POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 32 2005 NR 1 (13–22)

AUTOFAGIA – NARZĘDZIE PRZEŻYCIA CZY ŚMIERCI KOMÓRKI NOWOTWOROWEJ?

AUTOPHAGY – THE TOOL OF CANCER CELL SURVIVAL OR DEATH?

Monika LAMPARSKA-PRZYBYSZ, Tomasz MOTYL

Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

Streszczenie: Ostatnia dekada przyniosła znaczący postęp w poznaniu mechanizmów kontrolujących śmierć komórki. Zgromadzone wyniki sugerują, że apoptoza nie jest jedynym typem programowanej śmierci komórki (PCD). Komórki mogą ulegać procesowi autodestrukcji w różny sposób. Obecnie wyróżnia się trzy typy PCD: typ I lub apoptoza, który zależny jest od aktywacji kaspaz, typ II czyli autofagia oraz typ III, który polega na rozpadzie komórki i jest niezależny od procesu kondensacji chromatyny oraz aktywacji lizosomów. Autofagia jest filogenetycznie bardzo starym procesem mającym na celu degradację białek o długim okresie półtrwania oraz usuwanie organelli komórkowych. Wyróżnia się jej trzy główne formy: makroautofagię, mikroautofagię oraz tzw. autofagię zależną od chaperonów. W komórkach ssaków proces ten jest regulowany przez geny AUT i ATG. Beklina 1, homolog drożdżowego białka ATG6 jest zaangażowana w transport substratów do wakuoli autofagicznych. Z kolei homolog białka Atg8 jest lekkim łańcuchem białka związanego z mikrotubulami (MAP I LC3), które występuje na autofagosomach i jest obecnie uważane za jedyny wiarygodny biochemiczny marker autofagii. Autofagia jest z jednej strony procesem warunkującym zachowanie równowagi pomiędzy biosyntezą a rozkładem makrocząsteczek, a przez to decydującym o przeżyciu komórki. Z drugiej zaś strony autofagia jest narzędziem eliminacji komórek nowotworowych drogą programowanej śmierci komórki typu II, co wskazuje na jej rolę w hamowaniu nowotworzenia. Artykuł ten stanowi przegląd obecnej wiedzy na temat roli autofagii w komórkach nowotworowych oraz jej podwójnej funkcji jako narzędzia przetrwania lub śmierci komórki. Szczególną uwagę poświęcono molekularnym ogniwom łączącym ścieżki apoptozy i autofagii w komórkach nowotworowych oraz możliwościom ich sterowania na potrzeby terapii onkologicznej.

Słowa kluczowe: apoptoza, autofagia, beklina 1, katepsyna, BID, MAP I LC3, komórki nowotworowe.

Summary: In the last decade a progress has been achieved in understanding the mechanisms which control the cell death. Accumulating evidence suggest that apoptosis is not the only one type of programmed cell death (PCD). Cells use different pathways to active self-destruction process. There are three types of programmed cell death (PCD): condensation prominent, type I or apoptosis, dependent on the activity of caspases, type II – autophagy prominent and type III occurring through disintegration of cells into fragments without condensation and involvement of lysosomal system. Autophagy is a philo-

genetically very old process, usually considered as a route of cellular proteins degradation and organelle turnover, comprising macroautophagy, microautophagy and chaperone-mediated autophagy. APG and AUT genes regulate this process in mammalian cells. Beclin 1, a homolog of the yeast autophagy protein Atg6 is required for vacuolar transport and can induce autophagy in human cells. Another one homolog of yeast *Atg8* gene codes the microtubule-associated protein I (MAP I) light chain 3 (LC3) which exists on the autophagosomes and is currently the only reliable biochemical marker of autophagosomes. Autophagy is beneficial for the maintenance of the balance between the biosynthesis and catabolism of macromolecules and cell survival. On the other hand, autophagy is also involved in elimination of cancer cells by triggering a non-apoptotic cell death program (PCD II), indicating its inhibitory role in tumor development. This article reviews current knowledge on the role of autophagy in cancer cells and its dual function as a tool of cell protecting or killing. Authors emphasized molecular links between apoptosis and autophagy in tumor cells and possibility of their control for progression in anticancer therapy.

Key words: apoptosis, autophagy, beclin1, cathepsin, BID, MAP I LC3, cancer cells.

