

РЕПАРАТИВНАЯ АУТОФАГИЯ И АУТОФАГОВАЯ ГИБЕЛЬ КЛЕТКИ. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И РЕГУЛЯТОРНЫЕ АСПЕКТЫ

© А. Б. Пупышев

*Новосибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ;
электронный адрес: apupyshv@mail.ru*

Рассмотрена молекулярная регуляция репаративной (гомеостатической) аутофагии, индуцируемой недостаточностью жизненных ресурсов и клеточным стрессом. Обширный регуляторный аппарат аутофагии реагирует на голодание, недостаточность энергообеспечения и факторов роста, накопление несвернутых белков (стресс ЭПР) и активных форм кислорода (АФК) и на микробную инвазию. Центральным сенсором регуляции является киназа mTOR. Часть mTOR, находящаяся в лизосомах, реагирует на локальный уровень аминокислот и индуцирует аутофагию при низких темпах внутрилизосомного протеолиза. Аутофагия является саморегулируемым клеточным процессом, за пиком аутофагии следует ее регуляторное ослабление аминокислотами, образующимися в аутофаголизосомах. Защитный эффект аутофагии связывают в основном с удалением проницаемых митохондрий, генерирующих АФК, и аномально свернутых белков. Существует оптимум активности аутофагии в клетке: ее недостаточность приводит к ускоренному клеточному старению, а избыточная активность ведет к недостаточности клеточных ресурсов выживания и гибели клеток. Аутофаговая клеточная гибель выглядит как гиперстимулированное самопожирание клетки, но более вероятно, что избыточная аутофагия нарушает энергетическое питание клетки и включает специфическую сигнализацию клеточной гибели (посредством киназ c-Jun, DRP-1, PI3-киназы 1-го класса и др.). Анализируются некоторые возможности репаративной аутофагии для предотвращения клеточной дегенерации.

Ключевые слова: аутофагия, клеточный стресс, аутофагосомы, аутофаголизосомы, лизосомы, клеточное выживание, клеточная гибель.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, ПКГ — программированная клеточная гибель, ПМЛ — пермеабиллизации мембран лизосом, mTOR — белок «мишень рапамицина млекопитающих», UPR — ответ на нерасплетенные белки.

Всплеск интереса к аутофагии в последнее время объясняется тем, что, с одной стороны, она выступает как эволюционно закрепленное средство поддержания клеточного гомеостаза и выживания и что ее эксплуатация может открыть новые возможности для предотвращения патологии (Mehrpour et al., 2010). С другой стороны, она как обоюдоострый кинжал является и средством клеточного выживания, и способом активации клеточной гибели, что в ряде случаев открывает поразительные перспективы сенсibilизации опухолевых клеток (Amaravadi et al., 2011; Calabretta, Salomoni, 2011). Наконец, аутофагия способна продлевать жизнь не только клетке, но и организму в целом, что вызвало активный интерес геронтологов (Harrison et al., 2009; Morselli et al., 2010; Rubinsztein et al., 2011).

Достигнутый прогресс в изучении аутофагии в значительной мере связан с применением технологий молекулярной биологии, избирательной регуляции транскрипции генов и фармакологической регуляции активности (экспрессии) белков. Накоплен большой литературный материал по молекулярной и клеточной биологии аутофагии, позволяющий не только понять важнейшие закономерности этой клеточной реакции, но и оценить потенциальные резервы клеточного выживания, пути взаимной трансформации репаративной и губительной аутофагий,

возможности использования аутофагии для репрограммирования дегенеративных клеточных процессов и возможные мишени цитопротективных воздействий в сложной системе сигнальной регуляции аутофагии.

В этой связи мы рассмотрим актуальные аспекты физиологии, молекулярной и клеточной биологии аутофагии, возможности физиологической и экспериментальной регуляции аутофагии, взаимосвязь аутофагии с функционированием лизосом, взаимоотношения между репаративной аутофагией и программой аутофаговой гибели. К сожалению, в отечественной литературе больше внимания уделяется аутофагии как способу клеточной гибели (Манских, 2007; Черников и др., 2010), нежели механизму клеточного выживания (Зубова и др., 2012), и настоящая работа в определенной мере может восполнить этот пробел.

Общая характеристика аутофагии

Аутофагия представляет собой явление сегрегации, расщепления и рециклирования собственного клеточного материала, необходимое для дифференцировки, развития и поддержания гомеостаза организма (He, Klionsky, 2009; Kroemer et al., 2010; Ravikumar et al., 2010). Морфоло-

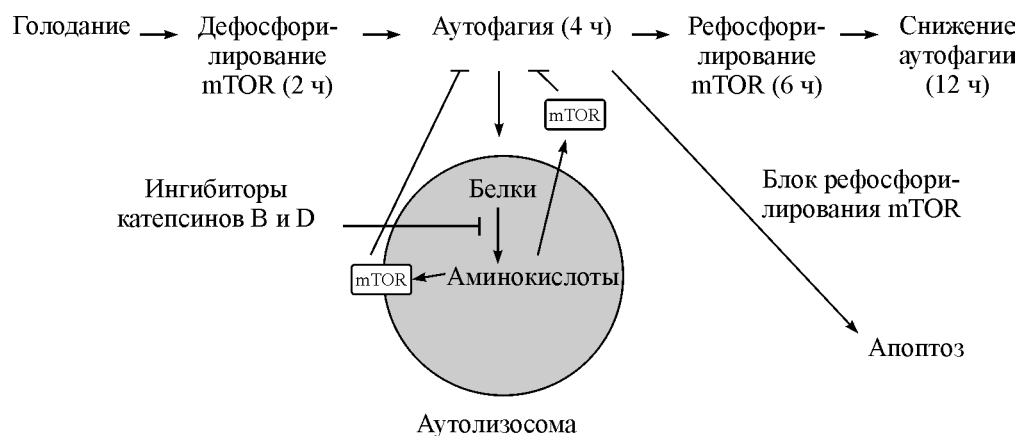


Рис. 1. Схема динамики аутофагии, стимулированной голоданием. За основу взяты данные Yu et al., 2010. Объяснения в тексте.

гически аутофагия (макроаутофагия) представляет собой процесс образования аутофагосом путем обособления участков цитоплазмы двуслойной мембраной с последующим слиянием их с лизосомами и ферментативным расщеплением обособленного материала. Кроме макроаутофагии существует микроаутофагия (интернализация белков инвагинацией лизосомной мембраны) и шапероноопосредованная аутофагия белков (СМА), представляющие для нас меньший интерес.

Значение аутофагии таково, что, например, нокаут нескольких генов аутофагии (*Atg 3, 5, 7, 9, 16L, 1*) приводит к снижению клеточного содержания аминокислот и гибели животных через 1 сут после рождения (Maucotte, Thorburn, 2011). Посредством аутофагии расщепляется подавляющая масса долгоживущих клеточных белков, а протеасомами — предпочтительно короткоживущие, составляющие в клетке всего 1 % общего белка (Mizushima, Klionsky, 2007).

Аутофагия вовлечена во многие патологические процессы, такие как миопатии, нейродегенерация, рак, болезни сердца, печени, желудочно-кишечного тракта и др. (Chen, Klionsky, 2011). Подавление активности ключевых генов аутофагии ведет к цитоплазматическому накоплению агрегатов белков и формированию патологии, такой как нейродегенерация, кардиомиопатии, дефекты скелета, рак, старение и т. д. (Mizushima et al., 2008). Активность аутофагии снижается с возрастом (Rajawat et al., 2009; Salminen, Kaarniranta, 2009; Rubinsztein et al., 2011), что сопровождается накоплением аномальных (поврежденных) молекул и появлением склонности к развитию патологии. Это уменьшение связано со снижением экспрессии генов белков, участвующих в аутофагии, и нередко лизосомных гидролаз (Cuervo, Dice, 2000; Donati et al., 2001; Menendez et al., 2011).

Динамика аутофагии может быть различной в зависимости от типа клеток, условий среды, индуктора. Так, она может начинаться в первые 0.5 ч после применения индуктора и достигать максимума за 45 мин (в случае глюкогона и печени крыс) или развиваться через 1 ч, например в эпителиальных клетках APRE-19 при действии хлорохина (Yoon et al., 2010). В цервикальных клетках матки при обработке ресвератролом пик аутофагии приходится на 24 ч (Hsu et al., 2009). В клетках почки NRK при голодании индукция аутофагосом максимальна через 4 ч (рис. 1) и падает почти до нормы через 12 ч (Yu et al., 2010). В этих условиях проаутофаговая активность

основного белка аутофагии mTOR опережает сегрегацию цитоплазмы, растет в течение 2 ч голодания и затем падает, почти восстанавливаясь за 6 ч (несмотря на продолжающееся голодание). Через 2 ч голодания дополнительная стимуляция аутофагии рапамицином (продолжающим проаутофаговую активацию mTOR) нарушает это восстановление, тормозит «протолизосомную реформацию» аутофаголизосом и вызывает накопление крупных аутофаголизосом. Активация аутофагии посредством нокадауна mTOR приводит к подобному же эффекту, аутофаго-лизосомный баланс не восстанавливается даже в течение 12 ч. Восстановление баланса, снижение проаутофаговой активности mTOR тормозится ингибированием лизосомного протеолиза, его важнейших протеаз катепсинов В и D (Yu et al., 2010).

Таким образом, эти и другие данные (Pous, Codogno, 2011; Juhasz, 2012) показывают, что у процесса аутофагии существует механизм обратной связи, состоящий в том, что для возврата к исходному (реактивному) состоянию, включая возобновление готовых к слиянию лизосом, нужна деградация аутофагоцитированного материала, в противном случае не наступает подавления проаутофаговой активности mTOR. Это своеобразный аутофаговый цикл. Механизм обратной связи устанавливает соответствие между питанием и индукцией аутофагии и ее прекращением. При голодании аутофагия, обеспечивая приток нутриентов, тем самым ингибирует ее индукцию. По-видимому, это есть саморегуляция, состоящая в том, что даже в условиях продолжающегося голодания стимулируется прекращение избыточной аутофагии, вероятно для предотвращения клеточной гибели.

Различают базальную (нестимулированную) и индуцированную аутофагию. Базальная аутофагия, запрограммированная в геноме, протекает в клетке с постоянной и достаточно низкой скоростью (за 1 сут удаляется примерно 1 из 20 митохондрий). Она является рутинным (house-keeping) механизмом внутриклеточного контроля качества белков и структур посредством удаления дефектных молекул (Maucotte, Thorburn, 2011).

Индуцированная аутофагия является формой клеточного ответа на различные внутренние стимулы и внешние воздействия на организм и на клетку. Необходимо отличать подлинную стимуляцию аутофагии (аутофагового потока) от накопления аутофагосом в результате блока аутофагового потока, подавления их слияния с лизосомами или переваривания аутофагоцитированного материала

(Maycotte, Thorburn, 2011). Морфологически такие ситуации обладают сходными чертами. Однако во втором случае происходит накопление аутофагосом (аутофаголизосом) без существенной стимуляции аутофагии. Этот вид аутофагосомного накопления происходит при действии, например, хлорохина, вызывающего раннее накопление аутофагосом, блокирующего как слияние лизосом с аутофагосомами (повышением лизосомного pH), так и внутрилизосомный протеолиз (Yoon et al., 2010). В эпителиальных клетках ARPE-19 найден рост содержания маркера аутофагосом LC3-II, аутофагового белка Beclin1, белка p62 и количества GFP-LC3- и RFP-LC3-позитивных вакуолей. Одновременно накапливаются агрегаты белков и убиквитинированных белков. Тем не менее иногда такое массивное накопление аутофагосом квалифицируется как индукция аутофагии (Kroemer et al., 2009), поскольку существенная часть цитоплазмы оказывается сегрегированной в аутофаговом компартменте.

Количественное определение уровня базальной и индуцированной аутофагии возможно с помощью торможения лизосомного протеолиза, например лейпептином (Namacher-Brady et al., 2006; Haspel et al., 2011). При этом основным маркером аутофагии обычно служит белок аутофагосом LC3-II (связанный с фосфатидилэтаноламинном мембран), выявляемый иммуноблоттингом или трансдукцией флуоресцентной конструкции GFP-LC3. Недостатком является его неспособность улавливать различия в индукции аутофагии и накоплении аутофагосом без индукции, поскольку он разрушается в лизосомах (Shay, Roninson, 2004). Подробнее методы оценки аутофагии изложены и в других источниках (Klionsky et al., 2007; Mizushima et al., 2010).

Индукция аутофагии вызывается различными стимулами — окислительным стрессом, лишением клетки энергетического или питательного обеспечения, гипоксией, внутриклеточной инфекцией и т. д. Она принимает форму репаративной (гомеостатической, защитной) аутофагии, способствующей выживанию клетки, или форму запрограммированной клеточной гибели (ПКГ). Репаративная аутофагия является саморегулируемым процессом, защищающим клетки от губительных изменений с помощью нескольких механизмов, таких как удаление окислительно разобщенных или проницаемых митохондрий, удаление аномально собранных или склонных к агрегации белков, реутилизация продуктов деполимеризации субстратов, восполнение энергетического баланса и т. д. (Kroemer et al., 2010). Репаративная аутофагия является ограниченной во времени защитной реакцией клетки, и ее продолжительная стимуляция может приводить к ее подавлению (Mizushima et al., 2004) и предотвращению избыточной деградации белка (Codogno, Meijer, 2005). Важно, что, несмотря на существование механизмов саморегуляции аутофагии, активация ее у животных, например с помощью рапамицина или ресвератрола, способна оказать позитивное влияние — продлить жизнь клеток и организма в целом (Harrison et al., 2009; Morselli et al., 2009).

Пути аутофаговой сегрегации цитоплазмы. Селективная аутофагия

Различают неселективную и избирательную (селективную) аутофагию. Как правило, в аутофагосомах видны различные структуры и белки цитоплазмы без замет-

ных признаков преимущественной сегрегации отдельных компонент (Wilkinson, Ryan, 2010). Вместе с тем активно исследуется селективное обособление клеточных компонент, включающее в себя позитивную избирательность, определяемую посттрансляционной модификацией субстратов (например, убиквитинированием или ацетилированием), и негативную избирательность (вследствие пониженной доступности субстратов аутофагии). Селективная аутофагия распространяется на структуры эндоплазматического ретикулума (ЭПР) (ретикулофагия), поврежденные митохондрии (митофагия), пероксисомы (пексофагия), рибосомы (рибофагия) и т. д. (Chen, Klionsky, 2011). Она может иметь различное значение в зависимости от биологической ситуации.

