009). Některé miRNA se účastní regulace exprese vícero genů a existují i miRNA, které ovlivňují expresi proteinů účastnících se autofagie a zároveň expresi proteinů důležitých pro apoptózu. Takové miRNA by pak mohli řídit rovnováhu mezi autofagií a apoptózou. Zvýšení exprese atg genů by vedlo ke zvýšení inhibice autofagie a zároveň ke snížení inhibice apoptózy a to zejména pro to, že by ubylo množství volných miRNA. Naopak při zvýšení exprese genů účastnících se apoptózy by došlo k opačnému efektu. Příkladem miRNA, které se podílí na regulaci autofagie i apoptózy je MIR101 (Zhai et al., 2013).

## 5 Autofagická buněčná smrt

Přestože je autofagie často pokládána za další typ programované buněčné smrti, tak je její podíl na buněčné smrti stále ještě kontroverzní a v současné době na tuto problematiku neexistuje jednotný, konsensuálně přijímaný názor (Denton et al., 2012). Za buněčnou smrt autofagií bylo dříve považováno už jen zvýšení aktivity autofagie v umírajících buňkách (Clarke, 1990 podle Shen and Codogno, 2011). Autofagie funguje hlavně jako proces podporující buněčné přežití a výskyt autofagie v umírajících buňkách je tedy logický. Buňka se snaží autofagií smrti předejít. V poslední době se však vyskytují příklady, kdy se autofagie přímo podílí na buněčné smrti. V další části jsou uvedeny příklady, které naznačují přímou účast autofagie na buněčné smrti a naopak důvody, které stojí proti.

### 5.1 Příklady naznačující existenci autofagické buněčné smrti

Autofagie je spojena s buněčnou smrtí v průběhu vývoje *Dictyostelium discoideum*, v průběhu metamorfózy a oogeneze *Drosophila melanogastera* v poslední době se ukazuje, že se účastní i buněčné smrti u savců.

#### 5.1.1 *Dictyostelium discoideum*

*Dictyostelium discoideum* je améba, žijící v půdě. Při nedostatku potravy dochází k agregaci jednotlivých améb a vzniku plodničky (Denton et al., 2012). Tento proces vyžaduje buněčnou smrt, na které se podílí Atg1 protein, jenž je esenciální součástí autofagické dráhy. Při hladovění dochází v buňkách *Dictyostelia* k aktivaci autofagie jako klasické odpovědi na stres. Při přidání DIF-1 (differentiation factor 1) dochází k buněčné smrti. Pokud jsou buňky s mutací v Atg1 vystaveny hladovění a DIF-1, tak k buněčné smrti nedochází. Což poukazuje na účast autofagie v procesu buněčné smrti a zároveň naznačuje možný mechanismus, jak dochází v buňce k rozhodování, zdali má autofagie napomáhat buněčnému přežití, či se účastnit buněčné smrti (Luciani et al., 2011).

#### 5.1.2 *Drosophila melanogaster*

Dalším příkladem účasti autofagie na buněčné smrti je metamorfóza *Drosophila melanogaster* (Berry and Baehrecke, 2007). Jedním z procesů, ke kterému během její metamorfózy dochází, je degradace larválních slinných žláz, na které se nejspíše podílí autofagie. Na regulaci této degradace se podílí hlavně hormon ekdyson, který zvyšuje expresi proteinů důležitých v apoptóze, ale zároveň zvyšuje expresi proteinů účastnících se autofagie.

To vede ke zvýšení apoptózy a autofagie v buňkách určených k degradaci (Lee et al., 2002). Inhibováním aktivace kaspáz potřebných v apoptotické dráze, nedochází k úplnému zastavení degradace slinných žláz (Denton et al., 2012). V buňkách, kde je autofagie blokována mutacemi v atg genech, dochází ke zpomalení degradace larválních slinných žláz. Inhibice obou drah současně pak vede k mnohem vyšší inhibici degradace těchto buněk. Toto naznačuje, že se tohoto procesu nejspíše účastní obě dráhy současně. Důležitost autofagie při odstraňování larválních slinných žláz, také podporuje fakt, že zvýšená exprese Atg1 je schopná vyvolat buněčnou smrt těchto žláz nezávislou na aktivaci apoptotických kaspáz (Berry and Baehrecke, 2007). Autofagie má také důležitou roli buněčné smrti buněk larválního středního střeva u *Drosophily*. V buňkách larválního středního střeva procházející degradací je zvýšená exprese proteinů apoptotické dráhy. Avšak inhibicí apoptózy, inhibicí kaspáz nebo mutacemi v apoptotické dráze, nedochází ke snížení odstraňování těchto buněk. Naproti tomu inhibice autofagie, mutacemi v atg genech nebo RNA interferencí, vede ke značnému opoždění odstraňování středního střeva. Současná inhibice apoptotické dráhy a autofagie pak způsobuje stejný efekt jako při inhibici samotné autofagie (Denton et al., 2009). V procesu odstraňování larválního středního střeva může mít tudíž autofagie důležitější roli než při odstraňování larválních slinných žláz. Přestože v obou případech je autofagie nezbytná, její inhibice vede pouze k opoždění buněčné smrti a ne k jejímu úplnému zastavení. Autofagie se účastní také buněčné smrti během oogeneze *Drosophily*. V pozdní fázi oogeneze je zodpovědná za aktivaci buněčné smrti v sesterských buňkách (viz kapitola č. 4.2.2). Mutace v atg1 a atg13, způsobí, že sesterské buňky přežívají ještě v oogenezy přičemž v normálních buňkách se v této fázi již nevyskytují (Nezis et al., 2010).