WPROWADZENIE

Jedną z głównych przeszkód dla efektywnej radio- czy chemioterapii nowotworów są mutacje genów supresorowych nowotworu i genów proapoptotycznych, które bardzo często występują w komórkach nowotworowych, szczególnie nowotworów złośliwych. Nowe trendy w lecznictwie onkologicznym, w postaci terapii genowej przywracającej funkcjonalność powyższych genów, wraz z wprowadzaniem nowych, mniej toksycznych dla zdrowych komórek leków cytostatycznych, budzą nadzieję skutecznej walki z nowotworami. Kolejną szansą w walce z rakiem jest poznawanie innych dróg, poza apoptozą, prowadzących do śmierci komórek nowotworowych. Alternatywną do apoptozy śmiercią komórki jest autofagia (autofagocytoza), tzw. programowana śmierć typu II [1–6]. Autofagia jest filogenetycznie starym procesem wykorzystywanym nie tylko jako narzędzie śmierci, ale również przeżycia. Proces autofagii jest znany przede wszystkim jako wewnątrzkomórkowy system degradacji składników cytoplazmy, szczególnie białek o długim okresie półtrwania przy udziale lizosomów. Efekt tego procesu jest zawsze ten sam – kompletna i nieodwracalna degradacja wielkocząsteczkowych substratów do ich podstawowych składników przy udziale enzymów lizosomalnych [7–8]. Ponadto lizosomy w procesie autofagii biorą udział w usuwaniu organelli komórkowych, takich jak: mitochondria i peroksysomy czy też fragmentów aparatu Golgiego i siateczki śródplazmatycznej [9]. Proces ten może być także bezpośrednio zaangażowany w śmierć komórek [10]. Wydaje się, że rozmiar autofagii decyduje o jej życiodajnej bądź śmiercionośnej roli w komórce.

Na podstawie różnych dróg kontaktu substratów z lizosomami wyróżniono trzy główne formy autofagii: makroautofagię, mikroautofagię oraz tzw. autofagię zależną od chaperonów [7]. W czasie makroautofagii, składniki cytoplazmy mające ulec degradacji zostają otoczone początkowo pojedynczą, a następnie podwójną, izolującą błoną, tworząc autofagosomy o 1 μm średnicy. Następnie autofagosomy ulegają fuzji z lizosomami, co prowadzi do powstania autofagolizosomów, w których zachodzi ostateczny proces niszczenia ich zawartości przy użyciu lizosomalnych hydrolaz [6,1–12]. Natomiast w czasie mikroautofagii fragmenty cytoplazmy zostają bezpo-

średnio otoczone przez błonę lizosomalną i wnikają do ich wnętrza na zasadzie endocytozy. Trzeci typ autofagii wymaga obecności odpowiednich receptorów na błonie lizosomów, które to pośredniczą w transporcie cytozolowych białek do wnętrza lizosomów [1]. Selektywność wiązania z receptorem zależy od rozpoznania odpowiedniego fragmentu sygnałowego w sekwencji aminokwasowej białka poprzez cytozolowy chaperon. Kompleks chaperon-substrat wiąże się bezpośrednio z receptorem na błonie lizosomów. Natomiast drugi chaperon zlokalizowany wewnątrz lizosomu jest niezbędny do translokacji substratu [13].

ROLA AUTOFAGII

Proces ten spełnia trzy główne funkcje:

1. Autofagia jest mechanizmem adaptacyjnym w przypadku głodzenia. Usunięcie źródeł aminokwasów z pożywienia indukuje autofagię w różnych narządach, np. w wątrobie. Ten sam efekt można obserwować w hodowlach komórkowych [3]. Rozkład białek poprzez autofagię umożliwia podaż aminokwasów i innych składników niezbędnych do utrzymania metabolizmu. Dlatego też aminokwasy są głównymi regulatorami tego procesu. Po usunięciu aminokwasów z pożywki autofagia jest indukowana w ciągu kilku minut w komórkach wątroby. Po upływie zaledwie 7–8 min można już obserwować powstawanie wakuoli degradujących. Całkowity czas upływający od formowania autofagosomów do degradacji w autofagolizosomach wynosi ok.20 min [3].
2. Autofagia umożliwia zachowanie homeostazy cytoplazmy, ponieważ kontroluje proces usuwania peroksysomów, mitochondriów oraz reguluje wielkość siateczki śródplazmatycznej [14].
3. Autofagia jest także zaangażowana w niektóre tkankowo-specyficzne procesy, takie jak: wewnątrzkomórkowa biogeneza surfaktantu na powierzchni pneumocytów II, biosynteza neuromelaniny w dopaminergicznych neuronach czy też w proces dojrzewania erytrocytów [3].