Митофагия на клеточном уровне видна как сегрегация отдельных митохондрий без включения в аутофагосомы другой цитоплазмы. Она зависит от потери мембранного потенциала митохондрий, вызываемой острым голоданием, фотоповреждением и т. д. Выявлена цепочка белков-медиаторов убиквитинирования поврежденных митохондрий, предшествующего их избирательной сегрегации. Повреждение митохондрий улавливается тонким сенсором трансмембранного потенциала, включающим в себя киназу PINK1. Киназа постоянно транспортируется на внешнюю мембрану митохондрий и там ферментативно расщепляется. При падении трансмембранного потенциала митохондрий она накапливается в мембране и способствует убиквитинированию посредством убиквитин-лигазы E3 Parkin, связывающейся с белками митохондрий, в первую очередь с белком VDAC1 (Narendra et al., 2010). Последний в свою очередь «притягивает» белок-адаптор аутофагии p62/SQSTM1, направляющий митохондрию по пути аутофагии (Geisler et al., 2010).

В некоторых клетках, подвергающихся деполаризационной митофагии, вместо PINK1/Parkin действует Bcl2-подобный белок BNIP3L или его гомолог NIX (Novak et al., 2010). NIX во взаимодействии с киназой ULK1 связывается с белками фагофор LC3/GABARAP и таким образом «тянет» митохондрии в аутофагосомы (Schweers et al., 2007; Novak et al., 2010). Подобная митофагия найдена в ходе созревания ретикулоцитов или сперматоцитов.

Аутофагия пероксисом связана с катаболической фазой их индукции и, например в гепатоцитах мыши, зависит от белка Atg7 (Iwata et al., 2006). Избирательная сегрегация осуществляется убиквитинированием наружных белков пероксисом и их связыванием с белком p62, притягивающим пероксисомы к белку Atg8 аутофагосом (Kim et al., 2008).

Аналогичным образом посредством селективной ретикулофагии могут удаляться аномальные белки ЭПР (нерасплетенные белки), индуцированные стрессом (Bernal et al., 2007). Нерасплетенные белки, остающиеся в ЭПР, не достигающие клеточных мишеней, вызывают клеточный ответ их удаления (UPR), направленный на элиминацию ошибочно свернутых белков с целью выживания клеток. Такие белки способны подвергаться поли-убиквитинированию и деградации (ERAD), при этом порт переноса — аутофагосома или протеасома — определяется адапторными белками (Verfaillie et al., 2010). Стресс ЭПР вызывается такими веществами, как туникамицин, тапсигаргин, брэфедлин А, ингибиторы протеасом, полиглутамин, каннабиноиды, ионы лития, лономицин и др. (см. таблицу). Стресс ЭПР является сильным индуктором аутофагии. Нисходящие пути активации

Индукторы и ингибиторы аутофагии

Вещество	Механизм действия индукторов	Литературный источник
Рапамицин	Ингибирует mTORC1	Ravikumar et al., 2004
Тамоксифен	Индукцирует внутриклеточный церамид (ингибитор mTOR) и экспрессию генов <i>Atg</i>	Bursch et al., 1996
Перифозин	Ингибирует Akt (с мишенью mTOR)	Fu et al., 2009
PP242	Ингибирует mTORC1	Feldman et al., 2009
Торин1	Ингибирует mTORC1 и mTORC2	Thoreen et al., 2009
Метформин	Стимулирует AMPK, повышающую фосфорилирование ULK1	Kim et al., 2011
АВТ-737 (ВНЗ-миметик)	Освобождает Beclin1 из комплекса с Bcl-2	Malik et al., 2011
Ксестоспонгин В	Освобождает Beclin1 из комплекса с IP3R	Vicencio et al., 2009
Рилмеридин	Снижает уровень цАМФ	Williams et al., 2008
PI-103	Ингибирует PI3-киназу класса I, ингибирует mTOR конкурентно с АТФ	Degtyarev et al., 2008
Литий (L-690330)	Снижает уровень инозитола и инозитол(1,4,5)-трифосфата	Sarkar et al., 2005
Ресвератрол	Активирует сиртуин-1 (деацетилазу гистонов)	Oripari et al., 2004
Эрлотиниб (антагонист EGFR)	Ингибирует киназный сигнальный путь PI3—АКТ—mTOR	Han et al., 2011
Верапамил	Снижает уровень Ca ²⁺ в цитозоле	Williams et al., 2008
Спермидин	Повышает экспрессию ряда генов <i>Atg</i>	Eisenberg et al., 2009
MG-132 (Z-Leu-Leu-Leu-Val)	Блокирует активность 26S-протеасом, стабилизирует экспрессию белков <i>Atg</i>	Jänen et al., 2009
z-VAD-fmk	Ингибитор каспаз, стабилизатор Beclin-1	Vandenabeele et al., 2006
Механизм действия ингибиторов		
3-Метиладенин	Ингибирует PI3-киназы класса III (секвестрация субстратов)	Seglen, Gordon, 1982
Вортманнин	То же	Blommaart et al., 1997a
LY294002	» »	То же
Спаутин-1	Повышает убиквитинирование Beclin-1	Liu et al., 2011
Бафиломицин А	Ингибирует слияния аутофагосом с лизосомами (ингибирует вакуолярную АТФазу)	Yamamoto et al., 1998
Хлорохин	Ингибирует слияния аутофагосом с лизосомами	Boya et al., 2005
SP600125	Обратимо ингибирует фосфорилирование киназы JNK, связанной с TLR	Li D. et al., 2009

Примечание. На основе работы: Rubinstein et al., 2012.

аутофагии при стрессе ЭПР множественны и включают в себя следующие сигнальные цепочки: PERK—eIF2 α —Atg8; IRE1—JNK1—Beclin1; Ca²⁺—DAP—Beclin1; Ca²⁺—CaMKK β —AM—mTOR; Ca²⁺—PKC θ (Verfaillie et al., 2010). Отмечены проаутофаговая активность белка IRE1 (через киназу JNK1), активирующего регулятор аутофагии Beclin1, и множественные пути модуляции аутофаговой сигнализации освобождающимися ионами кальция (Ravikumar et al., 2010).

Удаление дефектных белков может осуществляться также посредством шаперонопомедованной аутофагии, состоящей в селективном связывании их с белком Hsc70 (Hsp73) при участии его доступного мотива KFERQ и в последующем переносе в лизосомы в комплексе с белком лизосомной мембраны LAMP-2A (Benbrook, Long, 2012).

Следует отметить, что в клетке характер сегрегированного клеточного материала, пути его селективной или не-селективной доставки в аутофагосомы, убиквитинирование субстратов и вклад этих потоков в общий объем аутофагии и амплитуду ее ответа определяются множеством факторов, включая природу клеток, вид и силу воздействия, физиологическое состояние клеток. Важно подчеркнуть разнообразие путей аутофаговой сегрегации цитоплазмы, тогда как результирующий вклад этих отдельных путей в гомеостатическую реакцию клетки и их баланс

зависят от конкретных условий и практически остаются неясными. Ниже речь пойдет о массовой (bulk) аутофагии, основу которой составляет неселективная аутофагия с участием убиквитинопомедованной аутофагии и клеточного ответа на нерасплетенные белки.

Молекулярная организация процесса аутофагии

У дрожжей аутофагия протекает с участием почти 30 белков Atg, ортологами которых у млекопитающих являются белки ULK (Atg1), Beclin1 (Atg6), LC3 (Atg8), FIP200 (Atg17) и др. Белки аутофагии объединяются в 5 функциональных групп: 1) киназный комплекс ULK1/2 вкупе с комплексом mTORC1/2, 2) фосфатидил-инозитол-3-киназный (PI3-киназный) комплекс класса III, включающий в себя Beclin1, 3) система конъюгации Atg12, 4) система конъюгации Atg8 (LC3), 5) Atg9 (Mayotte, Thorburn, 2011). Ключевым регулятором инициации аутофагии является серинтреониновая киназа mTOR (mammalian target of rapamycin), ассоциированная с белками Raptor, mLST8/G β L, Deptor и PRAS40, в результате образующая комплекс mTORC1. Он в нормальном состоянии связан с комплексом ULK1, включающим в себя

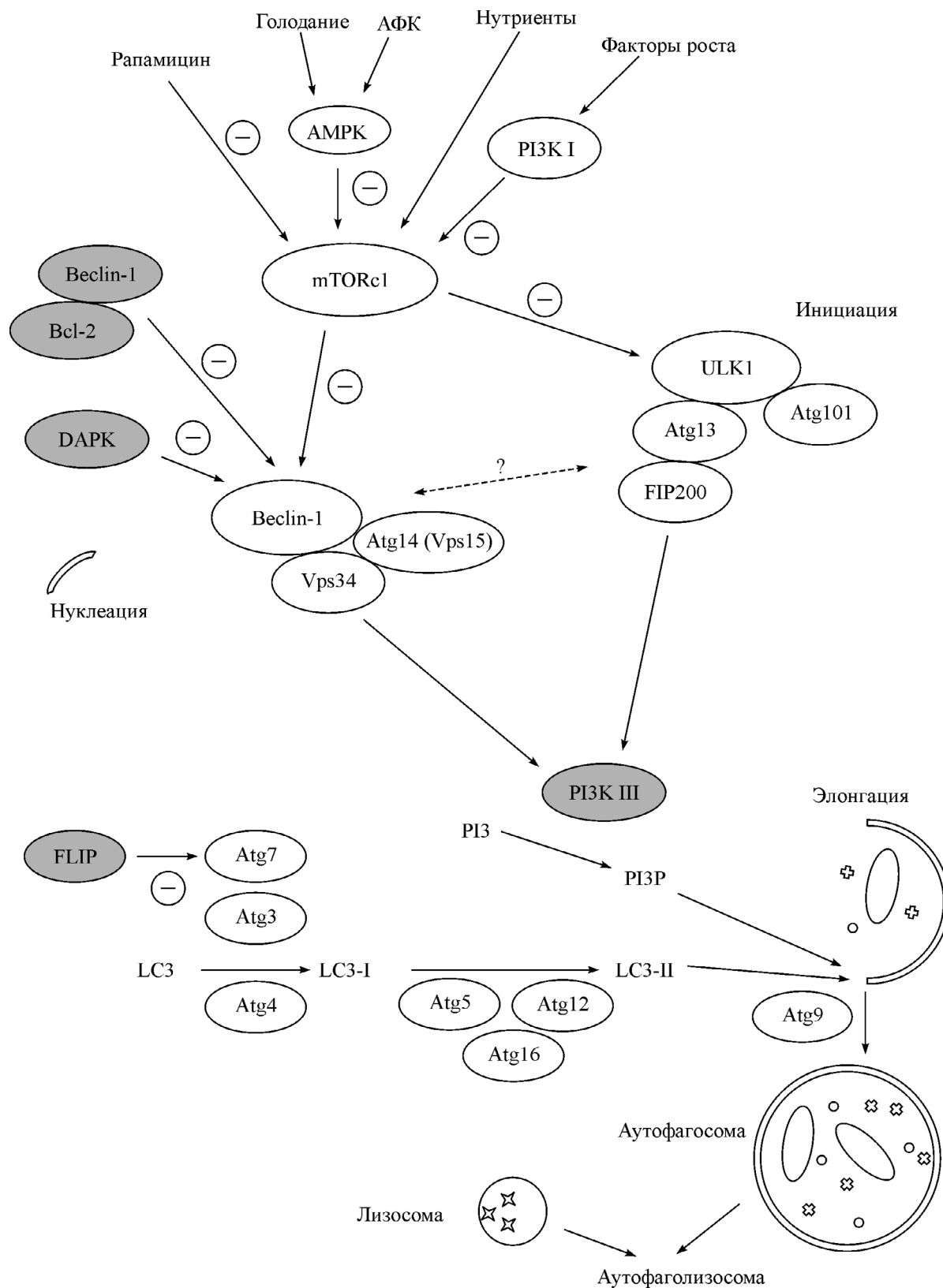


Рис. 2. Молекулярные регуляторы формирования аутофagosом.

Серым цветом выделены ингибиторы образования аутофagosом. Негативная регуляция показана знаком *минус*. Остальные объяснения см. в тексте.

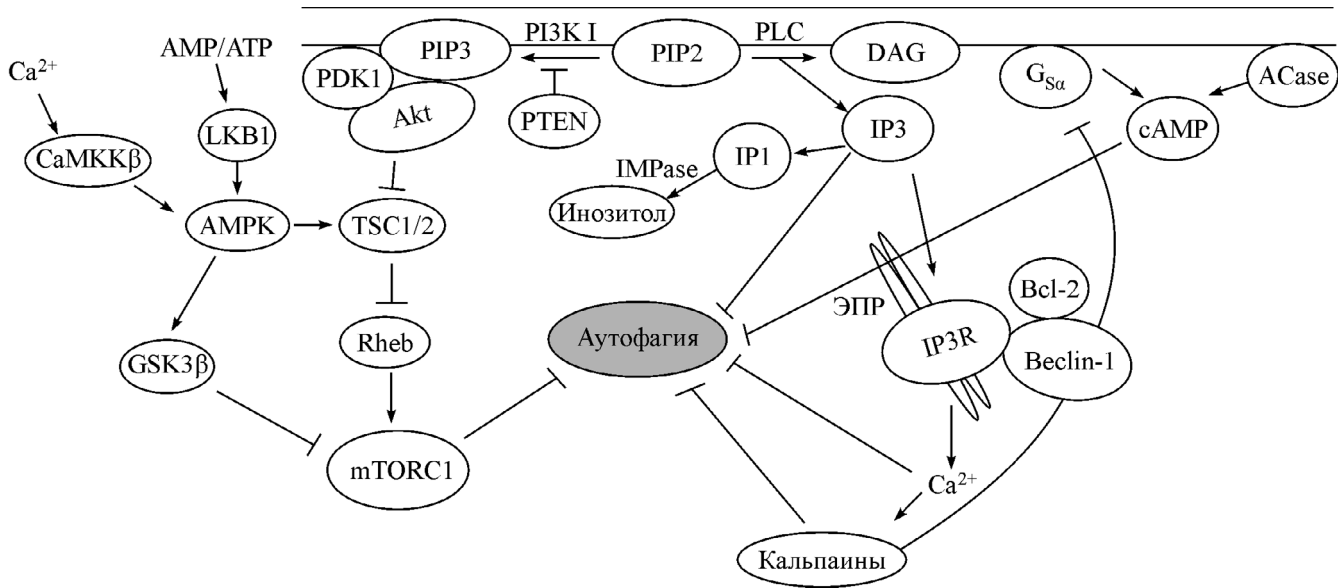


Рис. 3. Некоторые пути регуляции аутофагии.