### 5.1.3 Savčí buňky

Jak naznačují některé výzkumy autofagie se může podílet na buněčné smrti i u savců. Je však nutno podotknout, že mnoho z těchto výzkumů, bylo prováděno na rakovinných buňkách, často s nefunkční apoptotickou signalizací. Některé buňky po vystavení cytotoxickým lékům v sobě indukují autofagii, kterou následuje buněčná smrt. Například myší embryonální fibroblasty s vyřazenými Bax a Bad geny, v sobě indukují autofagii a následně umírají po přidání etoposidu. Potlačením exprese Atg4 a Beclinu-1 za pomoci RNA interference je této etoposidem indukované smrti zabráněno (Shimizu et al., 2004). Podobně u buněk myšího fibrosarcomu, ve kterých je inhibována kaspáza-8 pomocí zVAD, dochází k buněčné smrti, kterou lze blokovat snížením exprese Beclinu-1 a Atg-7 pomocí siRNA (Yu et al., 2004). Naproti tomu novější studie, používající v experimentech stejný systém, vyvrací

účast autofagie na buněčné smrti těchto buněk (Wu et al., 2008). Dalším příkladem mohou být buňky lymfoblastické leukemie, v nichž po přidání dexamothonu dochází k nárůstu autofagických markerů a až poté k markerům apoptózy a buněčné smrti. Zvýšení autofagie se tak může jevit jako reakce buňky na stres, ale v buňkách s inhibovanou autofagií, narušením exprese Beclinu-1 nebo přidáním inhibitorů autofagie, dochází k poklesu buněčné smrti (Laane et al., 2009). Dexamethasone indukuje autofagii a následnou buněčnou smrt také u buněk mnohočetného myelomu (Grandner et al., 2009). Současné studie ukazují, že indukci autofagie, která vede k buněčné smrti, dochází také v buňkách exprimujících aktivovaný Ras protein. Lidské epiteliální buňky povrchu ovarií u, kterých je indukována exprese onkogenu H-Ras, přestávají proliferovat, dochází u nich k indukci autofagie a následné buněčné smrti. V průběhu toho v nich nejsou aktivovány kaspázy, tudíž buněčná smrt není způsobena apoptózou. Ale dochází v nich k lipidaci LC3 a formování autofagosómů, což jsou jedny z hlavních markerů autofagie. Snížením exprese Atg5 nebo Atg7 je Rasem indukovaná buněčná smrt inhibována (Elgandy et al., 2011). Naproti těmto studiím ukazujícím autofagii indukovanou expresí Ras, jako proces, který se nejspíše podílí na buněčné smrti, existují i studie, které odhalují, že může autofagie po indukci Rasem naopak napomáhat přežívání buněk a hrát roli při růstu nádorů (viz kapitola 6.2).

Autofagie nejspíše způsobuje buněčnou smrt nervových kmenových buněk hippocampu při nedostatku insulinu. Pokud jsou tyto buňky deprivovány o insulin, dochází v nich k nárůstu autofagie a buněčné smrti. Během tohoto procesu v nich nebyla zaznamenána aktivace kaspáz, ale potlačení exprese Atg7 tuto buněčnou smrt inhibovalo. Naopak zvýšením autofagie a to inhibicí mTOR pomocí rampamycinu dojde k nárůstu počtu zemřelých buněk (Baek et al., 2009).

## **5.2 Důvody popírající existenci autofagické buněčné smrti**

To, že se na buněčné smrti podílí proteiny z Atg proteiny (Berry and Baehrecke, 2007; Luciani et al., 2011), účastníci se autofagie, nemusí znamenat, že se na buněčné smrti podílí samotná autofagie. Některé proteiny mohou mít funkci v dráze autofagie a zároveň napomáhat aktivaci apoptózy. Existuje tedy možnost, že i další proteiny účastníci se autofagie a které jsou používány jako markery, mohou mít další na autofagii nezávislou roli.

Navíc pokusy, které demonstrují přímé spojení autofagie a buněčné smrti, jsou často prováděny na manipulovaných nebo jinak poškozených buňkách. Často je v těchto buňkách uměle zvýšená aktivita autofagie, která vede k nefyziologickým stavům v buňce. Autofagická

buněčná smrt tudíž může být v některých případech pouze artefaktem nebo se vyskytovat pouze za nefyziologických podmínek.

Přestože důkazy poukazující na to, že autofagie by mohla za určitých podmínek vést k buněčné smrti, jsou velice silné a přibývá jich, přesný mechanismus jakým k této autofagické buněčné smrti dochází, není zatím znám. Zvýšená indukce autofagie by mohla vést k nespecifické degradaci velké části buňky, případně by se mohlo jednat o specifickou degradaci faktorů kritických pro buněčné přežití(Denton et al., 2012).