MOLEKULARNY MECHANIZM AUTOFAGII

Analiza ssaczych homologów białek drożdży o istotnym znaczeniu dla procesu autofagii (produkty genów Aut – *Autophagocytosis* i Atg – *Autophagy*), pozwoliła wyróżnić kilka białek bezpośrednio związanych z błonami, biorącymi udział w autofagii [7]. Formowanie autofagosomów jest zależne od dwóch skoniugowanych systemów, będących pozostałością po proteosomalnej ścieżce ubikwitynacji białek [5,11]. Pierwszy z nich angażuje cztery białka Atg: 5, 7, 10, 12, gdzie Atg7 i Atg10 odgrywają rolę podobną do tej, jaką pełnią enzymy E1 i E2 podczas ubikwitynacji. Ostateczny kompleks jest formowany przez Atg5– Atg12, który jest niekowalentnie związany z białkiem Atg16.

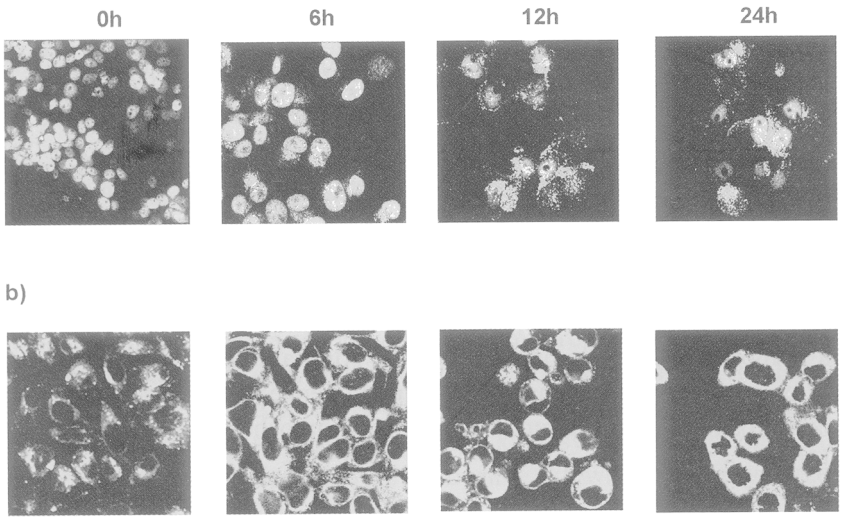
Multimeryzacja Atg16 z kompleksem Atg5-Atg12 jest wymagana, aby proces autofagii mógł się rozpocząć [15]. Produkt drugiego systemu koniugacyjnego jest wynikiem połączenia kompleksu Atg8/Aut7 z fosfatydyloetanoloaminą [16]. Jednym z ludzkich homologów Atg8, który jest związany z systemem zależnym od Aut7, jest białko MAP I LC3 (*Microtubule-Associated Protein I Light Chain 3*). Białko to występuje na autofagosomach oraz błonach izolujących [7,17–19]. Lekki łańcuch białka LC3 ulega modyfikacji potranslacyjnej, która prowadzi do odcięcia przez proteazę Atg4 22-aminokwasowego fragmentu na C-końcu. Następnie reakcje katalizowane przez Atg7 oraz Atg3 prowadzą do przekształcenia tego białka z cząsteczki o masie18 kDa (forma LC3-I) do 16 kDa formy LC3-II, która wiąże się z autofagosomami. Ilość LC3-II jest bezpośrednio skorelowana z liczbą autofagosomów, a proces przekształcania formy LC3-I do LC3-II ulega wzmocnieniu po indukcji autofagii. Dlatego też białko to jest obecnie jedynym wiarygodnym markerem tego procesu [17,20–21]. Wzrost koncentracji tego białka w komórkach ludzkiego raka sutka linii MCF-7 poddanych działaniu kamptotecyny przedstawiono na rycinie 1a.