ACase — аденилатциклаза, Akt — протеинкиназа B, CaMKKβ — киназа β кальций/кальмодулинзависимой протеинкиназы, G_{sα} — α-субъединица G-белка, GSK3β — киназа 3β гликоген-синтазы, IMPase — инозитолмонофосфатаза, IP3 — инозитол-3,4,5-трифосфат, IP3R — рецептор инозитол-3,4,5-трифосфата, LKB1 — киназа B1 печени, PDK1 — киназа 1 пируватдегидрогеназы, PI3K — фосфатидил-инозитол-3-киназа, PIP2 — фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат, PLC — фосфолипаза C, PTEN — фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат-3-фосфатаза; Rheb — GTP-связывающий белок (Ras homolog enriched in brain), TSC1/2 — туберозный и склерозный белки 1 и 2. Пояснения см. в тексте.

еще белки Atg13, FIP200 и Atg101 (Kroemer et al., 2010; Tanida, 2011) (рис. 2). При достаточном уровне клеточного питания комплекс стимулирует синтез белка и ингибирует аутофагию посредством фосфорилирования ULK1 и гиперфосфорилирования FIP200 и Atg13, ингибирующего киназную (проаутофаговую) активность ULK1/2. При недостаточности питания происходят дефосфорилирование mTOR, диссоциация mTORC1 из комплекса с ULK1, торможение фосфорилирования Atg13 и FIP200, активация регулятора аутофагии ULK1 и вместо поддержания клеточного роста запускается аутофагия.

В формировании аутофагосом различают этапы инициации, нуклеации, элонгации и завершения синтеза мембраны аутофагосом (рис. 2). Сигнализация, ведущая к образованию аутофагосом с участием mTORC1, показанная выше, инициирует поставку необходимых строительных компонентов для образования аутофагосом (Efeyan, Sabatini, 2010). Источниками пластического материала аутофагосом могут быть ЭПР, комплекс Гольджи, плазматическая мембрана (посредством рециклирующих эндосом) и внешняя мембрана митохондрий (Ravikumar et al., 2010). Показано, что плазматическая мембрана посредством отпочковывающихся эндосом служит источником материала везикул, являющихся предшественниками фагофоры (полусферы двойной мембраны аутофагосом), содержащей белки Atg12, Atg5 и Atg16L1 (Rubinstein et al., 2012; Puri et al., 2013). Однако другие механизмы транслокации и включения компонентов в фагофору пока недостаточно ясны.

Вместе с инициацией начинаются этапы нуклеации и элонгации мембраны фагофоры. На этапе нуклеации происходит образование комплекса белков Beclin1—Vps34—Atg14, в котором Vps34 (каталитическая субъединица PI3-киназы класса III) катализирует образование везикул, содержащих фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат (Kroemer et al., 2010). Процесс позитивно регулируется комплексом ULK1, белками UVRAG, Bif-1, Ambral,

Rab5 и Atg14 и негативно — белками Bcl-2, Bcl-X_L, Rubicon, NAF-1 и IP3R (Ravikumar et al., 2010).

Формирование аутофагосомы продолжается ростом мембраны и одновременно распознаванием и обособлением цитоплазматических субстратов в образующейся фагофоре. Элонгация мембраны зависит от двух убиквитин-родственных систем, определяющихся белками Atg12 и LC3 (Atg8) (рис. 2) (Tanida, 2011; Rubinstein et al., 2012). Созревание мембраны фагофоры связано с множественными актами гомотипического слияния везикул-предшественников (содержащих блок Atg12—Atg5—Atg16L1) с участием белка SNARE (Moreau, Rubinstein, 2012). Конъюгат Atg12—Atg5, связанный с Atg16 на внешней мембране фагофоры, способствует конъюгации цитозольного белка LC3-I с фосфатидилэтаноламином с образованием LC3-II, который включается в мембрану аутофагосом и одновременно приобретает свойства маркера аутофагии, тогда как блок Atg12—Atg5—Atg16L1 удаляется из мембраны. Рост фагосомной мембраны зависит от поставки липидов, осуществляемой посредством белка Atg9, действующего по челночному механизму с периферийным источником (Mehrpour et al., 2010). Завершается процесс элонгации смыканием краев фагофоры с образованием аутофагосомы, ограниченной двуслойной мембраной и являющейся частью кислого клеточного компартмента.

Сигнальные пути регуляции аутофагии

Различают важнейшие пути регуляции аутофагии посредством белков mTOR (взаимодействующего с комплексом ULK1), Beclin1, PI3-киназы (PI3K) и mTOR-независимые пути (Mehrpour et al., 2010; Ravikumar et al., 2010).

mTOR является сенсором в первую очередь аминокислотного и энергетического обеспечения клетки, дей-

ствующим вкпе со связкой первичных сенсоров, передающих сигнал на промежуточное звено АМФ-активируемую протеинкиназу (АМПК) (рис. 2, 3). Первичное распознавание баланса АМФ/АТФ в клетке выполняет белок LKB1, уровня кальция — СаМКК β , факторов роста — ТАК1 или Akt (Gozuacik, Kimchi, 2004; Ruderman et al., 2010). Передача сигнала с АМПК на mTOR происходит посредством цепочки белков TSC1/2 и Rheb или параллельно через фосфорилирование киназы гликоген-синтазы 3β (GSK3 β), ингибирующей mTOR.

Кроме того, описан регуляторный путь Ras — Raf-1—ERK1/2—GAIP, чувствительный к содержанию аминокислот (Ravikumar et al., 2010). Активированный Raf-1 индуцирует аутофагию только при недостатке аминокислот, при котором далее фосфорилируется ERK1/2 и активируется GIAP. Таким образом, аутофагия подавляется при достаточной концентрации аминокислот посредством пути Raf-1—ERK1/2—GAIP. Этот путь может модулироваться и посредством киназы Akt, способной инактивировать Raf-1 фосфорилированием. В этих условиях активации GIAP и аутофагии не происходит.

Во многих клеточных ответах одним из важнейших регуляторов аутофагии является белок Beclin1, работающий в комплексе с PI3-киназой липидов (Vps34) (Levine, Kroemer, 2008). В норме Beclin1 находится в ингибированном состоянии вследствие связывания с антиапоптозным белком Bcl-2 или его гомологом Bcl-X_L. Часто сначала активируется киназа JNK1 (с-JUN N-концевая киназа), которая фосфорилирует Bcl-2, устраняя его ингибирующее действие на Beclin1. Это взаимодействие включает в себя ВНЗ-домен в Beclin1 и связывающую бороздку Bcl-2/Bcl-X_L. Другие белки, содержащие ВНЗ-домен, могут конкурентно разрушать связывание Beclin1 с Bcl-2/Bcl-X_L, вызывая индукцию аутофагии. Голодание активирует аутофагию диссоциацией Beclin1 от его ингибиторов посредством либо активации белков «ВНЗ-only», таких как Bad, либо фосфорилирования Bcl-2, снижая его сродство к Beclin1 и белкам «ВНЗ-only», т. е. антиапоптозные белки семейства Bcl-2 и проапоптозные белки «ВНЗ-only» могут вызывать соответственно ингибирование и индукцию аутофагии. Beclin1 и PI3-киназа, связываясь, формируют интерактому, осуществляющую индукцию аутофагии. В интерактоте, локализуемой на зарождающейся мембране фагофоры, Beclin1 ассоциирован с регуляторными факторами Ambra1, Bif-1, UVRAG и посредством ВНЗ-домена с белками Bcl-2/Bcl-X_L, а PI3-киназа ассоциирована с Vps15 (Maiuri et al., 2010).

Немного иначе действуют протеинкиназы, ассоциированные с гибелью (DAP-киназы, death-associated protein kinase). Они фосфорилируют Beclin1 в составе комплекса с Beclin1—Vps34—Atg14 и тем самым вызывают диссоциацию Bcl-2 от Beclin1 и запуск аутофагии. Недавно обнаружен низкомолекулярный ингибитор аутофагии спаттин-1, препятствующий протеолизу убиквитиновой метки Beclin1 и тем самым активирующий его удаление из комплекса Beclin1—Vps34—Atg14L—p150 (Liu et al., 2011). Влияние антиапоптозного белка FLIP на аутофагию состоит в ингибировании, осуществляемом посредством инактивации белка Atg3, необходимого для образования LC3-II (рис. 2) (Mehrpour et al., 2010).

Главным сигнальным каскадом управления mTORC1 считается путь PI3-киназы (рис. 2, 3). Действие инсулина или факторов роста активирует PI3-киназу класса I, которая катализирует фосфорилирование фосфатидилинозитол-дифосфата PIP2 до PIP3, «притягивающего» к плаз-

матической мембране киназы Akt и PDK1 и активирующего Akt (Cantley, 2002). Сама Akt влияет на фосфорилирование белков TSC1/2, контролирующих рост и клеточное выживание. Они являются «верхним интегратором» различных сигналов к mTORC1 (включая также от АМПК, ERK1/2 и GSK3 β). TSC2 действует как ГТФ-активирующий белок (GAP) для ГТФ-связывающего белка Rheb из семейства Ras, который непосредственно активирует комплекс mTORC1 (Ravikumar et al., 2010).

Таким образом, активность PI3-киназы I класса, катализирующей образование PIP3, тормозит аутофагию активацией Akt, а гиперактивность фосфоинозитидфосфатазы PTEN (супрессор опухолей), ингибирующей Akt, активирует аутофагию торможением этого сигнального пути (рис. 3) (Arico et al., 2001). Активность PI3-киназы класса III, наоборот, стимулирует аутофагию, а ингибирование этой киназы, например, 3-метиладенином или вортманнином блокирует аутофагию. Другие протеинкиназы, такие как eIF2 α , eEF-2 и MAPK/ERK также используют mTOR-зависимую регуляцию аутофагии.

Ниже представлены важнейшие m-TOR-независимые пути регуляции аутофагии (рис. 3). Их эффект аддитивен m-TOR-зависимой регуляции.

1. Аутофагию подавляют инозитол и IP3. Этот путь регуляции опосредуется фосфолипазой C, гидролизующей фосфатидил-PIP2 на IP3 и диацилглицерин (DAG). IP3 действует как вторичный мессенджер, связывающийся с рецептором IP3 (IP3R), который индуцирует освобождение в цитозоль связанного кальция, вызывающего множественные клеточные реакции (Criollo et al., 2007). Соответственно препараты, снижающие уровень инозигола и IP3, активируют аутофагию. Но IP3R может регулировать аутофагию и через комплекс Beclin1—IP3R—Bcl-2 (см. Ravikumar et al., 2010).

2. Установлено, что внутриклеточный цАМФ подавляет аутофагию посредством сигнального пути сАМФ—Ерас—PLC ϵ —IP3 (Sarkar et al., 2009).

3. Аутофагия ингибируется уровнем Са²⁺ в цитозоле по пути Са²⁺ — кальпаин — G α . Са²⁺ активирует кальпаины (ингибирующие аутофагию), которые в свою очередь активируют белок G α , способствующий увеличению концентрации цАМФ. Таким образом, образуется регуляторная петля: Са²⁺ и кальпаины посредством G α поднимают уровень цАМФ, а цАМФ повышает уровень IP3, освобождающего Са²⁺.

4. Среди биоактивных сфинголипидов экзогенный церамид, имеющий апоптогенные свойства, угнетает транслокацию нутриентов в клетку, подавляет Akt, усиливает диссоциацию комплекса Beclin1—Bcl-2 и таким образом активирует аутофагию (Daido et al., 2004). А фосфолипид сфингозин-1-фосфат, способствующий выживанию клеток, стимулирует аутофагию ингибированием mTOR.

На регуляцию аутофагии оказывает существенное влияние белок со свойствами тумор-супрессора p53, откликающийся на различные виды клеточного стресса (Li-ang, 2010). Он способен трансактивировать ряд факторов (DRAM, IGF-BP3, PTEN, TSC2, АМПК и др.), которые блокируют анаболическую активность mTOR, и тем самым вызывают аутофагию (Crighton et al., 2006; Maiuri et al., 2010). Ослабление (нарушение) активности p53 в этих условиях приводит к снижению аутофаговой сигнализации и способствует туморогенезу. Вместе с тем показано, что p53 может также ингибировать аутофагию (Tasdemiir et al., 2008). Найдено, что действие p53 зависит от

его внутриклеточной локализации. При конститутивной цитоплазматической локализации он ингибирует аутофагию. А индукция p53, сопровождающаяся его перемещением в ядро, множественными путями индуцирует аутофагию.

Следует отметить также белки семейства DAP-киназ (DAPK), в частности DRP-1 (DAPK-related protein-1). DAP-киназа действует как медиатор клеточной гибели в ответ на различные стимулы. Гиперэкспрессия гена этих киназ вызывает индукцию аутофагии и признаки аутофаговой гибели клеток (при повреждении белка p53) (Inbal et al., 2002). Полагают, что DRP-1 помогает образованию аутофагосом прямым фосфорилированием компонентов сборки аутофагосом. Известны и некоторые другие, митохондриальные, пути регуляции аутофагии (Kroemer et al., 2010; Mehrpour et al., 2010; Ravikumar et al., 2010).

Физиологическая регуляция аутофагии

Аутофагия запускается клеточным запросом на ускорение обмена белка и органелл (Mizushima, Klionsky, 2007). Сбой этой функции ведет к накоплению белков, склонных к агрегации, или поврежденных митохондрий, что стимулирует образование АФК. Накопление АФК вкуче с активным состоянием mTOR приводит к ускорению старения и возрастной патологии. Вместе с тем показано, что голодание, гипоксия, митохондриальные токсины или окислительный стресс стимулируют образование АФК и аутофагию, а антиоксиданты в этих условиях подавляют аутофагию (Azad et al., 2009). Аутофагия поврежденных митохондрий, генерирующих повышенное количество АФК, снижает образование АФК и тем самым препятствует старению, сопровождающемуся накоплением aberrантных и окисленных белков, клеточных токсинов, поврежденных митохондрий (Terman et al., 2010). Клеточные последствия аутофагии зависят от ее регуляции, поскольку и недостаточная, и избыточная аутофагия может быть губительной в ситуации клеточного напряжения. Недостаточность аутофагии приводит к накоплению цитотоксических продуктов, к ускоренному клеточному старению, а избыточная аутофагия ведет к недостаточности ресурсов выживания и клеточной гибели (Loos, Engelbrecht, 2009; Terman et al., 2010). Активация аутофагии ингибированием mTOR в целом тормозит клеточное старение и продлевает жизнь клеток (Mendez et al., 2011).