## 6 Autofagie a rakovina

Současné výzkumy ukazují na důležitost autofagie v procesu tumorogeneze. Ukazuje se, že autofagie může působit v závislosti na kontextu a situaci jak pro-, tak i protinádorově. V dalších kapitolách jsou uvedeny příklady, kdy může působit tumorsupresivně, kdy tumorsupresivně a je diskutováno možné využití autofagie při léčbě rakoviny.

### 6.1 Tumorogenní účinky autofagie

Jednou z hlavních funkcí autofagie je napomáhání přežívání buňky ve stresových podmínkách. Rakovinné buňky jsou často vystaveny stresovým podmínkám, které jim umožňují přežít právě autofagie. Naznačují to výzkumy při, který po inhibici autofagie dochází k zastavení růstu nádoru a smrti nádorových buněk. Příkladem stresových podmínek proti, kterým autofagie chrání nádorové buňky je hypoxie. Hypoxii jsou často vystaveny buňky pevných nádorů. Tyto nádorové buňky jsou také často odolné vůči radioterapii (Macintosh and Ryan, 2013). Pokud inhibujeme autofagii, začnou být tyto buňky znovu citlivé k hypoxii a radioterapii. Autofagie bude také nejspíše hrát roli při ochraně před radioterapií. Na indukci autofagie v nádorech při hypoxii se mimo jiné podílí také odpověď na špatně sbalené proteiny a proteiny BNIP3 a NIX. (Bellot et al., 2009; Rouschop et al., 2010). BNIP3 a NIX hrají roli také při mitofagii. Degradací mitochondrií mohou buňky snižovat hladinu ROS, která se zvyšuje právě během hypoxie. Autofagie je také, jak se zdá zodpovědná za ochranu některých hypoxických nádorů před cytotoxickými T-lymfocyty. Pokud inhibujeme autofagii v takovýchto buňkách pomocí RNA interference Beclinu-1 nebo Atg5, začnou být znovu citlivé k cytotoxickému působení T-lymfocytů (Noman et al., 2011).

Autofagie má význam při tumorogeneze zprostředkované onkogením proteinem Ras. V některých lidských nádorech, nesoucích mutaci v Ras je zvýšena aktivita autofagie. Pokud ji inhibujeme potlačením exprese Atg5 nebo Atg7, buňky jsou velice citlivé k hladovění. Zároveň v nich dochází k hromadění abnormálních mitochondrií a poruchám energetického metabolismu (Guo et al., 2011). V tomto případě je tedy autofagie nezbytná pro růst rakovinných buněk, díky její schopnosti degradovat disfunkční mitochondrie. Obdobným způsobem se autofagie také podílí na přežívání buněk rakoviny slinivky břišní (Yang et al., 2011).

Mnoho nádorů je odolných proti protinádorové léčbě. Často je za tuto odolnost zodpovědná autofagie. Existují příklady, kdy protinádorová léčba v buňkách nádoru nezpůsobuje buněčnou smrt nebo zastavení proliferace, ale dochází v nich k aktivaci autofagie. Příkladem protinádorové léčby, která způsobuje indukci autofagie je radioterapie, chemoterapie (např. doxorubicin, temozolomid, etoposid), inhibitory histone deacetylázy, oxid arsenitý, TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), INF $\gamma$  (interferon gamma), rapamycina další (Dalby et al., 2010). Přesný mechanismus jakým způsobem se autofagie podílí na rezistenci nádorů vůči protirakovinné léčbě, není zatím znám. Buňky leukemie vystavené chemoterapii produkují HGMB1, který je sekretován, zároveň působí uvnitř buňky. V obou případech způsobuje indukci autofagie (viz kapitola 4.1.3). Neutralizace HGMB1 pomocí protilátek, vede k zvýšení sensitivity buněk leukemie vůči chemoterapii (Liu et al., 2011). Dalším možným tumorogenním účinkem autofagie je schopnost bránit aktivaci apoptózy skrze TRAIL, jak bylo popsáno v kapitole 4.3.

Autofagie se podílí na odolnosti některých buněk vůči anoikis, buněčné smrti, ke které dochází při ztrátě kontaktu s extracelulární matrix (ECM) (Gilmore, 2005). V průběhu vývoje mléčných žláz, dochází ke ztrátě kontaktu některých epiteliálních buněk s ECM a později znovu ke spojení. V době, kdy epiteliální buňky nejsou v kontaktu s ECM, dochází v nich ke snížení hladiny ATP a zvýšení hladiny ROS. Tyto podmínky buňkám pomáhá přežít právě autofagie. Zdá se, že by tuto její funkci mohli zneužívat i nádorové buňky (Espina et al., 2010; Fung et al., 2008). Mohla by mít tedy také důležitou funkci v průběhu metastáze, neboť důležitým krokem v metastatickém procesu je právě přežití anoikis.