Powstawanie autofagosomów jest także zależne od enzymu kinazy trifosforanu-fosfatydyloinozytolu (PI3K klasa III). Kinaza ta pełni istotną rolę w czasie proliferacji komórek oraz wewnątrzkomórkowego przemieszczania elementów cytoszkieletu. Bierze także udział w sekwestracji materiału cytoplazmatycznego do wakuoli autofagicznych. Enzym ten jest hamowany przez 3-metyloadeninę (3-MA), co prowadzi do zablokowania tworzenia autofagosomów [22–23]. W komórkach ssaków PI3 kinaza jest również funkcjonalnie związana z białkiem bekliną 1 [24–25]. Beklina 1 jest funkcjonalnym homologiem drożdżowego białka Atg6 i indukuje autofagię w kulturach komórkowych raka sutka. Ludzki gen *beclin 1* w 40–70% nowotworów sutka oraz jajnika ulega monoallelicznym delecjom, co prowadzi do zahamowania jego funkcji jako „genu autofagocytozy" [6,25]. Beklina 1 tworzy kompleksy z PI3 kinazą klasy III, które można odnaleźć w części *trans* aparatu Golgiego, co sugeruje, że kompleks ten kontroluje autofagię poprzez dostarczenie trifosforanu fosfatydyloinozytolu z aparatu Golgiego do błon izolujących [12].

Kontrolowanie poziomu trifosforanu fosfatydloinozytolu poprzez fosfatazy, należące do rodziny MTM (*myotubularin family*), MTMR (*myotubularin family related proteins*) oraz homologi PTEN, może stanowić jeden z mechanizmów odpowiedzialnych za przebieg procesu autofagii [26]. Mutacje w obrębie genów *MTM i MTMR* powodują powstawanie miopatii miotubularnych [27]. Wykazano, że mutacje genu *MTMR3,* odpowiedzialnego za ekspresję białka hydrolizującego trifosforan fosfatydyloinozytolu, powodują akumulację wakuoli autofagicznych [28].

Formowanie i dojrzewanie wakuoli autofagicznych jest także związane z funkcją cytoszkieletu. Filamenty pośrednie tworzące sieć cytokeratynową w hepatocytach, prawdopodobnie pełnią istotną rolę w tworzeniu autofagosomów. Uszkodzenie sieci mikrofilamentów przez cytochalazynę D powoduje z kolei zmniejszenie liczby autofagosomów w komórkach nabłonkowych nerki [3]. To wskazuje, że różne elementy cytoszkieletu mogą być zaangażowane w formowanie autofagosomów.

Ostatnie badania wskazują, że ścieżka sygnałowa zależna od mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) odgrywa kluczową rolę w kontrolowaniu autofagii indukowanej przez deficyt aminokwasów, ATP oraz sygnały hormonalne [6]. Tworzenie autofago-



RYCINA 1. Wzrost stężenia białka MAP I LC3 (a) oraz aktywności katepsyny B (b) w komórkach ludzkiego raka sutka linii MCF-7 traktowanych kamptotecyną (inhibitor topoizomerazy DNA I). MAP I LC3 wyznakowano przeciwciałami sprzężonymi z Alexa 488 (zielona fluorescencja), DNA wybarwiono 7-aminoaktynomycyną D (czerwona fluorescencja). Aktywność katepsyny B badano przy użyciu substratu katepsyny B Magic Red® firmy ICN (czerwona fluorescencja)

somów jest także zależne od aktywności GTPaz. Połączenie cząsteczki GTP z trimerem białka Gi3 hamuje autofagię, natomiast związanie tego białka z GDP stymuluje sekwestrację składników cytoplazmy [3,6].

AUTOFAGIA W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

1. Autofagia jako mechanizm samoobrony

W odpowiedzi na niską radiację komórki nowotworowe kumulują kwasowe organelle pęcherzykowe (AVO – *Acidic Vesicular Organelles*), które wskazują na proces autofagii. Formowanie AVO stanowi mechanizm samoobrony, który zwiększa przeżywalność napromienionych komórek. Zablokowanie aktywności H^+ ATPazy, która odpowiada za utrzymanie kwaśnego pH w AVO, poprzez bafilomycynę A1, zwiększa wrażliwość komórek raka sutka na napromienianie. To wskazuje, że lizosomy mogą być zaangażowane w lekooporność komórek nowotworowych i zablokowanie autofagii może zwiększyć skuteczność terapii [29].

2. Autofagia w apoptozie

Formowanie autofagosomów może być związane z apoptozą zależną od TNFα , co zostało zaobserwowane w ludzkich komórkach białaczkowych. Zablokowanie tworzenia autofagosomów przez 3-MA hamuje fragmentację DNA oraz lizę komórki. Natomiast inhibicja autofagii na późniejszym etapie nie daje efektu ochronnego, co wskazuje, że sekwestracja materiału cytoplazmatycznego jest konieczna w apoptozie indukowanej przez TNFα. Komórki, które przeżywają mimo indukcji apoptozy przez TNFα, wykazują obniżoną aktywność autofagiczną, co sugeruje, że redukcja autofagii przedłuża czas życia komórek nowotworowych [3].