Физиологическими активаторами аутофагии являются катаболический и голодный стрессы в ходе эмбрионального и последующего развития, стресс ЭПР, гипоксия и окислительный стресс, микробная инвазия и воспаление (Kroemer et al., 2010). Отметим, что аминокислотное голодание гепатоцитов может вызывать расщепление до 25 % клеточного белка за 1 сут (Blommaert et al., 1997b). Клеточное голодание может активировать разные пути индукции аутофагии, и в первую очередь посредством mTOR и Beclin1 (см. выше).

Важная роль в индукции аутофагии отводится энергообеспечению клетки. Первичные энергосенсорные каскады включают в себя протеинкиназы PKA (цАМФ-зависимую) и AMPK (АМФ-активируемую) (Loos et al., 2013). PKA регулирует фосфорилирование белка DRP1, влияющего на повышение энергоэффективности митохондрий. AMPK способна влиять на аутофагию двумя путями — ингибированием mTOR и прямой активацией ULK1 (Kim

et al., 2011). Но AMPK способна репрограммировать и общий клеточный метаболизм, выключая некоторые АТФ-зависимые клеточные процессы (Loos et al., 2013). Возмещение энергии возможно за счет разветвленных аминокислот, таких как лейцин, изолейцин и валин, метаболизируемых в активируемом голоданием цикле трикарбоновых кислот. Существует также возможность переключения аэробного митохондриального дыхания на анаэробный гликолиз.

Довольно подробно изучен заложенный в геноме аутофаговый ответ на гипоксию, встречающуюся в онтогенезе. Он включает в себя следующие сигнальные пути: AMPK (мишень АФК)—TSC1/2—mTOR; фактор, индуцируемый гипоксией HIF (либо e2F)—BNIP3 (проапоптозный белок семейства Bcl-2) — Beclin1; PKCθ—JNK1—Beclin1 (He, Klionsky, 2009). Влияние окислительного стресса на аутофагию происходит с участием путей Atg4—Atg8 (LC3) и PARP-1—LKB1—AMPK—p27 (He, Klionsky, 2009). АФК также модулируют другие пути аутофаговой сигнализации с участием Beclin1, p53, PTEN и PI3-киназы — Akt—mTOR и MAPK (Li et al., 2012).

Окислительный стресс может индуцировать как протективную аутофагию, так и гибель клеток (Perrotta et al., 2011). АФК в низких дозах являются сигнальными молекулами различных процессов, а в высоких дозах повреждают биополимеры и органеллы, особенно митохондрии (Lee et al., 2012). По данным разных источников, в зависимости от типа клеток и особенностей их метаболизма, индукторами аутофагии могут быть супероксидный радикал (Chen et al., 2009), гидроксильный радикал (Castino et al., 2011) или пероксид водорода (Azad et al., 2009). Антиоксиданты во многих случаях оказывают заметный терапевтический эффект, однако параллельное ингибирование ими аутофагии может нивелировать их позитивное влияние на устранение патологии. Недостаточность аутофагии может приводить к нарастающему нарушению функций митохондрий и окислительной катастрофе. Интересно, что нормальные клетки более устойчивы к запуску аутофагии посредством АФК, чем опухолевые, вероятно вследствие более активных систем удаления аномальных белков (Azad et al., 2009).

Результатом стресса ЭПР также могут быть и репаративная аутофагия, и клеточная гибель (Ding et al., 2007; Salazar et al., 2009). Результат зависит от силы стресса, типа клеток, их состояния (гипоксия, голодание, генетический фон и т. д.) (Eisenberg-Lerner et al., 2009; Salazar et al., 2009). Например, аутофагия, вызываемая туникамицином или брэфелдином А, играет защитную роль в опухолевых клетках и губительна в нормальных клетках толстой кишки человека или мышинных фибробластах.

Индукция аутофагии является стандартным ответом клеток на контакт с патогенами, включая бактериальный пептидогликан, зимозан, липополисахарид, микобактерии, вирусную одноцепочечную РНК и вирусную инфекцию, в частности вирус гепатита С. Важнейшим сенсором патогенов здесь являются толл-подобные рецепторы (TLR), осуществляющие активацию Beclin1 (He, Klionsky, 2009).

Связь аутофагии с различными видами клеточного стресса и пути ее индукции подробно представлены в ряде других обзоров (He, Klionsky, 2009; Kroemer et al., 2010; Ravikumar et al., 2010). Следует отметить, что в регуляции аутофагии участвуют как транскрипционные факторы (NF-κB, FoxO3, TFEB и др.), так и нетранскрипционные, которые фосфорилируют (дефосфорилируют)

сигнальные молекулы (mTOR, Beclin1, AMPK и др.), а также деацетируют белки Atg5, Atg7, Atg8 и Atg12 (в частности, деацетилаза SIRT1) (Lee et al., 2008).

Экспериментальная регуляция аутофагии достигается различными способами. Часто это делается генетическими манипуляциями по подавлению (нокдаун, нокаут, нокин) или гиперэкспрессии генов аутофагии (*mTOR*, *Beclin1*, *ULK* и др.). Распространен нокдаун генов *Atg5* и *Atg7*. Фармакологическая индукция аутофагии обычно вызывается с помощью рапамицина, подавляющего фосфорилирование киназы mTOR, а ингибирование чаще всего достигается с помощью 3-метиладенина, вортманнина или хлорохина, хотя два последних агента тормозят слияние аутофагосом с лизосомами, а не регулируют новообразование аутофагосом. Способность активировать аутофагию найдена у метформина (антидиабетического препарата, активирующего AMPK), ресвератрола (Morselli et al., 2009), спермидина (Eisenberg et al., 2009), антагонистов рецептора EGF (Li, Fan, 2010), ВНЗ-миметиков, вытесняющих Beclin1 из комплекса с Bcl-2 и Bcl-X_L (Mauri et al., 2007a, 2007b), белка L-NAME (Sarkar et al., 2011) и др. (см. таблицу).

Относительно амплитуды клеточных ответов отметим, что mTOR не ингибируется рапамицином полностью, по-видимому вследствие потребности клетки в поддержании белоксинтезирующей функции, зависимой от него (Rubinsztein et al., 2012). Тем не менее низкомолекулярные ингибиторы mTORC, являющиеся одновременно конкурентами АТФ, такие как PP242 или Torin 1, способны сильнее индуцировать аутофагию, чем ингибиторы mTORC (Nyfeler et al., 2011). Новый класс сильных индукторов аутофагии двойного действия представляет PI-103, ингибирующий одновременно mTOR и PI3-киназу класса I, частично растормаживающуюся ингибированием mTOR (Degtyarev et al., 2008).

Наиболее употребляемые модуляторы аутофагии сведены в таблицу, а более широкая информация приводится в других источниках (Calabretta, Salomoni, 2011; Rubinstein et al., 2012).

Связь аутофагии с активностью лизосомного компартмента

Для выполнения программы репаративной аутофагии необходимо участие лизосом. Роль кислого компартмента в репаративной аутофагии видна на примере клеток HeLa, в которых с помощью менадиона вызывали окислительный стресс, приводящий к аутофагии (Yu et al., 2013). При совместном действии менадиона с ингибитором лизосомного закисления NH₄Cl происходило накопление АФК, убиквитинированных белков, маркера стресса ЭПР белка GRP78, и запускался апоптоз по митохондриальному пути, т. е. в условиях индукции аутофагии лизосомный компартмент играет важную роль в предотвращении индуцированного менадионом апоптоза в клетках HeLa, способствуя осуществлению аутофагового цикла, удалению (расщеплению) цитотоксических субстратов и тем самым выживанию клеток.

Участие лизосом в аутофагии состоит в слиянии аутофагосом с лизосомами (первичными или вторичными), последующем переваривании аутофагоцитированного материала, трансмембранном освобождении продуктов гидролиза в цитозоль и реактивации лизосом путем образования протолизосом для повторного участия фер-

ментов в цикле деградации (рис. 4) (Kroemer, Jaattela, 2005; Yu et al., 2010).

В ходе слияния двуслойной мембраны аутофагосом с однослойной мембраной лизосом происходит сращение наружной мембраны фагосом с мембраной лизосом с последующим удалением внутренней мембраны слившейся аутофагосомы. Слияние аутофагосом с лизосомами осуществляется с помощью коротких ГТФаз семейства Rab, участвующих в образовании белковых комплексов слияния. Различают стадии дистанционного взаимодействия (с участием Rab14 и Rab2/UNC108), контакта (docking) и собственно слияния (с участием белков Rab7, SNARE и белка лизосомной мембраны LAMP2) (Guo, Wang, 2010). Для Rab7 показано, что он определяет не только слияние аутофагосом с лизосомами, но и цикл реактивации лизосом (образования протолизосом) (Yu et al., 2010). Ингибирование внутрилизосомного протеолиза, лизосомных катепсинов лейпептином или E64 совместно с пепстатином А отменяет нормализацию (снижение) аутофагии и цикл реактивации лизосом, вызывая накопление крупных долгоживущих аутофаголизосом.

Расщепление клеточных субстратов в лизосомах, в первую очередь белков, достаточно описано в других работах (Muller et al., 2012). Важным для понимания регуляции аутофагии стало установление связи между внутрилизосомным уровнем аминокислот и активностью аутофагии. Найдено, что киназа mTOR частично локализуется в лизосомной мембране (рис. 4) (Poüs, Codogno, 2011; Juhász, 2012) благодаря адапторному белку лизосомной мембраны LAMTOR1 (late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and mTOR activator 1) (Malek et al., 2012). Сенсорзависимая регуляция лизосомной киназы mTOR определяется концентрацией аминокислот в лизосомах. Соответственно аутофаговая деградация белка выступает как регулятор активности mTOR. При достаточных темпе протеолиза и уровне аминокислот в лизосомах киназа mTOR фосфорилирована, а при их снижении происходит ее дефосфорилирование и включение проаутофагового сигнала.

В лизосомах найдены белки регуляции аутофагии, являющиеся ассистентами комплекса mTORC1, в частности фактор транскрипции EB (TFEB), колокализирующийся с mTORC1 (Settembre et al., 2012). При достаточном питании фосфорилирование TFEB посредством mTORC1 подавляло активность TFEB. А фармакоингибирование mTORC1, голодание или даже разрушение лизосом активировали TFEB, способствуя его ядерной транслокации. В клетках с геномом *TFEB*^{-/-} снижался транскрипционный ответ лизосомных и аутофаговых генов на подавление активности лизосом или ингибирование mTORC1. Найдено, что для транслокации TFEB в ядро, индуцируемой стрессом или голоданием, необходимо и достаточно образование Rag-ГТФазного комплекса, способствующего распознаванию уровня аминокислот в лизосомах и регулирующего активность mTORC1 (Sancak et al., 2008; Settembre et al., 2012). Таким образом, в лизосомах есть собственный механизм распознавания уровня аминокислот и регуляции биогенеза лизосом благодаря передаче сигналов из лизосом в ядро посредством TFEB и mTORC1. А препараты, ингибирующие внутрилизосомную деградацию белка, могут индуцировать аутофагию вследствие снижения уровня аминокислот в лизосомах и дефосфорилирования лизосомной mTOR. Установление этой связи позволяет понять, почему использование ингибиторов протеолиза часто вызывает накопление ауто-

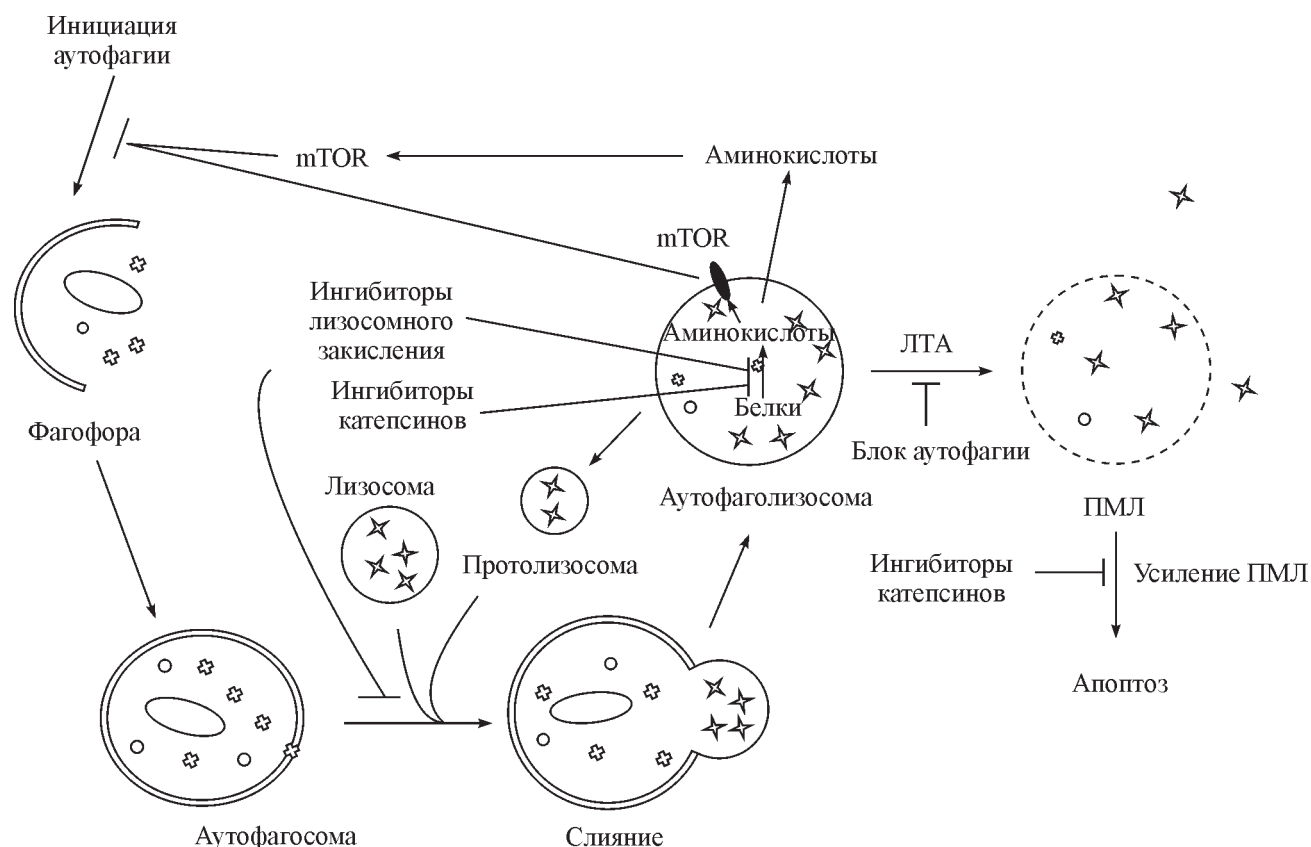


Рис. 4. Лизосомозависимая регуляция аутофагии.