## **6.2 Tumorosupresivní účinky autofagie**

Důležitost autofagie jako tumorosupresivního procesu naznačuje skutečnost, že existuje řada nádorů, které mají sníženou expresi Atg proteinů nebo nesou delece v jejich genech. Například BECN1 gen je deletován v 9 z 22 zkoumaných buněčných linií rakoviny prsu (Aita et al., 1999), dále je deletován v nádorech prostaty a vaječníků. Snížená exprese Beclinu-1 vůči normálním buňkám byla pozorována v nádorech tlustého střeva, mozku, v buňkách rakoviny děložního hrdla nebo v hepatocelulárních karcinomech (Dalby et al., 2010). Všechny tyto příklady poukazují na spojitost defektní autofagie s nádory. Dalším důkazem této spojitosti je studie, která ukazuje, že při inhibici autofagie, pomocí inhibice Beclinu-1, v myši, dochází k častějšímu spontánnímu vzniku rakoviny plic, jater a vývoji lymfomů

(Dalby et al., 2010). Naopak při obnovení funkčnosti Atg proteinů v rakovinných buňkách, dochází ke zpomalení růstu nádoru. Dalším důležitým proteinem autofagie, který hraje nejspíše roli v tumorosupresivním účinku autofagie je protein UVRAG. Monoalelické mutace v genu pro UVRAG se často vyskytují v nádorech tlustého střeva. Nadměrnou expresí UVRAG dochází ke zpomalení proliferace nádoru (Liang et al., 2006). Dalšími Atg proteiny, které jsou mutovány v nádorech, jsou například Atg5, FIP200, Atg9b, Atg2B (Wirawan et al., 2012).

Mechanismus tumorosupresivního působení autofagie není zatím přesně znám. Význam by mohla mít schopnost autofagie udržovat buněčnou homeostázi. Tím že odstraňuje poškozené organely, proteinové agregáty nebo tím, že udržuje energetickou rovnováhu v buňce, hraje důležitou roli při ochraně před poškozením genomu. Například odstraňováním poškozených mitochondrií, sníží hladinu ROS, které by jinak mohli poškozovat DNA v buňce (Mathew et al., 2007). Toto poškození následně může vést ke vzniku nebo rozvoji nádorů. V tomto případě autofagie může mít preventivní roli proti vzniku nádorů.

Dalším mechanismem jakým by mohla autofagie působit tumorosupresivně je její význam při indukci buněčné smrti. Příklady, kdy se autofagie podílí na buněčné smrti nádorů, byly rozebrány v kapitole 5.1 a některé v kapitole 4. Z těchto příkladů vyplývá, že se autofagie nejspíše přímo účastní buněčné smrti hlavně v nádorech s defektní apoptózou.

### **6.3 Význam autofagie při léčbě rakoviny**

Vzhledem k tomu, že autofagie může mít tumorosupresivní i tumorogenní účinky nabízejí se dvě možnosti modulování autofagie, které se dají využít v léčbě rakoviny. V případech, kdy autofagie napomáhá přežití nádorů, můžeme inhibicí autofagie docílit zastavení růstu nebo smrti rakovinných buněk. Inhibováním autofagie tedy snížíme schopnost přežití nádorů vystavených stresovým podmínkám vznikajících v mikroprostředí nádorů vlivem růstu samotného nádoru nebo působením protinádorové léčby. Inhibicí autofagie můžeme blokovat rezistenci některých nádorů vůči protinádorové léčbě. Možnou strategií léčby rakoviny je použití kombinace inhibice autofagie a jiné nádorové terapie. Například nádorové buňky s inhibovanou autofagií pomocí chloroquinu nebo inhibicí Atg5, umírají apoptotickou buněčnou smrtí po vystavení lékům způsobujícím alkylaci DNA (Amaravadi et al., 2007). Pokud inhibujeme autofagii pomocí 3-methyladeninu nebo snížením exprese Atg7 dochází také ke zvýšení indukce apoptózy v nádorech tlustého střeva vystavených 5-fluorouracilu (Li et al., 2010). Také buňky gliomu odvozeného od kmenových buněk se

stávají citlivé vůči radioterapii po inhibici autofagie pomocí chloroquinu (Firat et al., 2012). Mezi další inhibitory autofagie, které mají potenciál v léčení rakoviny, patří Lys05, který stejně jako chloroquin funguje jako inhibitor lysozomů (McAfee et al., 2012). Autofagie se také podílí na rezistenci nádorů k TRAIL. Pokud inhibujeme autofagii, TRAIL v nich může indukovat apoptózu (Hou et al., 2010). V současné době běží již i několik klinických testů zkoumajících možné využití inhibitorů autofagie v léčbě rakoviny (Macintosh and Ryan, 2013).

Autofagie funguje zároveň jako tumorsupresivní mechanismus. V těchto případech indukce autofagie může sloužit při léčbě rakoviny, tím že se podílí na buněčné smrti v nádorových buňkách. Rakovinné buňky mají často defektní apoptózu a nefungují proti nim léky indukující apoptózu. V takových nádorech indukci autofagie můžeme docílit buněčné smrti. Například potlačení exprese autofagického inhibitoru Bcl-2 můžeme indukovat buněčnou smrt v buňkách rakoviny prsu (Akar et al., 2008). Po indukci autofagie v buňkách akutní lymfoblastické leukemie dochází ke zrušení jejich rezistence vůči glukokortikoidům a k nekróze (Bonapace et al., 2010). Další příklady účasti autofagie na buněčné smrti byli podrobněji rozebrány dříve (viz kapitola 5.1 a 4). Mezi látky indukující autofagii, které mají tumorsupresivní účinky patří hlavně inhibitory mTOR. Bylo prokázáno, že léčí některé nádory například rakoviny prsu, pankreatické neuroendokrinní nádory nebo renální karcinom (Macintosh and Ryan, 2013).