Z drugiej strony selektywna sekwestracja mitochondriów w odpowiedzi na czynnik apoptogenny chroni komórki przed uwalnianiem czynników proapoptotycznych (cytochrom c, AIF, Smac/DIABLO, Omi/Htr2). W tym przypadku proces autofagii umożliwia komórkom ucieczkę przed apoptozą. Autofagię uważa się za wczesną i ochronną odpowiedź komórkową na czynniki apoptogenne i kiedy proces ten przestaje być skuteczny proapoptotyczne czynniki pochodzące z mitochondriów mogą aktywować apoptozę [30].

3. Autofagia – programowana śmierć komórki typu II

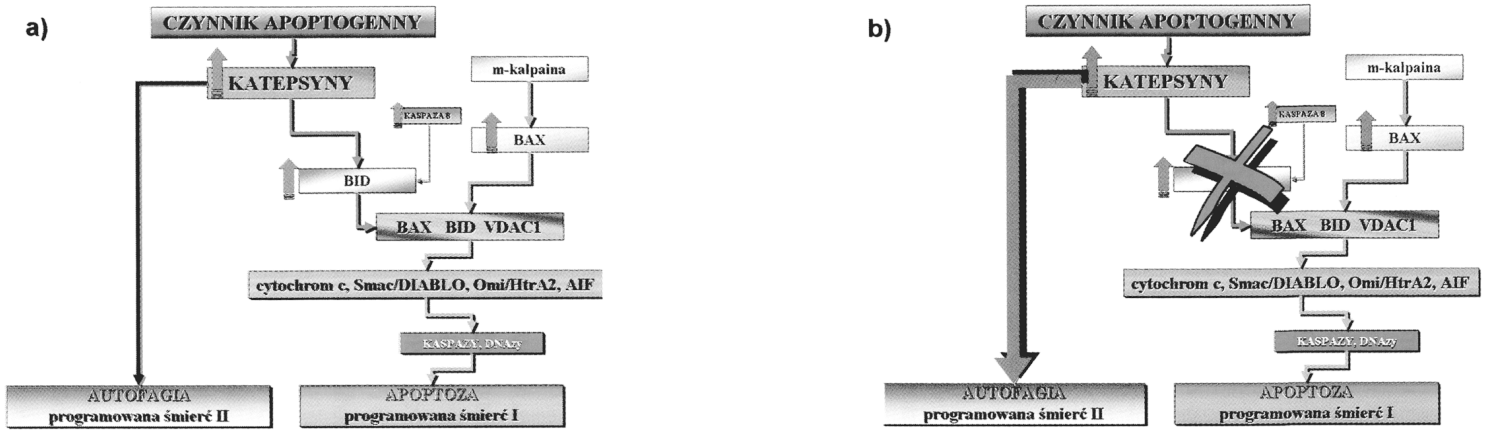
Autofagia jako programowana śmierć komórki typu II została po raz pierwszy opisana w komórkach ludzkiego raka sutka linii MCF-7 traktowanych tamoksyfenem, w których zaobserwowano powstawanie wakuoli autofagicznych [31]. Antyestrogen, jakim jest tamoksyfen, stymuluje ekspresję bekliny 1, co z kolei indukuje proces autofagii. Ten typ śmierci w komórkach MCF-7 charakteryzuje się redystrybucją cytoszkieletu, przy jednoczesnej ochronie mikrofilamentów i filamentów pośrednich, nawet w komórkach wykazujących fragmentację jądra [32]. Ten typ śmierci występuje także w komórkach, w których zablokowana zostaje aktywność kaspaz lub ekspresja białek z rodziny Bcl-2 ulega modyfikacji. Wykazano, że inhibicja kaspaz nie chroni komórek Jurkat T przed śmiercią indukowaną przez Bax, ponieważ komórki te przełączają się na śmierć drogą autofagii. Obecność Bax na powierzchni mitochondriów może sugerować udział tych organelli w śmierci typu II [3]. Obniżenie aktywności białka Bcl-2 w komórkach HL-60 indukuje autofagię, która nie wynika ze śmierci zależnej od mitochondriów. W tym przypadku proces ten może być zależny od aktywności bekliny 1, która kontroluje autofagię poprzez klasę III kinaz PI3 i oddziałuje z Bcl-2 [33].