ЛТА — лизосомотропные агенты, ПМЛ — пермеаблизация мембран лизосом. Пояснения см. в тексте.

фагосом *in vivo*. Примером такой индукции является действие хлорохина, сурамина, E-64 и других ингибиторов протеиназ (Schneider et al., 1997).

Экспериментальное ингибирование внутрилизосомного протеолиза может приводить и к губительному результату, если ингибитор способен также нейтрализовать кислый внутрилизосомный pH, вызывая тем самым торможение слияния лизосом с аутофагосомами. Применение ингибиторов протеиназ со свойствами лизосомотропных аминов не только снижает уровень аминокислот внутри лизосом, обладающих регуляторным эффектом на аутофагию, но и резко сенсibiliзирует клетки к действию цитотоксических агентов (рис. 4) (Luiken et al., 1996; Yoon et al., 2010; Amaravadi et al., 2011; Carew et al., 2011). Примером является действие пан-каспазного ингибитора zVAD, вызывающего в клетках фибросаркомы мыши L929 некроз (Wu et al., 2008). Рапамицин блокировал zVAD-индуцируемую гибель клеток, а хлорохин, ингибитор лизосомного закисления и активности лизосомных катепсинов, выраженно сенсibiliзировал гибель клеток. То же самое обнаружено и для клеток U937.

Каким образом аутофагия связана с пермеаблизацией мембран лизосом (ПМЛ), имеющей критическое значение в индукции клеточной гибели путем лизосомозависимого апоптоза (Пупышев, 2011; Воуа, 2012)? На макрофагах J-774 нашли, что клетки выживают при действии 250 мкМ H_2O_2 (30 мин), тогда как доза H_2O_2 350—500 мкМ уже летальна для определенной части клеток (Brunk et al., 1995). Окислительный стресс вызывал раннюю дозо- и времязависимую ПМЛ, «пузырение» клеточной поверхности, нарастающую аутофагию, быст-

рое истощение АТФ и восстановленного глутатиона. Все эти изменения обратимы для нелетальных доз H_2O_2 . Вообще нередко ПМЛ регистрируется ранее апоптоза и существенно опережает индукцию губительной аутофагии. Так, в клетках MCF-7 кампотехин быстро вызывал ПМЛ с последующим пиком апоптоза (1 ч) и прогрессивным ростом аутофагии (24 ч) (Lamparska-Przybylska et al., 2005).

Связь аутофагии и ПМЛ показана при действии ресвератрола на цервикальные опухолевые клетки матки (Hsu et al., 2009). Препарат вызывал аутофагию, но продолжительная индукция приводила к цитозольной транслокации цитохрома c, активации каспазы-3 и апоптозу. Нашли, что ресвератрол вызывал ПМЛ и утечку в цитозоль белка и перераспределение активности катепсина L, а подавление экспрессии гена фермента специфической siRNA спасало клетки от гибели. Важно, что ингибирование аутофагии вортманнином или аспарагином приводило к снижению раннего образования маркера аутофагии LC3-II, уменьшению ПМЛ и отмене индуцированной ресвератролом клеточной гибели, т. е. в данном случае индукция аутофагии, по-видимому, сопряжена с критическим повреждением лизосом.

ПМЛ обнаружена в случае индукции аутофагии производным бетулиновой кислоты B10 (Gonzalez et al., 2012). В результате одновременной стимуляции аутофагии и торможения ее цикла препарат способствует клеточной гибели, зависимой от цитозольной транслокации лизосомных катепсинов.

Как связана аутофагия с экспрессией (активностью) лизосомных ферментов? Известно, что способность к

аутофагии угасает по мере старения клеток, параллельно происходит уменьшение экспрессии генов аутофагии и лизосомных ферментов (Cuervo, Dice, 2000; Donati et al., 2001; Rajawat et al., 2009). Однако согласно другим исследованиям, индукция аутофагии (как и апоптоза) не сопровождается параллельным ростом активности лизосомных ферментов β -галактозидазы или катепсина D (Byun et al., 2009).

Вместе с тем лишение клеток PC12 сыворотки вызвало раннюю аутофагию, способствующую апоптотической гибели клеток, и одновременно выраженное снижение активности катепсина В (но не экспрессии его гена) и повышение активности катепсина D и экспрессии его гена (Uchiyama, 2001). Более того, в этих условиях клетки с гиперэкспрессией гена катепсина D гибли скорее, чем клетки дикого типа, а клетки с гиперэкспрессией гена катепсина В обнаруживали повышенную жизнеспособность. Таким образом, аутофагия, способствующая гибели клеток, сопровождалась неоднозначной индукцией важнейших катепсинов.

В целом лизосомы влияют на процесс аутофагии несколькими путями, главными из которых являются, по-видимому, mTOR-опосредуемое распознавание низкоуровня аминокислот в лизосомах, способствующее индукции аутофагии, и блок аутофагового потока, часто связанный с нейтрализацией внутрилизосомной среды.

Взаимоотношения репаративной и губительной аутофагий

Смысл аутофагии как адаптивного (гомеостатического) клеточного ответа на стресс состоит в том, чтобы защитить клетку от образующихся цитотоксических компонентов (нерасплетенных белков, АФК поврежденных митохондрий), использовать пластический и энергетический ресурс аутофагоцитированного материала в биосинтезе адаптивных белков (структур) и поддержании

жизнеспособности клетки и, наконец, не допустить (подавить) возможных сигналов к гибели. Происходит мобилизация всех жизненных ресурсов клетки на адаптивный ответ. Репаративной аутофагии свойственна «петля» ее самоингибирования продуктами деградации белка, вероятно, предназначенная для предотвращения избыточной деградации цитоплазмы, ведущей к клеточной гибели. Однако этот механизм не является абсолютным, сильный или длительный стресс может преодолевать это ограничение, а клетка способна аутофагоцитировать до половины своей цитоплазмы, но уже с фатальным исходом (рис. 5) (Clarke, 1990). Или, например, инволюция молочной железы сопровождается гомеостатической аутофагией, но по мере ее дальнейшей активации происходит переход к аутофаговой гибели (ПКГ второго типа, ПКГ II) (Motyl et al., 2006).

Смена казуального эффекта аутофагии зависит от множества факторов: длительности и интенсивности действия агента, индуцирующего аутофагию, спектра регуляторных эффектов агента, физиологического статуса клетки, генетического фона и т. д. (Codogno, Meijer, 2005). Например, в гемопоэтических клетках в условиях блокады апоптоза в случае генотипа *Bax/Bak* $-/-$ аутофагия способствует выживанию клеток (Lum et al., 2005), но в эмбриональных фибробластах с подобным генетическим дефектом в ответ на индукцию апоптоза запускается ПКГ II (Shimizu et al., 2004).

Гибельный эффект аутофагии может быть связан не только с гиперстимуляцией аутофагии, но и с ранним запуском неаутофаговой гибели сильным воздействием (Cao et al., 2006; Samara et al., 2008). Это нетрудно понять, потому что сегрегация значительной части цитоплазмы временно ослабляет жизнеспособность клеток, а компенсационные процессы отстают от сегрегации. Сильный стресс лишь в редких случаях ведет к ПКГ II, чаще — к апоптозу или некрозу, т. е. гиперактивация аутофагии сопряжена с достаточно ранней сигнализацией неаутофаговой клеточной гибели (рис. 5).

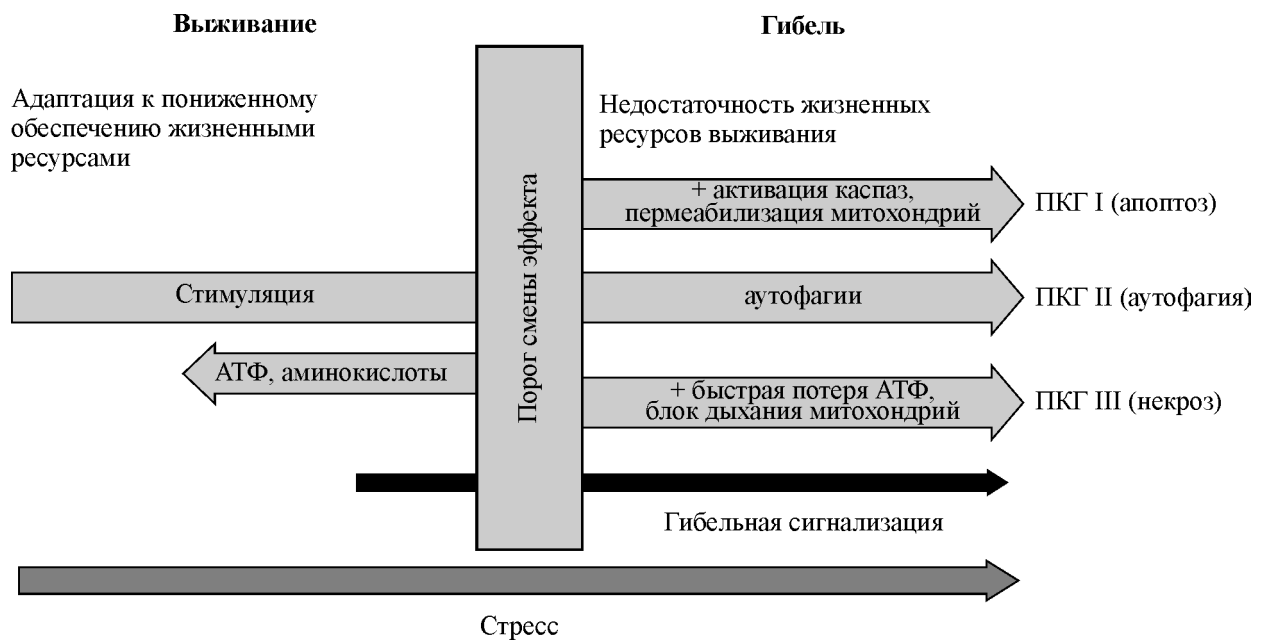


Рис. 5. Клеточные эффекты аутофагии в зависимости от интенсивности стимуляции.

ПКГ — программированная клеточная гибель.

Сегрегация каких компонентов наиболее остро отражается на жизнеспособности клетки? В какой мере жизненные ресурсы, возвращаемые клетке посредством аутофаговой деградации (метаболизма), компенсируют их первичную аутофаговую сегрегацию? Какие сигнальные молекулы обуславливают переход от восстановительной аутофагии к клеточной гибели?

Аутофагия является интегральным клеточным ответом, связанным с распознаванием состояния клеточного напряжения в ответ на стресс и регуляции множественных сигнальных механизмов клеточного выживания или гибели. Показано, что в процессе ПКГ II цитоплазма аутофагоцитируется более, чем, например, при восстановительной аутофагии, вызываемой голоданием (Clarke, 1990; Bursch, 2001). Суммарная площадь аутофаговых вакуолей и плотных телец может быть примерно равной или даже больше площади окружающей цитоплазмы (Clarke, 1990). В ряде клеток в ответ на индукцию ПКГ II (в присутствии ингибиторов каспаз) аутофагии и деградации подвергалось большинство митохондрий, а сами клетки уменьшались в размерах и погибали (Bursch et al., 2008), т. е. при аутофагии может сегрегироваться большая часть цитоплазмы, что в конечном счете способствует коллапсу клеточных функций и необратимости процесса. Разная интенсивность аутофагии предполагает существование порога стимуляции, разграничивающего рассматриваемые градации аутофагии (рис. 5). И по-видимому, этот порог имеет комплексную природу.

Представляет интерес вклад аутофагового удаления цитотоксических (нефункциональных) белков. При умеренной индукции агресом, видимых по обогащению шаперонами нерастворимой белковой фракции цитозоля, активизируется репаративная аутофагия, однако продолжительная стимуляция шаперонопосредованной аутофагии тамоксифеном вызывает лизис почти всех клеток (Bursch et al., 2008). В других экспериментах на клетках почки NRK-52E найдено, что цисплатин в дозе 10 мМ вызывал протективную аутофагию (Rovetta et al., 2012), а при 50 мМ — апоптоз. Однако снижение силы стресса ЭПР (вызывающего UPR) с помощью таурина способствовало отмене апоптоза и выживанию клеток. По-видимому, гиперстимуляция избирательной аутофагии белков может приводить к гибели клеток.

Выделяют три пути взаимодействия энергетического метаболизма и аутофагии в процессах клеточного выживания (Loos et al., 2013). 1. Конвергенция множественных сенсорных сигналов энергетического состояния клетки. Она включает в себя сенсорные киназы РКА (цАМФ-зависимую), АМПК и mTOR. РКА в конечном счете повышает энергетическую эффективность митохондрий. АМПК участвует в регуляции аутофагии, адресуя сигналы к mTOR, и прямым фосфорилированием другого регулятора аутофагии белка ULK1. Эта дублирующая регуляция, по-видимому, отражает важность сигналов об энергетической недостаточности (Egan et al., 2011). Кроме того, АМПК способна «отключать» расходование АТФ на другие клеточные процессы, обеспечивая экономию АТФ (Mihaylova, Shaw, 2011).

2. Метаболический вклад аутофагии в генерацию клеточного ответа. Он состоит в первую очередь в деградации долгоживущих белков, составляющих основную массу клеточного белка, и наработке метаболизируемого пула аминокислот. Скорость аутофаговой деградации белка может быть очень высокой, достигать 5 % общего клеточного белка за 1 ч (Mizushima, Klionsky, 2007).