Ze studií věnovaných významu autofagie v nádorových buňkách vyplývá, že dvojitá role autofagie v tumorigenezi záleží na kontextu daného nádoru. Nelze zatím dopředu určit, zdali bude mít autofagie na určitý typ nádoru tumorogenní nebo tumorsupresivní účinky, což komplikuje vývoj protinádorových léků cílených na autofagii. Výzkum přesného mechanismu působení autofagie na rakoviny by tento problém mohl pomoci odstranit. Zároveň by přesnější znalost tohoto mechanismu dále mohla rozvinout možnosti léčby rakoviny skrze modulaci autofagie.

## 7 Závěr

Současné studie ukazují, že interakce autofagické dráhy a dráhy apoptózy probíhá na mnoha úrovních. Přestože autofagie je především proces podporující přežití buňky a apoptóza je mechanismus buněčné smrti, nemusí se ve všech případech vzájemné interakce regulovat pouze negativně. V některých případech také nemusí jít přímo o interakci těchto dvou drah, ale proteiny účastníci se autofagie mohou mít více rolí v buňce a jedna z nich může být v apoptotické signalizaci. V takových případech by interakce těchto dvou drah mohla být pouze zdánlivá a bude chtít více prozkoumat.

Vzájemná interakce autofagie a apoptózy jak se zdá hraje také roli v autofagické buněčné smrti. Přestože nadále existují pochybnosti o roli a významu autofagické buněčné smrti, tak recentně stále více přibývá originálních zjištění a publikací podporujících autofagickou buněčnou smrt jako další způsob programované smrti.

Autofagie je esenciální pro buněčné přežití, ale zároveň za určitých podmínek může hrát roli v buněčné smrti. Tato duální role autofagie je dobře vidět u rakovinných buněk. V některých případech napomáhá rozvoji rakoviny, v jiných přispívá k jejich eliminaci. V obou případech je možné, že je za toto rozhodnutí zodpovědná interakce autofagie a apoptózy. Její přesnější porozumění by mohlo pomoci při vývoji nových protirakovinných terapií.

## 8 Zdroje

- Aita VM, Liang XH, Murty V, Pincus DL, Yu WP, Cayanis E, Kalachikov S, Gilliam TC, and Levine B (1999) Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. **Genomics**. 59, 59-65
- Akar U, Chaves-Reyez A, Barria M, Tari A, Sanguino A, Kondo Y, Kondo S, Arun B, Lopez-Berestein G, and Ozpolat B (2008) Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. **Autophagy**. 4, 669-679
- Amaravadi RK, Yu DN, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI, Thomas-Tikhonenko A, and Thompson CB (2007) Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. **Journal of Clinical Investigation**. 117, 326-336
- Andrade RM, Wessendarp M, Gubbels MJ, Striepen B, and Subauste CS (2006) CD40 induces macrophage anti-Toxoplasma gondii activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. **Journal of Clinical Investigation**. 116, 2366-2377
- Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, and Ktistakis NT (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. **J Cell Biol**. 182, 685-701
- Baek SH, Kim EK, Goudreau JL, Lookingland KJ, Kim SW, and Yu SW (2009) Insulin withdrawal-induced cell death in adult hippocampal neural stem cells as a model of autophagic cell death. **Autophagy**. 5, 277-279
- Bell BD, Leverrier S, Weist BM, Newton RH, Arechiga AF, Luhrs KA, Morrissette NS, and Walsh CM (2008) FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 105, 16677-16682
- Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, and Mazure NM (2009) Hypoxia-Induced Autophagy Is Mediated through Hypoxia-Inducible Factor Induction of BNIP3 and BNIP3L via Their BH3 Domains. **Molecular and Cellular Biology**. 29, 2570-2581
- Berg TO, Fengsrud M, Stromhaug PE, Berg T, and Seglen PO (1998) Isolation and characterization of rat liver amphisomes - Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. **Journal of Biological Chemistry**. 273, 21883-21892
- Berry DL, and Baehrecke EH (2007) Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in Drosophila. **Cell**. 131, 1137-1148
- Bonapace L, Bornhauser BC, Schmitz M, Cario G, Ziegler U, Niggli FK, Schafer BW, Schrappe M, Stanulla M, and Bourquin JP (2010) Induction of autophagy-dependent necroptosis is required for childhood acute lymphoblastic leukemia cells to overcome glucocorticoid resistance. **Journal of Clinical Investigation**. 120, 1310-1323
- Chang NC, Nguyen M, Germain M, and Shore GC (2010) Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1. **Embo Journal**. 29, 606-618
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, and Green DR (2010) The BCL-2 Family Reunion. **Molecular Cell**. 37, 299-310
- Clarke PGH (1990) DEVELOPMENTAL CELL-DEATH - MORPHOLOGICAL DIVERSITY AND MULTIPLE MECHANISMS. **Anatomy and Embryology**. 181, 195-213 podle Shen HM, and Codogno P (2011) Autophagic cell death Loch Ness monster or endangered species? **Autophagy**. 7, 457-465 \*