Manipulowanie śmiercią autofagolizosomalną może stanowić strategię w walce z nowotworami poprzez aktywację ścieżki sygnałowej zależnej od białek Ras, ponieważ geny *ras* praktycznie nie ulegają mutacjom. Wprowadzenie mutacji w obrębie tych genów indukuje autofagię komórek raka żołądka oraz glioblastoma w drodze niezależnej od kaspaz i nadekspresji Bcl-2 [10]. Apoptoza i autofagia są prawdopodobnie ewolucyjnie powiązanymi ze sobą procesami. Wskazuje na to udział kinaz DAPk i DRP-1 w kontrolowaniu śmierci za pomocą autofagii, jak i regulowaniu procesu „pączkowania" błon komórkowych w czasie apoptozy [34]. Ponadto obydwa te procesy łączą podobne ścieżki aktywacji i inhibicji zależne od kinaz Akt/PKB i mTOR [35].

Autofagia jest procesem, który przebiega znacznie wolniej niż apoptoza. Własne obserwacje i dane literaturowe wskazują, że dominacja jednego bądź drugiego typu śmierci zależy od rodzaju czynnika, który działa na komórki. Apoptoza jest dominującym typem śmierci w komórkach linii MCF-7 po traktowaniu kamptotecyną [36,37], TNF-α lub TRAIL [31]. Natomiast autofagia w tej linii komórkowej dominuje po traktowaniu komórek antyestrogenem – tamoksyfenem [4,38] czy też seskwiterpenowymi analogami taksolu [36].

Programowana śmierć komórki typu I-apoptoza i typu II-autofagia są kontrolowane i regulowane przez odmienne zestawy genów. Do kluczowych genów regulujących apoptozę należy zaliczyć geny z nadrodziny *bcl-2*, kontrolujące uwalnianie mediatorów apoptozy (cytochrom c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF) z mitochondriów. Genami kontrolującymi autofagię są geny z rodziny ATG (*autophagy-related genes*). Wspólnym, funkcjonalnym ogniwem łączącym obydwa typy programowanej śmierci komórki wydaje się być aktywacja enzymów lizosomalnych – katepsyn (ryc.1b). Ich aktywność jest w apoptozie niezbędna dla aktywacji kaspaz, kalpain oraz białek promotorowych, takich jak: Bax i Bid. W autofagii aktywność katepsyn jest konieczna do degradacji białek w obrębie autofagolizosomów. Hamowanie aktywności katepsyn przez specyficzny inhibitor (E64d) prowadzi do zablokowania apoptozy, natomiast zwiększa ekspresję białka MAP I LC3 – biochemicznego wskaźnika autofagii w komórkach raka sutka linii MCF-7 poddawanych oddziaływaniu leku cytostatycznego – kampto-tecyny [39]. Wyniki te wskazują, iż katepsyny lub produkty ich aktywacji np. proapo-ptotyczne białko Bid mogą stanowić molekularny „przełącznik" z apoptozy na autofagię w komórce nowotworowej. Alternatywność autofagii w stosunku do apoptozy w komórkach nowotworowych ma szczególnie duże znaczenie w przypadku mutacji genów promotorowych apoptozy, kiedy autofagia może kompensować deficyt apoptozy. Wykazaliśmy to wyciszając kluczowy gen proapoptotyczny *bid* w komórkach raka sutka linii MCF-7, powodując przez to całkowite zahamowanie aktywności kaspaz wykonawczych (enzymy kluczowe w apoptozie) oraz wzrost ekspresji Bekliny 1 i MAP I LC3, białka, charakterystycznego dla błon autofagosomalnych [39]. Rolę białka Bid jako molekularnego przełącznika pomiędzy apoptozą a autofagią komórki nowotworowej przedstawiono na rycinie 2. Na udział Bid w kontroli obydwu ścieżek PCD wskazują pośrednio ostatnie badania Yu i wsp. [40], którzy wykazali, że hamowanie kaspazy 8 (aktywatora Bid) indukuje autofagię poprzez aktywację genów *Atg7 i bekliny1*. Kolejne własne obserwacje wykazały, iż autofagia jest nie tylko alternatywnym, lecz również komplementarnym w stosunku do apoptozy typem programowanej śmierci komórki, gdyż w tych samych komórkach raka sutka linii MCF-7 stymulowanych do apoptozy kamptotecyną występują charakterystyczne morfologiczne cechy zarówno apoptozy, jak i autofagii. Pomimo że procesy te zachodzą równolegle w komórkach raka sutka pod wpływem kamptotecyny, to wykazują one inną kinetykę. Apoptoza jest procesem szybkim, którego szczyt pojawia się już po 60 min ekspozycji na lek, natomiast autofagia narasta stopniowo przez 24 h w komórkach, które nie uległy apoptozie [39].