В дальнейшем аминокислоты становятся источником энергии за счет окисления разветвленных аминокислот (лейцина, изолейцина и валина) в цикле трикарбоновых кислот. Этот путь дает примерно столько же энергии в расчете на 1 моль O₂, что и окисление глюкозы или пальмитиновой кислоты (Loos et al., 2013). Но он эффективен только при дыхательной активности митохондрий, когда окислительное фосфорилирование преобладает над гликолизом. Другим метаболическим ресурсом служат липиды — поставщики жирных кислот в процессах β-окисления. Однако в разных клетках требуются свои пути оптимизации аутофагии: например, в кардиомиоцитах энергия извлекается в основном из жирных кислот, а в нервных клетках — преимущественно за счет гликолиза.

3. Интеграция аутофагового ответа с процессами потребления АТФ и эффективностью митохондриального дыхания. Собственно аутофагия сама нуждается в АТФ на стадии образования аутофагосом, равно как АТФ расходуется на поддержание градиента рН кислого компартмента. По некоторым данным, снижение содержания АТФ на 30—50 % тормозит объем аутофагии на 70 %, т. е. для адекватного гомеостатического ответа нужны некоторые пороговые концентрации АТФ (Schellens et al., 1988). Быстрое расходование 50 % клеточной АТФ ведет к клеточной гибели (Lemasters et al., 1998). Показано, что на фоне индукции аутофагии быстрая потеря свыше половины АТФ, разобщение митохондриального дыхания ведут к некрозу (рис. 5). Предполагается, что сигналы к гибели возникают задолго до морфологической картины некроза и определяют переход губительной «точки невозврата» (Buttgereit, Brand, 1995). Важно соответствие компенсации АТФ при аутофагии клеточному запросу на энергообеспечение. При «мягком» стрессе, когда сохраняются достаточное напряжение кислорода, функциональное состояние митохондрий и их достаточное количество, аутофагия может служить поддержанию адаптивного ответа. Торможение аутофагового потока или аутофагового механизма, недостаточность энергетической и метаболической компенсации вызывают несовместимость процесса аутофагии с клеточным метаболизмом и жизнеспособностью, по-видимому в результате критического снижения уровня АТФ.

В составе сегрегируемого материала аутофагически могут удаляться важнейшие регуляторы клеточного выживания, вполне вероятно, митохондрии, подвергающиеся чрезмерному убиквитинированию. Итог зависит от того, в каких отношениях находятся убиквитинирование поврежденных митохондрий и генерация ими апоптогенной сигнализации. И если скорость индукции Вах- и Bid-опосредованной пермеабиллизации мембран митохондрий аутофагией, то наступает смещение баланса от цитопротективной аутофагии к апоптозу с обилием картин аутофагии (Lamparska-Przybysz et al., 2005).

ПКГ II во многом повторяет репаративную аутофагию: диссоциация Beclin1 из комплекса с белками Bcl-2/Bcl-X_L, участие mTOR и PI3K, наработка LC3-II и т. д. Но губительная аутофагия может приобретать некоторые признаки других видов ПКГ, в частности апоптоза. Она характеризуется некоторой (слабой) деградацией ДНК, сохранением интактного состояния ядра до терминальных стадий гибели (когда происходит фрагментация ядра и клетки) и сопровождается поздним набуханием митохондрий (свойственным некрозу). Отмечается некоторое «пузырение» мембран, подобное таковому при апоптозе

(Gozuacik, Kimchi, 2004). В целом аутофагия и неаутофаговая клеточная гибель часто выглядят как простое совпадение процессов во времени, когда аутофагия является безуспешной попыткой выживания клетки, а определяющую роль играют параллельные пути индукции клеточной гибели (Shaw, Kirshenbaum, 2008).

Относительно участия лизосом найдено, что ингибирование 3-метиладенином начальных этапов аутофаговой гибели, запускаемой в Т-клеточной лимфобластоме в ответ на TNF- α , предотвращает клеточную гибель, тогда как торможение слияния аутофагосом с лизосомами посредством аспарагина не препятствует ПКГ II (Jia et al., 1997), т. е. в данном случае в последовательности аутофаговых событий ингибирование аутофагии позднее секвестрации цитоплазмы не отменяет ПКГ II. Более того, известно, что 3-метиладенин несколько повышает pH лизосом, однако специальная нейтрализация лизосомного pH моненсином или NH₄Cl не защищала клетки почки от индуцируемой ризином гибели (Sandvig, van Deurs, 1992). Следовательно, фатальный клеточный исход здесь определяет секвестрация цитоплазмы, а не последующие этапы аутофагии.

Если гомеостатическая аутофагия во многом индуцируется дефицитом клеточного питания и модуляцией mTOR, то для аутофаговой гибели найдены и некоторые особые пути сигнализации. Так, при метаморфозе дрозофилы удаление жировых клеток путем ПКГ II регулируется PI3-киназой 1-го класса и в меньшей мере TOR-киназой (Rusten et al., 2004). А при регрессии слюнных желез дрозофилы для перехода от репаративной аутофагии к губительной нужна активация регулятора синтеза белка и транскрипции киназы c-Jun, влияющей на экспрессию генов *Atg* (Yu et al., 2004). При этом авторы наблюдали индукцию целого спектра генов *Atg*, которая в свою очередь связана с ингибированием каспазы-8.

Взаимодействие между Beclin1 и антиапоптозными белками Bcl-2 и Bcl-X_L нередко рассматривается как основной механизм переключения клеточных программ дегенерации и ускользания клеток от фатального пути (Liang et al., 1998; Shaw, Kirshenbaum, 2008). Как уже говорилось, Beclin1 является ранним индуктором аутофагии. Его ассоциация с Bcl-2 и Bcl-X_L осуществляется посредством BH3-домена, свойственного белкам BH3-only. Связывание его с Bcl-2 и Bcl-X_L в ЭПР ингибирует аутофагию, а вытеснение его из этого комплекса инициирует аутофагию. Белки, содержащие BH3-домен, такие как проапоптозные белки BH3-only (в частности, Bad, Bim, Bnip3, Noxa и Puma) или подобные искусственные конструкции, могут конкурентно разрушать это связывание и активировать аутофагию (Maiuri et al., 2010).

Описан сигнальный путь губительной аутофагии, связанный с белками семейства DAP-киназ, в частности с белком DRP-1, способным индуцировать апоптоз при действии TNF- α . Однако в клетках карциномы с неактивным белком p53 повышенная экспрессия DRP-1 ведет к активации аутофагии и ПКГ II независимо от каспаз (Inbal et al., 2002). А инактивация гена *DRP-1* в клетках MCF-7 приводит к подавлению аутофагии, вызываемой введением тамоксифена. Вместе с тем DRP-1 контролирует в этих же клетках и репаративную аутофагию при аминокислотной недостаточности. Это говорит о том, что сходные сигнальные механизмы действуют при репаративной аутофагии, вызванной удалением питания, и при аутофаговой клеточной гибели, и, возможно, различия заключаются в активности различных доменов DRP-1 (In-

bal et al., 2002). Известны и некоторые другие примеры и детали сигнализации губительной аутофагии и ее роли в переклочении ПКГ (Codogno, Meijer, 2005; Verfaillie et al., 2010).

Наконец, в связи с критической стимуляцией аутофагии отметим, что если клеточный ответ репаративной аутофагии полностью исчерпан, то дальнейшая активация аутофагии ведет к клеточной гибели. Это обстоятельство ограничивает возможности терапевтической эксплуатации дополнительной индукции аутофагии в условиях полного использования этого внутреннего адаптационного резерва клеток. Вероятно, только повышение порога перехода от восстановительной аутофагии к губительной может иметь терапевтическую ценность. А это в свою очередь возможно при применении обработок, увеличивающих резистентность клеток и повышающих порог смены эффектов еще до губительного воздействия (Wu et al., 2008; Rovetta et al., 2012). По-видимому, это связано с генерацией факторов, ингибирующих сигналы гибели. Возможно и фармакологическое снижение чувствительности клеток к действию повреждающего фактора, такого например, как, стресс ЭПР (Rovetta et al., 2012).

Заключение

Следует подчеркнуть, что центральные регуляторы аутофагии mTOR и Beclin1 находятся под множественным контролем со стороны сенсоров стрессовых воздействий и клеточного жизнеобеспечения. Центральную роль в этой регуляции играет киназа mTOR, реагирующая на недостаток АТФ, аминокислот и факторов роста, на уровень Ca²⁺ и АФК. Средством распознавания достаточности протеолиза аутофагоцитированного материала и концентрации аминокислот является частичная локализация киназы mTOR в лизосомах, сопряженная с активностью транскрипционного фактора TFEB. Способностью стимулировать аутофагию обладают АФК, образующиеся в поврежденных митохондриях, и аномально свернутые белки, образующиеся при стрессе ЭПР.

В конститутивном режиме существует баланс обновления цитоплазмы посредством «переработки» ее аутофагией. Индукция аутофагии, запускаемая широким разнообразием факторов и воздействий, вызывает первоначальное уменьшение жизненных ресурсов, обусловленное сегрегацией (инактивацией) части белков и органелл. Позитивная аутофагия связана с удалением цитотоксического материала поврежденной цитоплазмы и тем самым повышением порога индукции клеточной гибели. По-видимому, на этом этапе возможна также активация факторов, ингибирующих губительную сигнализацию. Не исключено, что эти же механизмы действуют при индукции репаративной аутофагии голоданием, продлевающей жизнь клеток и организма в целом (Harrison et al., 2009; Morselli et al., 2010).

Важная роль в репаративной аутофагии отводится метаболической компенсации сегрегированного материала и поддержанию энергообеспечения. Образующиеся в результате протеолиза разветвленные аминокислоты (лейцин, изолейцин и валин) способны подвергаться окислению и быть источником энергии, равно как и образующиеся из липидов жирные кислоты. Недостаточность АТФ вызывает аутофагию, но быстрое выраженное падение уровня АТФ (выше 50 %) ведет к клеточной гибели. Персистентная индукция аутофагии сопровождается

обильной сегрегацией цитоплазмы, нарушением аутофагового цикла, накоплением крупных аутофагосом и в конечном счете клеточной гибелью. По-видимому, существует порог индукции репаративной аутофагии, превышение которого «ломает» защитную функцию гомеостатической аутофагии. Возможно, главным механизмом здесь являются чрезмерная сегрегация митохондрий и развивающийся дефицит АТФ. Однако найден и достаточно специфический сигнальный путь к аутофаговой гибели, связанный с киназами с-Jun, DRP-1, PI3 1-го класса и другими белками. Представляется вероятным, что ПКГ II — это не столько слом физиологического барьера индукции аутофагии, сколько все-таки инициация гибели специфическими факторами. В случае других типов ПКГ, сопровождающихся картинами аутофагии, гибель клеток происходит на фоне несостоятельности репаративной аутофагии, а при ПКГ II проступают некоторые признаки апоптоза (Gozuasik, Kimchi, 2004).

Гибель клеток достигается также индукцией аутофагии совместно с блокированием аутофагового цикла. Торможение лизосомного протеолиза и аутофагового цикла лизосомотропными препаратами, нейтрализующими лизосомный pH, сенсбилизирует клетки к цитотоксическим воздействиям, что открывает перспективы разработки новых средств уничтожения опухолевых клеток.

Показаны и другие пути терапевтического использования репаративной аутофагии. Она является не только внутренним механизмом противодействия губительному клеточному стрессу. Ее предварительная стимуляция в некоторых случаях способна ослаблять апоптоз, повышать выживание клеток в условиях стресса (Rovetta et al., 2012). В процесс аутофагии включены регуляторы, препятствующие апоптозу, но у апоптоза существует более мощная система необратимого подавления аутофагии (Caru et al., 2013).

В интермиттирующем режиме индукция аутофагии способна продлевать жизнь не только клеточным культурами беспозвоночных, но и организмам млекопитающих (Harrison et al., 2009; Anisimov et al., 2011). Наконец, с репаративной аутофагией связывают перспективы эффективного репрограммирования соматических клеток в плюрипотентные стволовые (Menendez et al., 2011).