Dalby KN, Tekedereli I, Lopez-Berestein G, and Ozpolat B (2010) Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. **Autophagy**. 6, 322-329

Denton D, Nicolson S, and Kumar S (2012) Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. **Cell Death and Differentiation**. 19, 87-95

Denton D, Shrivage B, Simin R, Mills K, Berry DL, Baehrecke EH, and Kumar S (2009) Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. **Curr Biol**. 19, 1741-1746

Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, Oliverio S, Lisi G, Antonioli M, Pagliarini V, Matteoni S, Fuoco C, Giunta L, D'Amelio M, Nardacci R, Romagnoli A, Piacentini M, Cecconi F, and Fimia GM (2010) The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. **J Cell Biol**. 191, 155-168

Elgendy M, Sheridan C, Brumatti G, and Martin SJ (2011) Oncogenic Ras-Induced Expression of Noxa and Beclin-1 Promotes Autophagic Cell Death and Limits Clonogenic Survival. **Molecular Cell**. 42, 23-35

English L, Chemali M, and Desjardins M (2009) Nuclear membrane-derived autophagy, a novel process that participates in the presentation of endogenous viral antigens during HSV-1 infection. **Autophagy**. 5, 1026-1029

Espina V, Mariani BD, Gallagher RI, Tran K, Banks S, Wiedemann J, Huryk H, Mueller C, Adamo L, Deng JH, Petricoin EF, Pastore L, Zaman S, Menezes G, Mize J, Johal J, Edmiston K, and Liotta LA (2010) Malignant Precursor Cells Pre-Exist in Human Breast DCIS and Require Autophagy for Survival. **Plos One**. 5

Feng W, Huang SY, Wu H, and Zhang MJ (2007) Molecular basis of Bcl-xL's target recognition versatility revealed by the structure of Bcl-xL in complex with the BH3 domain of beclin-1. **Journal of Molecular Biology**. 372, 223-235

Firat E, Weyerbrock A, Gaedicke S, Grosu AL, and Niedermann G (2012) Chloroquine or Chloroquine-PI3K/Akt Pathway Inhibitor Combinations Strongly Promote gamma-Irradiation-Induced Cell Death in Primary Stem-Like Glioma Cells. **Plos One**. 7

Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, and Yoshimori T (2008) The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. **Molecular Biology of the Cell**. 19, 2092-2100

Fung C, Lock R, Gao SZ, Salas E, and Debnath J (2008) Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. **Molecular Biology of the Cell**. 19, 797-806

Ganley IG, Lam DH, Wang JR, Ding XJ, Chen S, and Jiang XJ (2009) ULK1 center dot ATG13 center dot FIP200 Complex Mediates mTOR Signaling and Is Essential for Autophagy. **Journal of Biological Chemistry**. 284, 12297-12305

Geisler S, Holmstrom KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, and Springer W (2010) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. **Nature Cell Biology**. 12, 119-U170

Gilmore AP (2005) Anoikis. **Cell Death and Differentiation**. 12, 1473-1477

Glick D, Barth S, and Macleod KF (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **Journal of Pathology**. 221, 3-12

Gordy C, and He YW (2012) The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead? **Protein & Cell**. 3, 17-27

Grander D, Kharaziha P, Laane E, Pokrovskaja K, and Panaretakis T (2009) Autophagy as the main means of cytotoxicity by glucocorticoids in hematological malignancies. **Autophagy**. 5, 1198-1200

Guo JY, Chen HY, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, Kamphorst JJ, Chen GH, Lemons JMS, Karantza V, Coller HA, DiPaola RS, Gelinas C, Rabinowitz JD, and White E (2011) Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. **Genes & Development**. 25, 460-470

Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, and Lippincott-Schwartz J (2010) Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. **Cell**. 141, 656-667

Han J, Hou W, Goldstein LA, Lu CS, Stolz DB, Yin XM, and Rabinowich H (2008) Involvement of protective autophagy in TRAIL resistance of apoptosis-defective tumor cells. **Journal of Biological Chemistry**. 283, 19665-19677

Hanna RA, Quinsay MN, Orogo AM, Giang K, Rikka S, and Gustafsson AB (2012) Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3 (LC3) Interacts with Bnip3 Protein to Selectively Remove Endoplasmic Reticulum and Mitochondria via Autophagy. **Journal of Biological Chemistry**. 287, 19094-19104

Happo L, Strasser A, and Cory S (2012) BH3-only proteins in apoptosis at a glance. **Journal of Cell Science**. 125, 1081-1087

Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, and Mizushima N (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. **Nature**. 441, 885-889

Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, and Mizushima N (2009) Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. **Mol Biol Cell**. 20, 1981-1991

Hou W, Han J, Lu CS, Goldstein LA, and Rabinowich H (2010) Autophagic degradation of active caspase-8 A crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. **Autophagy**. 6, 891-900

Itakura E, Kishi C, Inoue K, and Mizushima N (2008) Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG. **Molecular Biology of the Cell**. 19, 5360-5372

Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, and Kim DH (2009) ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. **Mol Biol Cell**. 20, 1992-2003

Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, and Yoshimori T (2004) LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. **Journal of Cell Science**. 117, 2805-2812

Kaushik S, Bandyopadhyay U, Sridhar S, Kiffin R, Martinez-Vicente M, Kon M, Orenstein SJ, Wong E, and Cuervo AM (2011) Chaperone-mediated autophagy at a glance. **J Cell Sci**. 124, 495-499

Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, and Yoshimori T (2001) Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. **Embo Reports**. 2, 330-335

Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, and Ohsumi Y (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. **Developmental Cell**. 5, 539-545

Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, and Chiba T (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. **Journal of Cell Biology**. 169, 425-434

Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhiya T, and Mizushima N (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. **Nature**. 432, 1032-1036

Laane E, Tamm KP, Buentke E, Ito K, Kharaziha P, Oscarsson J, Corcoran M, Bjorklund AC, Hultenby K, Lundin J, Heyman M, Soderhall S, Mazur J, Porwit A, Pandolfi PP, Zhivotovsky B, Panaretakis T, and Grander D (2009) Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. **Cell Death and Differentiation**. 16, 1018-1029

Lee CY, Cooksey BAK, and Baehrecke EH (2002) Steroid regulation of midgut cell death during *Drosophila* development. **Developmental Biology**. 250, 101-111

Lee JA, Beigneux A, Ahmad ST, Young SG, and Gao FB (2007) ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration (vol 17, pg 1561, 2007). **Current Biology**. 17, 1

Lee JS, Li QL, Lee JY, Lee SH, Jeong JH, Lee HR, Chang H, Zhou FC, Gao SJ, Liang CY, and Jung JU (2009) FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. **Nature Cell Biology**. 11, 1355-U1225

Li J, Hou N, Faried A, Tsutsumi S, and Kuwano H (2010) Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model. **European Journal of Cancer**. 46, 1900-1909

Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH, and Jung JU (2006) Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. **Nature Cell Biology**. 8, 688-U694

Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, Herman B, and Levine B (1998) Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by Beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. **Journal of Virology**. 72, 8586-8596

Liu L, Yang M, Kang R, Wang Z, Zhao Y, Yu Y, Xie M, Yin X, Livesey KM, Lotze MT, Tang D, and Cao L (2011) HMGB1-induced autophagy promotes chemotherapy resistance in leukemia cells. **Leukemia**. 25, 23-31

Luciani MF, Giusti C, Harms B, Oshima Y, Kikuchi H, Kubohara Y, and Golstein P (2011) Atg1 allows second-signaled autophagic cell death in *Dictyostelium*. **Autophagy**. 7, 501-508

Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, and Thompson CB (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. **Cell**. 120, 237-248

Luo S, and Rubinsztein DC (2010) Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL. **Cell Death and Differentiation**. 17, 268-277

Macintosh RL, and Ryan KM (2013) Autophagy in tumour cell death. **Semin Cancer Biol**

Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N, Hickman JA, Geneste O, and Kroemer G (2007) Functional and physical interaction between Bcl-X-L and a BH3-like domain in Beclin-1. **Embo Journal**. 26, 2527-2539

Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, Chen GH, Jin SK, and White E (2007) Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. **Genes & Development**. 21, 1367-1381

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, and Yoshimori T (2009) Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. **Nature Cell Biology**. 11, 385-U369

McAfee Q, Zhang ZH, Samanta A, Levi SM, Ma XH, Piao SF, Lynch JP, Uehara T, Sepulveda AR, Davis LE, Winkler JD, and Amaravadi RK (2012) Autophagy inhibitor Lys05 has single-agent antitumor activity and reproduces the phenotype of a genetic autophagy deficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 109, 8253-8258

Mizushima N (2007) Autophagy: process and function. **Genes Dev**. 21, 2861-2873

Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, and Yoshimori T (2003) Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. **Journal of Cell Science**. 116, 1679-1688

Mortensen M, and Simon AK (2010) Nonredundant role of Atg7 in mitochondrial clearance during erythroid development. **Autophagy**. 6, 423-425

Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, Nara J, Funao J, Nakata M, Tsuda K, Hamada S, and Yoshimori T (2004) Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. **Science**. 306, 1037-1040

Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, Cookson MR, and Youle RJ (2010) PINK1 Is Selectively Stabilized on Impaired Mitochondria to Activate Parkin. **Plos Biology**. 8

Nezis IP, Shrivage BV, Sagona AP, Lamark T, Bjorkoy G, Johansen T, Rusten TE, Brech A, Baehrecke EH, and Stenmark H (2010) Autophagic degradation of dBruce controls DNA fragmentation in nurse cells during late Drosophila melanogaster oogenesis. **Journal of Cell Biology**. 190, 523-531

Noman MZ, Janji B, Kaminska B, Van Moer K, Pierson S, Przanowski P, Buart S, Berchem G, Romero P, Mami-Chouaib F, and Chouaib S (2011) Blocking Hypoxia-Induced Autophagy in Tumors Restores Cytotoxic T-Cell Activity and Promotes Regression. **Cancer Research**. 71, 5976-5986

Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, Rogov V, Lohr F, Popovic D, Occhipinti A, Reichert AS, Terzic J, Dotsch V, Ney PA, and Dikic I (2010) Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. **Embo Reports**. 11, 45-51