Biorąc pod uwagę powyższe spostrzeżenia oraz fakt różnej wrażliwości na apoptozę komórek rakowych, nawet w obrębie tego samego guza, skuteczniejszą może być terapia wykorzystująca kombinację leków cytotoksycznych, indukujących z jednej strony



RYCINA 2. Proapoptotyczne białko Bid jako molekularny „przełącznik" pomiędzy ścieżką apoptozy i autofagii w komórce nowotworowej: a) aktywny Bid uruchamia mitochondrialną ścieżkę apoptozy; b) wyciszenie genu *bid* prowadzi do hamowania apoptozy i stymulacji autofagii

apoptozę a z drugiej autofagię, aby „sojusz" tych dwóch różnych typów śmierci przeistoczył się w skuteczną walkę z rakiem.

PIŚMIENNICTWO

[1] CUERVO AM. Autophagy: in sickness and in health. *Trends in Cell Biol* 2004; **14**: 70–77.

[2] GOZUACIK D, KIMCHI A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 2004; **23**: 2891–2906.

[3] OGIER-DENIS E, CODOGNO P. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochem Biophys Acta* 2003; **1603**: 113–128.

[4] LOCKSHIN RA, OSBORNE B, ZAKERI Z. Cell death in the third millennium. *Cell Death Differ* 2000; **7**: 2–7.

[5] MIZUSHIMA N, YAMAMOTO A, MATSUI M, YOSHIMORI T, OSHUMI Y. *In vivo* analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 2003; **15**:1101–1111.

[6] MEIJER A, CODOGNO P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 2445–2462.

[7] KIM J, KLIONSKY DJ. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Ann Rew Biochem* 2000; **69**: 303–342.

[8] KIM J, HUANG WP, STROMHAUG PE, KLIONSKY DJ. Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to *de novo* vesicle formation. *J Biol Chem* 2002; **277**: 763–773.

[9] LEMASTERS JJ, QIAN T, HE L, KIM JS, ELMORE SP, CASCIO WE, BRENNER DA. Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxid Redox Signal* 2002; **4**: 769–781.

[10] KLIONSKY DJ, GREGG JM, DUNN Jr, EMR SD, SAKAI Y. Sandoval IV. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Develop Cell* 2003; **5**: 539–545.

[11] OHSUMI Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 211–216.

[12] YOSHIMORI T. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **313**: 453–458.

[13] DICE JF. Lysosomal pathways of protein degradation. *Landes Bioscience* 2000; vol.11.

[14] XUE L, FLETCHER GC, TOLKOVSKY AM. Mitochondria are selectively eliminated from eukaryotic cells after blockade of caspases during apoptosis. *Curr Biol* 2001; **11**: 361–365.

[15] KUMA A, MIZUSHIMA N, ISHIHARA N, OHSUMI Y. Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5.Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem* 2002; **277**: 18619–18625.

[16] ICHIMURA Y, KIRISAKO T, TAKAO T, SATOMI Y, SHIMONISHI Y, ISHIHARA N, MIZUSHIMA N, TANIDA I, KOMINAMI E, OHSUMI M, NODA T, OHSUMI Y. An ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 2000; **408**: 488–492.

[17] KABEYA Y, MIZUSHIMA N, UENO T, YAMAMOTO A, KIRISAKO T, NODA T, KOMINAMI E, OHSUMI Y, YOSHIMORI T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000; **19**: 5720–5728.

[18] NARA A, MIZUSHIMA N, YAMAMOTO A, KABEYA Y, OSHUMI Y, YOSHIMORI T, SKDI AAA. ATPase-dependent endosomal transport is involved in autolysosome formation. *Cell Struct and Function* 2002; **27**: 539–564.

[19] ASANUMA K, TANIDA I, SHIRATO I, UENO T, TAKAHARA H, NISHITANI T. MAP I LC3, a promising autophagosomal marker, is processed during differentiation and recovery of podocytes from PAN nephrosis. *FASEB J* 2003; **17**: 1165–1167.

[20] MIZUSHIMA N. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 2491–2502.