Список литературы

- Зубова С. Г., Шитикова Ж. В., Поспелова Т. В. 2012. TOR-центрическая концепция регуляции митогенных, метаболических, и энергетических сигналов в клетке. Цитология. 54 (8) : 589—602 (Zubova S. G., Shitikova Zh. V., Pospelova T. V. 2012. TOR-centric concept of regulation mitogenic, metabolic and energetic signal processing in cell. Tsitologiya. 54 (8) : 589—602.)
- Манских В. Н. 2007. Пути гибели клетки и их биологическое значение. Цитология. 49 (11) : 901—915. (Manskikh V. N. 2007. Pathways of cell death and their biological importance. Tsitologiya. 49(11) : 909—915.)
- Пупышев А. Б. 2011. Пермеабиллизация лизосомных мембран как апоптогенный фактор. Цитология. 53 (4) : 313—324. (Pupyshev A. B. 2011. Lysosomal membrane permeabilization as apoptogenic factor. Tsitologiya. 53 (4) : 313—324.)
- Черников В. П., Белоусова Т. А., Кактурский Л. В. 2010. Морфологические и биохимические критерии клеточной гибели. Архив патол. 72 (3) : 48—54. (Chernikov V. P., Belousova T. A., Kakturskii L. V. 2010. Morphological and biochemical criteria for cell death. Arkh. Patol. 72 (3) : 48—54.)
- Amaravadi R. K., Lippincott-Schwartz J., Yin X. M., Weiss W. A., Takebe N., Timmer W., DiPaola R. S., Lotze M. T., White E. 2011. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. Clin. Cancer Res. 17 : 654—666.
- Anisimov V. N., Zabezhinski M. A., Popovich I. G., Piskunova T. S., Semenchenko A. V., Tyndyk M. L., Yurova M. N., Rosenfeld S. V., Blagosklonny M. V. 2011. Rapamycin increases lifespan and inhibits spontaneous tumorigenesis in inbred female mice. Cell Cycle. 10 : 4230—4236.
- Arico S., Petiot A., Bauvy C., Dubbelhuis P. F., Meijer A. J., Codogno P., Ogier-Denis E. 2001. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. J. Biol. Chem. 276 : 35 243—35 246.
- Azad M. B., Chen Y., Gibson S. B. 2009. Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment. Antioxid. Redox Signal. 11 : 777—790.
- Benbrook D. M., Long A. 2012. Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis. Exp. Oncol. 34 : 286—297.
- Bernales S., Schuck S., Walter P. 2007. ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic reticulum. Autophagy. 3 : 285—287.
- Blommaert E. F., Krause U., Schellens J. P., Vreeling-Sindelaroova H., Meijer A. J. 1997a. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. Eur. J. Biochem. 243 : 240—246.
- Blommaert E. F. C., Luiken J. J. F. P., Meijer A. J. 1997b. Autophagic proteolysis: control and specificity. Histochem. J. 29 : 365—385.
- Boya P. 2012. Lysosomal function and dysfunction: mechanism and disease. Antioxid. Redox Signal. 17 : 766—774.
- Brunk U. T., Zhang H., Dalen H., Ollinger K. 1995. Exposure of cells to nonlethal concentrations of hydrogen peroxide induces degeneration-repair mechanisms involving lysosomal destabilization. Free Rad. Biol. Med. 19 : 813—822.
- Bursch W. 2001. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. Cell Death Differ. 8 : 569—581.
- Bursch W., Ellinger A., Kienzl H., Torok L., Pandey S., Sikorska M., Walker R., Hermann R. S. 1996. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. Carcinogenesis. 17 : 1595—1607.
- Bursch W., Karwan A., Mayer M., Dornetshuber J., Frohwein U., Schulte-Hermann R., Fazi B., Di Sano F., Piredda L., Piacentini M., Petrovski G., Fesus L., Gerner C. 2008. Cell death and autophagy: cytokines, drugs, and nutritional factors. Toxicology. 254 : 147—157.
- Buttgereit F., Brand M. D. 1995. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. Biochem. J. 312 : 163—167.
- Byun H.-O., Han N.-K., Lee H.-J. Kim K. B., Ko Y. G., Yoon G., Lee Y. S., Hong S. I., Lee J. S. 2009. Cathepsin D and eukaryotic translation elongation factor 1 as promising markers of cellular senescence. Cancer Res. 69 : 4638—4647.
- Calabretta B., Salomoni P. 2011. Inhibition of autophagy: a new strategy to enhance sensitivity of chronic myeloid leukemia stem cells to tyrosine kinase inhibitors. Leuk. Lymphoma. 52 (Suppl. 1) : 54—59.
- Cantley L. C. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. Science. 296 : 1655—1657.
- Cao C., Subhawong T., Albert J. M., Kim K. W., Geng L., Sekhar K. R., Gi Y. J., Lu B. 2006. Inhibition of mammalian target of rapamycin or apoptotic pathway induces autophagy and radiosensitizes PTEN null prostate cancer cells. Cancer Res. 66 : 10 040—10 047.
- Castino R., Fiorentino I., Cagnin M., Giovia A., Isidoro C. 2011. Chelation of lysosomal iron protects dopaminergic SH-SY5Y neuroblastoma cells from hydrogen peroxide toxicity by precluding autophagy and Akt dephosphorylation. Toxicol. Sci. 123 : 523—541.
- Chen Y., Azad M. B., Gibson S. B. 2009. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. Cell Death Differ. 16 : 1040—1052.
- Chen Y., Klionsky D. J. 2011. The regulation of autophagy — unanswered questions. J. Cell Sci. 124 : 161—170.

- Clarke P. G. 1990. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* 181 : 195—213.
- Codogno P., Meijer A. J. 2005. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ.* 12 : 1509—1518.
- Crighton D., Wilkinson S., O'Prey J., Syed N., Smith P., Harrison P. R., Gasco M., Garrone O., Crook T., Ryan K. M. 2006. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell.* 126 : 121—134.
- Criollo A., Vicencio J. M., Tasdemir E., Maiuri M. C., Lavandro S., Kroemer G. 2007. The inositol trisphosphate receptor in the control of autophagy. *Autophagy.* 3 : 350—353.
- Cuervo A. M., Dice J. F. 2000. Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J. Biol. Chem.* 275 : 31 505—31 513.
- Daido S., Kanzawa T., Yamamoto A., Takeuchi H., Kondo Y., Kondo S. 2004. Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res.* 64 : 4286—4293.
- Degtyarev M., De Maziere A., Orr C., Lin J., Lee B. B., Tien J. Y., Prior W. W., van Dijk S., Wu H., Gray D. C., Davis D. P., Stern H. M., Murray L. J., Hoeflich K. P., Klumperman J., Friedman L. S., Lin K. 2008. Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumors to lysosomotropic agents. *J. Cell Biol.* 183 : 101—116.
- Ding W. X., Ni H. M., Gao W., Hou Y. F., Melan M. A., Chen X., Stolz D. B., Shao Z. M., Yin X. M. 2007. Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *J. Biol. Chem.* 282 : 4702—4710.
- Donati A., Cavallini G., Paradiso C., Vittorini S., Pollera M., Gori Z., Bergamini E. 2001. Age-related changes in the regulation of autophagic proteolysis in rat isolated hepatocytes. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 56 : B288—B293.
- Efeyan A., Sabatini D. M. 2010. mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22 : 169—176.
- Egan D. F., Shackelford D. B., Mihaylova M. M., Gelino S., Kohnz R. A., Mair W., Vasquez D. S., Joshi A., Gwinn D. M., Taylor R., Asara J. M., Fitzpatrick J., Dillin A., Viollet B., Kundu M., Hansen M., Shaw R. J. 2011. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science.* 331 : 456—461.
- Eisenberg T., Knauer H., Schauer A., Buttner S., Ruckenstein C., Carmona-Gutierrez D., Ring J., Schroeder S., Magnes C., Antonacci L., Fussi H., Deszcz L., Hartl R., Schraml E., Criollo A., Megalou E., Weiskopf D., Laun P., Heeren G., Breitenbach M., Grubeck-Loebenstern B., Herker E., Fahrenkrog B., Frohlich K. U., Sinner F., Tavernarakis N., Minois N., Kroemer G., Madeo F. 2009. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nature Cell Biol.* 11 : 1305—1314.
- Eisenberg-Lerner A., Bialik S., Simon H. U., Kimchi A. 2009. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ.* 16 : 966—975.
- Feldman M. E., Apse B., Uotila A., Loewith R., Knight Z. A., Ruggero D., Shokat K. M. 2009. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol.* 7 : e38.
- Fu L., Kim Y. A., Wang X., Wu X., Yue P., Lonial S., Khuri F. R., Sun S. Y. 2009. Perifosine inhibits mammalian target of rapamycin signaling through facilitating degradation of major components in the mTOR axis and induces autophagy. *Cancer Res.* 69 : 8967—8976.
- Geisler S., Holmstrom K. M., Skujat D., Fiesel F. C., Rothfuss O. C., Kahle P. J., Springer W. 2010. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat. Cell Biol.* 12 : 119—131.
- Gonzalez P., Mader I., Tchoghandjian A., Enzenmuller S., Cristofanon S., Basit F., Debatin K. M., Fulda S. 2012. Impairment of lysosomal integrity by B10, a glycosylated derivative of betulinic acid, leads to lysosomal cell death and converts autophagy into a detrimental process. *Cell Death Differ.* 19 : 1337—1346.
- Gozuacik D., Kimchi A. 2004. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism (Review). *Oncogene.* 23 : 2891—2906.
- Guo P., Wang X. 2010. Rab GTPases act in sequential steps to regulate phagolysosome formation. *Small GTPases.* 1 : 170—173.
- Hamacher-Brady A., Brady N. R., Gottlieb R. A. 2006. The interplay between pro-death and pro-survival signaling pathways in myocardial ischemia/reperfusion injury: apoptosis meets autophagy. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 20 : 445—462.
- Han W., Pan H., Chen Y., Sun J., Wang Y., Li J., Ge W., Feng L., Lin X., Wang X., Wang X., Jin H. 2011. EGFR tyrosine kinase inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human lung cancer cells. *PLoS ONE.* 6 : e18691.
- Harrison D. E., Strong R., Sharp Z. D., Nelson J. F., Astle C. M., Flurkey K., Nadon N. L., Wilkinson J. E., Frenkel K., Carter C. S., Pahor M., Javors M. A., Fernandez E., Miller R. A. 2009. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature.* 460 : 392—395.
- Haspel J., Shaik R. S., Ifedigbo E., Nakahira K., Dolinay T., Englert J. A., Choi A. M. 2011. Characterization of macroautophagic flux in vivo using a leupeptin-based assay. *Autophagy.* 7 : 629—642.
- He C., Klionsky D. J. 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 43 : 67—93.
- Hsu K. F., Wu C. L., Huang S. C., Wu C. M., Hsiao J. R., Yo Y. T., Chen Y. H., Shiau A. L., Chou C. Y. 2009. Cathepsin L mediates resveratrol-induced autophagy and apoptotic cell death in cervical cancer cells. *Autophagy.* 5 : 451—460.
- Inbal B., Bialik S., Sabanay I., Shani G., Kimchi A. 2002. DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J. Cell Biol.* 157 : 455—468.
- Iwata J., Ezaki J., Komatsu M., Yokota S., Ueno T., Tanida I., Chiba T., Tanaka K., Kominami E. 2006. Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals. *J. Biol. Chem.* 281 : 4035—4041.
- Janen S. B., Chaachouay H., Richter-Landsberg C. 2010. Autophagy is activated by proteasomal inhibition and involved in aggresome clearance in cultured astrocytes. *Glia.* 58 : 1766—1774.
- Jia L., Dourmashkin R. R., Allen P. D., Gray A. B., Newland A. C., Kelsey S. M. 1997. Inhibition of autophagy abrogates tumour necrosis factor alpha induced apoptosis in human T-lymphoblastic leukaemic cells. *Br. J. Haematol.* 98 : 673—685.
- Juhász G. 2012. Interpretation of bafilomycin, pH neutralizing or protease inhibitor treatments in autophagic flux experiments: novel considerations. *Autophagy.* 8 : 1875—1876.
- Kapuy O., Vinod P. K., Mandl J., Banhegyi G. 2013. A cellular stress-directed bistable switch controls the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Mol. BioSyst.* 9 : 296—306.
- Kim J., Kundu M., Viollet B., Guan K. L. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biol.* 13 : 132—141.
- Kim P. K., Hailey D. W., Mullen R. T., Lippincott-Schwartz J. 2008. Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 105 : 20 567—20 574.
- Klionsky D. J., Cuervo A. M., Seglen P. O. 2007. Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy.* 3 : 181—206.
- Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E. S., Baehrecke E. H., Blagosklonny M. V., El-Deiry W. S., Golstein P., Green D. R., Hengartner M., Knight R. A., Kumar S., Lipton S. A., Malorni W., Nunez G., Peter M. E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B., Melino G. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 16 : 3—11.
- Kroemer G., Jaattela M. 2005. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat. Rev. Cancer.* 5 : 886—897.
- Kroemer G., Marino G., Levine B. 2010. Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell.* 40 : 280—293.
- Lamparska-Przybysz M., Gajkowska B., Motyl T. 2005. Cathepsins and bid are involved in the molecular switch between apoptosis and autophagy in breast cancer MCF-7 cells exposed to camptothecin. *J. Physiol. Pharmacol.* 56 (Suppl. 3) : 159—179.
- Lee I. H., Cao L., Mostoslavsky R., Lombard D. B., Liu J., Bruns N. E., Tsokos M., Alt F. W., Finkel T. 2008. A role for the

- NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 105 : 3374—3379.
- Lee J., Giordano S., Zhang J. 2012. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem. J.* 441 : 523—540.
- Lemasters J. J., Nieminen A. L., Qian T., Trost L. C., Elmore S. P., Nishimura Y., Crowe R. A., Cascio W. E., Bradham C. A., Brenner D. A., Herman B. 1998. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim. biophys. acta.* 1366 : 177—196.
- Levine B., Kroemer G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 132 : 27—42.
- Li D. D., Wang L. L., Deng R., Tang J., Shen Y., Guo J. F., Wang Y., Xia L. P., Feng G. K., Liu Q. Q., Huang W. L., Zeng Y. X., Zhu X. F. 2009. The pivotal role of c-Jun NH2-terminal kinase-mediated Beclin 1 expression during anticancer agents-induced autophagy in cancer cells. *Oncogene.* 28 : 886—898.
- Li L., Chen Y., Gibson S. B. 2012. Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cell Signal.* 25 : 50—65.
- Li X., Fan Z. 2010. The epidermal growth factor receptor antibody cetuximab induces autophagy in cancer cells by downregulating HIF-1 α and Bcl-2 and activating the beclin 1/hVps34 complex. *Cancer Res.* 70 : 5942—5952.
- Liang C. 2010. Negative regulation of autophagy. *Cell Death Differ.* 17 : 1807—1815.
- Liang X. H., Kleeman L. K., Jiang H. H., Gordon G., Goldman J. E., Berry G., Herman B., Levine B. 1998. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J. Virol.* 72 : 8586—8596.
- Liu J., Xia H., Kim M., Xu L., Li Y., Zhang L., Cai Y., Norberg H. V., Zhang T., Furuya T., Jin M., Zhu Z., Wang H., Yu J., Li Y., Hao Y., Choi A., Ke H., Ma D., Yuan J. 2011. Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell.* 147 : 223—234.
- Loos B., Engelbrecht A. M. 2009. Cell death: a dynamic response concept. *Autophagy.* 5 : 590—603.
- Loos B., Engelbrecht A. M., Lockshin R. A., Klionsky D. J., Zakeri Z. 2013. The variability of autophagy and cell death susceptibility. Unanswered questions. *Autophagy.* 9 : 1270—1285.
- Luiken J. J. E. P., Aerts J. M. F. G., Meijer A. J. 1996. The role of the intralysosomal pH in the control of autophagic proteolytic flux in rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 23 : 564—573.
- Lum J. J., Bauer D. E., Kong M., Harris M. H., Li C., Lindsten T., Thompson C. B. 2005. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell.* 120 : 237—248.
- Maiuri M. C., Ciriollo A., Kroemer G. 2010. Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome. *EMBO J.* 29 : 515—516.
- Maiuri M. C., Ciriollo A., Tasdemir E., Vicencio J. M., Tajeddine N., Hickman J. A., Geneste O., Kroemer G. 2007a. BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy.* 3 : 374—376.
- Maiuri M. C., Le Toumelin G., Ciriollo A., Rain J. C., Gautier F., Juin P., Tasdemir E., Pierron G., Troulinaki K., Tavernarakis N., Hickman J. A., Geneste O., Kroemer G. 2007b. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* 26 : 2527—2539.
- Malek M., Guillaumot P., Huber A. L., Lebeau J., Petrilli V., Kfoury A., Mikaelian I., Renno T., Manie S. N. 2012. LAMTOR1 depletion induces p53-dependent apoptosis via aberrant lysosomal activation. *Cell Death Dis.* 3 : e300.
- Malik S. A., Orhon I., Morselli E., Ciriollo A., Shen S., Marino G., BenYounes A., Benit P., Rustin P., Maiuri M. C., Kroemer G. 2011. BH3 mimetics activate multiple pro-autophagic pathways. *Oncogene.* 30 : 3918—3929.
- Maycotte P., Thorburn A. 2011. Autophagy and cancer therapy. *Cancer Biol. Ther.* 11 : 127—137.
- Mehrpour M., Esclatine A., Beau I., Codogno P. 2010. Autophagy in health and disease. 1. Regulation and significance of autophagy: an overview. *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* 298 : C776—C785.
- Meijer A. J., Codogno P. 2006. Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease. *Mol. Aspects Med.* 27 : 411—425.
- Menendez J. A., Vellon L., Oliveras-Ferraros C., Cufi S., Vazquez-Martin A. 2011. mTOR-regulated senescence and autophagy during reprogramming of somatic cells to pluripotency. A roadmap from energy metabolism to stem cell renewal and aging. *Cell Cycle.* 10 : 3658—3677.
- Mihaylova M. M., Shaw R. J. 2011. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat. Cell Biol.* 13 : 1016—1023.
- Mizushima N., Klionsky D. J. 2007. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 27 : 19—40.
- Mizushima N., Levine B., Cuervo A. M., Klionsky D. J. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 451 : 1069—1075.
- Mizushima N., Yamamoto A., Matsui M., Yoshimori T., Ohsumi Y. 2004. *In vivo* analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell.* 15 : 1101—1011.
- Mizushima N., Yoshimori T., Levine B. 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell.* 140 : 313—326.
- Moreau K., Rubinsztein D. C. 2012. The plasma membrane as a control center for autophagy. *Autophagy.* 8 : 861—863.
- Morselli E., Galluzzi L., Kepp O., Ciriollo A., Maiuri M. C., Tavernarakis N., Madeo F., Kroemer G. 2009. Autophagy mediates pharmacological lifespan extension by spermidine and resveratrol. *Aging (Albany NY).* 1 : 961—970.
- Morselli E., Maiuri M. C., Markaki M., Megalou E., Pasparaki A., Palikaras K., Ciriollo A., Galluzzi L., Malik S. A., Vitale I., Michaud M., Madeo F., Tavernarakis N., Kroemer G. 2010. Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell Death Dis.* 1 : e10.
- Motyl T., Gajkowska B., Zarzynska J., Gajewska M., Lamparska-Przybylska M. 2006. Apoptosis and autophagy in mammary gland remodeling and breast cancer chemotherapy (Conference Paper). *J. Physiol. Pharmacol.* 57 (Suppl.7) : 17—32.
- Muller S., Dennemärker J., Reinheckel T. 2012. Specific functions of lysosomal proteases in endocytic and autophagic pathways. *Biochim. biophys. acta.* 1824 : 34—43.
- Narendra D., Kane L. A., Hauser D. N., Fearnley I. M., Youle R. J. 2010. p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy.* 6 : 1090—1106.
- Novak I., Kirkin V., McEwan D. G., Zhang J., Wild P., Rozenk-nop A., Rogov V., Lohr F., Popovic D., Occhipinti A., Reichert A. S., Terzic J., Dotsch V., Ney P. A., Dikic I. 2010. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep.* 11 : 45—51.
- Nyfeler B., Bergman P., Triantafellow E., Wilson C. J., Zhu Y., Radetich B., Finan P. M., Klionsky D. J., Murphy L. O. 2011. Relieving autophagy and 4EBP1 from rapamycin resistance. *Mol. Cell Biol.* 31 : 2867—2876.
- Opipari A. W., Jr., Tan L., Boitano A. E., Sorenson D. R., Aurora A., Liu J. R. 2004. Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 64 : 696—703.
- Perrotta I., Carito V., Russo E., Tripepi S., Aquila S., Donato G. 2011. Macrophage autophagy and oxidative stress: an ultrastructural and immunoelectron microscopic study. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2011 : 282739.
- Pois C., Codogno P. 2011. Lysosome positioning coordinates mTORC1 activity and autophagy. *Nat. Cell Biol.* 13 : 342—344.
- Puri C., Renna M., Bento C. F., Moreau K., Rubinsztein D. C. 2013. Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. *Cell.* 154 : 1285—1299.
- Rajawat Y. S., Hilioti Z., Bossis I. 2009. Aging: central role for autophagy and the lysosomal degradative system. *Ageing Res. Rev.* 8 : 199—213.
- Ravikumar B., Sarkar S., Davies J., Futter M., Garcia-Arencibia M., Green-Thompson Z. W., Jimenez-Sanchez M., Korolchuk V., Lichtenberg M., Luo S., Massey D. C. O., Menzies F. M.,

- Moreau K., Narayanan U., Renna M., Siddiqi F. H., Underwood B. R., Winslow A. R., Rubinsztein D. C. 2010. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 90 : 1383—1435.
- Ravikumar B., Vacher C., Berger Z., Davies J. E., Luo S., Oroz L. G., Scaravilli F., Easton D. F., Duden R., O’Kane C. J., Rubinsztein D. C. 2004. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature Genet.* 36 : 585—595.
- Rovetta F., Stacchiotti A., Consiglia A., Cadeie M., Grigoletto P. G., Lavazzaf A., Rezzanic R., Aleo M. F. 2012. ER signaling regulation drives the switch between autophagy and apoptosis in NRK-52E cells exposed to cisplatin. *Exp. Cell Res.* 318 : 238—250.
- Rubinsztein D. C., Marino G., Kroemer G. 2011. Autophagy and aging. *Cell.* 146 : 682—695.
- Rubinsztein D. C., Shpilka T., Elazar Z. 2012. Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr. Biol.* 22 : R29—R34.
- Ruderman N. B., Xu X. J., Nelson L., Cacicedo J. M., Saha A. K., Lan F., Ido Y. 2010. AMPK and SIRT1 : a longstanding partnership? *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298 : E751—E760.
- Rusten T. E., Lindmo K., Juhasz G., Sass M., Seglen P. O., Brech A., Stenmark H. 2004. Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Develop. Cell.* 7 : 179—192.
- Salazar M., Carracedo A., Salanueva I. J., Hernandez-Tiedra S., Lorente M., Egia A., Vazquez P., Blazquez C., Torres S., Garcia S., Nowak J., Fimia G. M., Piacentini M., Cecconi F., Pandolfi P. P., Gonzalez-Feria L., Iovanna J. L., Guzman M., Boya P., Velasco G. 2009. Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J. Clin. Invest.* 119 : 1359—1372.
- Salminen A., Kaarniranta K. 2009. Regulation of the aging process by autophagy. *Trends Mol. Med.* 15 : 217—224.
- Samara C., Syntichaki P., Tavernarakis N. 2008. Autophagy is required for necrotic cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Differ.* 15 : 105—112.
- Sancak Y., Peterson T. R., Shaul Y. D., Lindquist R. A., Thoreen C. C., Bar-Peled L., Sabatini D. M. 2008. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science.* 320 : 1496—1501.
- Sandvig K., van Deurs B. 1992. Toxin-induced cell lysis: protection by 3-methyl-adenine and cycloheximide. *Exp. Cell Res.* 200 : 253—262.
- Sarkar S., Floto R. A., Berger Z., Imarisio S., Cordenier A., Pasco M., Cook L. J., Rubinsztein D. C. 2005. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J. Cell Biol.* 170 : 1101—1111.
- Sarkar S., Korolchuk V. I., Renna M., Imarisio S., Fleming A., Williams A., Garcia-Arencibia M., Rose C., Luo S., Underwood B. R., Kroemer G., O’Kane C. J., Rubinsztein D. C. 2011. Complex inhibitory effects of nitric oxide on autophagy. *Mol. Cell.* 43 : 19—32.
- Sarkar S., Ravikumar B., Floto R. A., Rubinsztein D. C. 2009. Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. *Cell Death Differ.* 16 : 46—56.
- Schellens J. P. M., Vreeling-Sindelárová H., Plomp P. J. A. M., Meijer A. J. 1988. Hepatic autophagy and intracellular ATP. A morphometric study. *Exp. Cell Res.* 177 : 103—108.
- Schneider P., Korolenko T. A., Busch U. 1997. A review of drug-induced lysosomal disorders of the liver in man and laboratory animals. *Microsc. Res. Tech.* 36 : 253—75.
- Schweers R. L., Zhang J., Randall M. S., Loyd M. R., Li W., Dorsey F. C., Kundu M., Opferman J. T., Cleveland J. L., Miller J. L., Ney P. A. 2007. NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 104 : 19 500—19 505.
- Seglen P. O., Gordon P. B. 1982. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 79 : 1889—1892.
- Settembre C., Zoncu R., Medina D. L., Vetrini F., Erdin S., Erdin S., Huynh T., Ferron M., Karsenty G., Vellard M. C., Facchinetti V., Sabatini D. M., Ballabio A. 2012. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J.* 31 : 1095—1108.
- Shaw J., Kirshenbaum L. A. 2008. The role of autophagy during ischemia/reperfusion. *Molecular regulation of autophagy and apoptosis during ischemic and non-ischemic cardiomyopathy.* *Autophagy.* 4 : 427—434.
- Shay J. W., Roninson I. B. 2004. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene.* 23 : 2919—2933.
- Shimizu S., Kanaseki T., Mizushima N., Mizuta T., Arakawa-Kobayashi S., Thompson C. B., Tsujimoto Y. 2004. Role of Bcl-2 family proteins in a nonapoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.* 6 : 1221—1228.
- Tanida I. 2011. Autophagy basics. *Microbiol. Immunol.* 55 : 1—11.
- Tasdemir E., Maiuri M. C., Galluzzi L., Vitale I., Djavaheri-Mergny M., D’Amelio M., Criollo A., Morselli E., Zhu C., Harper F., Nannmark U., Samara C., Pinton P., Vicencio J. M., Carnuccio R., Moll U. M., Madeo F., Paterlini-Brechot P., Rizzuto R., Szabadkai G., Pierron G., Blomgren K., Tavernarakis N., Codogno P., Cecconi F., Kroemer G. 2008. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat. Cell Biol.* 10 : 676—687.
- Terman A., Kurz T., Navratil M., Arriaga E. A., Brunk U. T. 2010. Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Antioxid. Redox Signal.* 12 : 503—535.
- Thoreen C. C., Kang S. A., Chang J. W., Liu Q., Zhang J., Gao Y., Reichling L. J., Sim T., Sabatini D. M., Gray N. S. 2009. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J. Biol. Chem.* 284 : 8023—8032.
- Uchiyama Y. 2001. Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsins. *Arch. Histol. Cytol.* 64 : 233—246.
- Vandenabeele P., Declercq W., Vanden Berghe T. 2008. Necrotic cell death and «necrostatins»: now we can control cellular explosion. *Trends Biochem. Sci.* 33 : 352—355.
- Verfaillie T., Salazar M., Velasco G., Agostinis P. 2010. Linking ER stress to autophagy: potential implications for cancer therapy. *Int. J. Cell Biol.* 2010 : 930509. doi : 10.1155/2010/930509.
- Wilkinson S., Ryan K. M. 2010. Autophagy: an adaptable modifier of tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 20 : 57—64.
- Williams A., Sarkar S., Cuddon P., Ttofi E. K., Saiki S., Siddiqi F. H., Jahreiss L., Fleming A., Pask D., Goldsmith P., O’Kane C. J., Floto R. A., Rubinsztein D. C. 2008. Novel targets for Huntington’s disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nature Chem. Biol.* 4 : 295—305.
- Wu Y. T., Tan H. L., Huang Q., Kim Y. S., Pan N., Ong W. Y., Liu Z. G., Ong C. N., Shen H. M. 2008. Autophagy plays a protective role during zVAD-induced necrotic cell death. *Autophagy.* 4 : 457—466.
- Yamamoto A., Tagawa Y., Yoshimori T., Moriyama Y., Masaki R., Tashiro Y. 1998. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct. Funct.* 23 : 33—42.
- Yoon Y. H., Cho K. S., Hwang J. J., Lee S. J., Choi J. A., Koh J. Y. 2010. Induction of lysosomal dilatation, arrested autophagy, and cell death by chloroquine in cultured ARPE-19 cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51 : 6030—6037.
- Yu C., Huang X., Xu Y., Li H., Su J., Zhong J., Kang J., Liu Y., Sun L. 2013. Lysosome dysfunction enhances oxidative stress-induced apoptosis through ubiquitinated protein accumulation in HeLa cells. *Anat. Rec. (Hoboken).* 296 : 31—39.
- Yu L., Leonardo M. J., Baehrecke E. H. 2004. Autophagy and caspases. *Cell Cycle.* 3 : 1124—1126.
- Yu L., McPhee C. K., Zheng L., Mardones G. A., Rong Y., Peng J., Mi N., Zhao Y., Liu Z., Wan F., Hailey D. W., Oorschot V., Klumperman J., Baehrecke E. H., Leonardo M. J. 2010. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature.* 465 : 942—946.

REPARATIVE AUTOPHAGY AND AUTOPHAGY DEATH OF CELLS. FUNCTIONAL
AND REGULATORY ASPECTS*A. B. Pupyshv*Novosibirsk State Medical University;
e-mail: apupyshv@mail.ru

Molecular regulation of reparative/homeostatic autophagy induced by failure of vital resources and by cellular stress is considered. Extensive autophagy regulatory apparatus responds to starvation, insufficiency of growth factors and energy supply, accumulation of unfolded proteins (ER stress), reactive oxygen species, microbial invasion. Central sensor of the regulation is kinase mTOR. Part of the mTOR pool presented in lysosomes responds to the local level of amino acids and is able to induce autophagy under low rates of intralysosomal proteolysis. Autophagy is a self-regulated cell process, the peak of autophagy is followed by its regulatory weakening by amino acids formed in autophagolysosomes. Protective effect of autophagy is associated mainly with removal of permeabilized mitochondria generating ROS, and elimination of abnormally folded proteins. Autophagy has optimum of its activity: its deficiency leads to accelerated cellular aging, and the excessive autophagy brings to the deficiency of cellular survival resources and cell death. Autophagy cell death seems like a hyper-stimulated self-eating of the cell, but more probably that excessive autophagy disturbs cellular energy supply and switches on some specific cell death signalization (possibly associated with kinases c-Jun, DRP-1, PI3K class I etc.). Some approaches to use reparative autophagy for prevention of cell degeneration are considered.

Key words: autophagy, cellular stress, autophagosomes, autophagolysosomes, lysosomes, cell survival, cell death.