Oberstein A, Jeffrey PD, and Shi YG (2007) Crystal structure of the Bcl-X-L-beclin 1 peptide complex - Beclin 1 is a novel BH3-only protein. **Journal of Biological Chemistry**. 282, 13123-13132

Okamoto K, Kondo-Okamoto N, and Ohsumi Y (2009) Mitochondria-Anchored Receptor Atg32 Mediates Degradation of Mitochondria via Selective Autophagy. **Developmental Cell**. 17, 87-97

Onodera J, and Ohsumi Y (2005) Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. **J Biol Chem**. 280, 31582-31586

Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, and Johansen T (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. **J Biol Chem**. 282, 24131-24145

Pattingre S, Tassa A, Qu XP, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, and Levine B (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. **Cell**. 122, 927-939

Pyo JO, Nah J, and Jung YK (2012) Molecules and their functions in autophagy. **Exp Mol Med**. 44, 73-80

Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, and Rubinsztein DC (2010) Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. **Nat Cell Biol**. 12, 747-757

Rouschop KMA, van den Beucken T, Dubois L, Niessen H, Bussink J, Savelkoul K, Keulers T, Mujic H, Landuyt W, Voncken JW, Lambin P, van der Kogel AJ, Koritzinsky M, and Wouters BG (2010) The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. **Journal of Clinical Investigation**. 120, 127-141

Sarkar S, Perlstein EO, Imarisio S, Pineau S, Cordenier A, Maglathlin RL, Webster JA, Lewis TA, O'Kane CJ, Schreiber SL, and Rubinsztein DC (2007) Small molecules enhance autophagy and reduce toxicity in Huntington's disease models. **Nature Chemical Biology**. 3, 331-338

Sengupta S, Peterson TR, and Sabatini DM (2010) Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. **Mol Cell**. 40, 310-322

Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, and Tsujimoto Y (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. **Nature Cell Biology**. 6, 1221-1228

Taloczy Z, Virgin HW, and Levine B (2006) PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. **Autophagy**. 2, 24-29

Tang DL, Kang R, Livesey KM, Cheh CW, Farkas A, Loughran P, Hoppe G, Bianchi ME, Tracey KJ, Zeh HJ, and Lotze MT (2010) Endogenous HMGB1 regulates autophagy. **Journal of Cell Biology**. 190, 881-892

Tong JJ, Yan XH, and Yu L (2010) The late stage of autophagy: cellular events and molecular regulation. **Protein & Cell**. 1, 907-915

Wei YJ, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, and Levine B (2008) JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. **Molecular Cell**. 30, 678-688

Wirawan E, Berghe TV, Lippens S, Agostinis P, and Vandenabeele P (2012) Autophagy: for better or for worse. **Cell Research**. 22, 43-61

Wirawan E, Vande Walle L, Kersse K, Cornelis S, Claerhout S, Vanoverberghe I, Roelandt R, De Rycke R, Verspurten J, Declercq W, Agostinis P, Vanden Berghe T, Lippens S, and Vandenabeele P (2010) Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. **Cell Death & Disease**. 1, 10

Wu YT, Tan HL, Huang Q, Kim YS, Pan N, Ong WY, Liu ZG, Ong CN, and Shen HM (2008) Autophagy plays a protective role during zVAD-induced necrotic cell death. **Autophagy**. 4, 457-466

Xu JZ, Wang YF, Tan XR, and Jing HJ (2012) MicroRNAs in autophagy and their emerging roles in crosstalk with apoptosis. **Autophagy**. 8, 873-882

Yang SH, Wang XX, Contino G, Liesa M, Sahin E, Ying HQ, Bause A, Li YH, Stommel JM, Dell'Antonio G, Mautner J, Tonon G, Haigis M, Shirihai OS, Doglioni C, Bardeesy N, and Kimmelman AC (2011) Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. **Genes & Development**. 25, 717-729

Yang ZF, Huang J, Geng JF, Nair U, and Klionsky DJ (2006) Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. **Molecular Biology of the Cell**. 17, 5094-5104

Young ARJ, Chan EYW, Hu XW, Koch R, Crawshaw SG, High S, Hailey DW, Lippincott-Schwartz J, and Tooze SA (2006) Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. **Journal of Cell Science**. 119, 3888-3900

Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, and Simon HU (2006) Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. **Nature Cell Biology**. 8, 1124-U1146

Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, and Lenardo MJ (2004) Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. **Science**. 304, 1500-1502

Zalckvar E, Berissi H, Mizrachi L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M, Sabanay H, Pinkas-Kramarski R, and Kimchi A (2009) DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-X-L and induction of autophagy. **Embo Reports**. 10, 285-292

Zhai HY, Fesler A, and Ju JF (2013) MicroRNA A third dimension in autophagy. **Cell Cycle**. 12, 246-250

Zhu H, Wu H, Liu XP, Li BA, Chen Y, Ren XC, Liu CG, and Yang JM (2009) Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells. **Autophagy**. 5, 816-823

Zhu YS, Zhao LX, Liu L, Gao P, Tian WL, Wang XH, Jin HJ, Xu HD, and Chen Q (2010) Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis. **Protein & Cell**. 1, 468-477