[21] HE H, DANG Y, DAI F, GUO Z, WU J, SHE X, PEI Y, CHEN Y, LING W, WU C, ZHAO S, LIU JO, YU L. Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B. *J Biol Chem* 2003; **278**: 29278–29287.

[22] LUZIO JP, ROUS BA, BRIGHT NA, PRYOR PR, MULLOCK BM, PIPER RC. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci* 2000; **113**: 1515–1524.

[23] KATSO R, OKKENHAUG K, AHMADI K, WHITE S, TIMMS J, WATERFIELD MD**.** Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; **17**: 615–675.
[24] KIHARA A, KABEYA Y, OHSUMI Y, YOSHIMORI T. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* 2001; **2**: 330–335.
[25] LIANG XH, JACKSON S, SEAMAN M, BROWN K, KEMPKES B, HIBSHOOSH H, LEVINE B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; **402**: 672–676.
[26] ARICO S, PETIOT A, BAUVY C, DUBBELHUIS PF, MEIJER AJ, CODOGNO P, OGIER-DENIS E. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem* 2001; **276**: 35243–35246.
[27] BLONDEAU F, LAPORTE J, BODIN S, SUPERTI-FURGA G, PAYRASTRE B, MANDEL JL. Myotubularin, a phosphatase deficient in myotubular myopathy, acts on phosphatidylinositol 3-kinase and phosphatidylinositol 3-phosphate pathway. *Hum Mol Genet* 2000; **9**: 2223–2229.
[28] WALKER DM, URBE S, DOVE SK, TENZA D, RAPOSO G, CLAGUE MJ. Characterization of MTMR3. an inositol lipid 3-phosphatase with novel substrate specificity. *Curr Biol* 2001; **11**: 1600-1605.
[29] PAGLIN S, HOLLISTER T, DELOHERY T, HACKETT N, MCMAHILL M, SPHICAS E, DOMINGO D, YAHALOM J. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res* 2001; **61**: 439–444.
[30] TAKANO-OHMURO H, MUKAIDA M, KOMINAMI E, MORIOKA K. Autophagy in embryonic erythroid cells: its role in maturation. *Eur J Cell Biol* 2000; **79**: 759–764.
[31] KLIONSKY DJ. Autophagy. Gorgetown, 2004; TX: Landes Bioscience.
[32] BURSCH W, HOCHEGGER K, TOROK L, MARIAN B, ELLINGER A, HERMANN RS. Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J Cell Sci* 2000; **113**: 1189–1198.
[33] SAEKI K, YUO A, OKUMA E, YAZAKI Y, SUSIN SA, KROEMER G, TAKAKU F. Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells. *Cell Death Differ* 2000; **7**: 1263–1269.
[34] INBAL B, BIALIK S, SABANAY I, SHANI G, KIMCHI A. DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J Cell Biol* 2002; **157**: 455–468.
[35] CASTEDO M, FERRI KF, KROEMER G. Mammalian target of rapamycin (mTOR): pro- and anti-apoptotic. *Cell Death Differ* 2002; **9**: 99–100.
[36] GÓRKA M, GODLEWSKI MM, GAJKOWSKA B, WOJEWÓDZKA U, MOTYL T. Kinetics of Smac/DIABLO release from mitochondria during apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Cell Biol. Int* 2004 paper in press.
[37] MOTYL T, GAJKOWSKA B, GÓRKA M, GODLEWSKI MM, LAMPARSKA-PRZYBYSZ M. Kinetyka oraz regulacja uwalniania Smac/DIABLO z mitochondriów komórek nowotworowych pod wpływem stymulacji apoptogennej. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 219–233.
[38] GOMPEL A, SOMAI S, CHAOUAT M, KAZEM A, KLOOSTERBOER HJ, BEUSMAN I, FORGEZ P, MIMOUN M, ROSTENE W. Hormonal regulation of apoptosis in breast cells and tissues. *Steroids* 2000 **65**: 593–598.
[39] LAMPARSKA-PRZYBYSZ M, GAJKOWSKA B, MOTYL T. Cathepsins and BID are involved in molecular switch between apoptosis and autophagy in breast cancer MCF-7 cells exposed to camptothecin. *Cell Death Differ* 2004; paper in press
[40] YU L, ALVA A, SU H, DUTT P, FREUNDT E, WELSH S, BAEHRECKE EH, LENARDO MJ. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 2004; **304**: 1500–1502.

Redaktor prowadzący – M. Zabel

Otrzymano: 24.11. 2004 r.
Przyjęto: 02.12.2004 r.
Adres autora: ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa