

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**AUTOFAGIJA I TUMORI**

**AUTOPHAGY AND TUMORS**

**SEMINARSKI RAD**

Lara Lucija Paparić

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: Prof.dr.sc. Nada Oršolić

Zagreb, 2017.

# SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
2. AUTOFAGIJA SUPRIMIRA TUMORE .....	2
2.1.Uloga <i>beclin1</i> gena u supresiji tumora .....	2
2.2. Autofagija sprječava nekrozu .....	3
2.3. Autofagija potiče senescenciju .....	4
3. AUTOFAGIJA POTIČE NASTANAK TUMORA .....	5
3.1. Autofagija potiče preživljavanje tumorskih stanica u uvjetima gladovanja i hipoksije .....	5
3.2. Nedostatak autofagije može suprimirati tumore .....	6
3.3. Tumori uzrokovani RAS mutacijama ovisni su o autofagiji .....	7
4. AUTOFAGIJA I ANTITUMORSKE TERAPIJE.....	7
5. ZAKLJUČAK .....	8
6. LITERATURA .....	9
7. SAŽETAK .....	11
8. SUMMARY .....	12

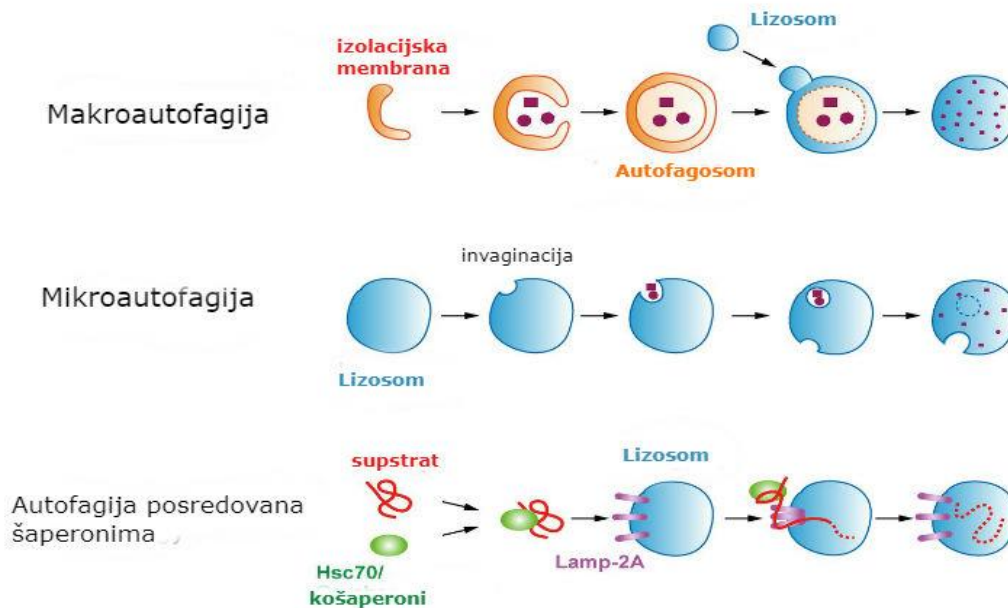
## UVOD

Autofagija (od grčkog *auto-* = sam + *phagein* = jesti) još zvana i drugim tipom programirane stanične smrti je katabolički proces u kojem stanica razgrađuje vlastite organele i proteine unutar lizosoma. Iako se prvo vjerovalo da je to nasumičan i razarajući proces, ustanovljeno je da je autofagija visoko konzervirana i genetički kontrolirana te da ima bitnu ulogu u organizmu. Neke od njenih mnogobrojnih uloga su održavanje homeostaze, uklanjanje oštećenih organela i proteina iz stanice, pribavljanje energije u uvjetima gladovanja i mnoge druge (Degenhardt i sur. 2006).

Autofagiju se može podijeliti na tri tipa: makroautofagiju, mikroautofagiju i autofagiju posredovana šaperonima (Slika 1.) Glavna karakteristika makroautofagije je stvaranje autofagosoma, vezikule s dvostrukom membranom koja obavija organel te fuzijom s lizosomom potiče njegovu razgradnju. S druge strane, u mikroautofagiji citosolni materijal direktno ulazi u lizosom invaginacijom njegove membrane. Autofagija posredovana šaperonima djeluje na razgradnju proteina. Naime, protein se veže na šaperon koji se onda veže na receptor na membrani lizosoma (LAMP-2A) i dolazi do ulaska proteina u lizosom. Dok makro- i mikroautofagija mogu, ali ne moraju biti regulirani procesi, autofagija posredovana šaperonima, visoko je reguliran i kontroliran proces (Glick i sur. 2010).

Atg (engl. *Autophagy-related genes*) geni su geni povezani s autofagijom te su neki od njih visoko konzervirani u različiti organizmima, uključujući biljke i sisavce. Takva konzerviranost gena govori o važnosti autofagije kod gotovo svih organizama. Regulacija autofagije i njenih gena vrlo je kompleksan mehanizam koji uključuje brojne gene i djeluje na različite načine te se još u potpunosti nije istražio, iako je glavna tema sve većeg broja radova.

Uloga autofagije na tumore je dvojaka. S jedne strane održava tumorske stanice na način da im olakšava prilagodbu na stres istim mehanizmom kao i u zdravoj stanici, dok s druge strane ima tumor supresorsku ulogu jer smanjuje nekrozu i kroničnu upalu (Degenhardt i sur. 2006, Karantza-Wadsworth i sur. 2007). Autofagija, također, djeluje i na starenje stanica koje ima ulogu u sprječavanju rasta tumora (Young i sur. 2009). Hoće li proces autofagije poticati ili suprimirati stvaranje tumora vjerojatno ovisi o vrsti zahvaćene stanice te o stadiju napretka tumora (Glick i sur. 2010).



**Slika 1.** Tri tipa autofagije (preuzeto i prilagođeno od: Okamoto, 2014. *The Journal of Cell Biology* 205, 435)

## 2. AUTOFAGIJA SUPRIMIRA TUMORE

### 2.1. Uloga *beclin1* gena u supresiji tumora

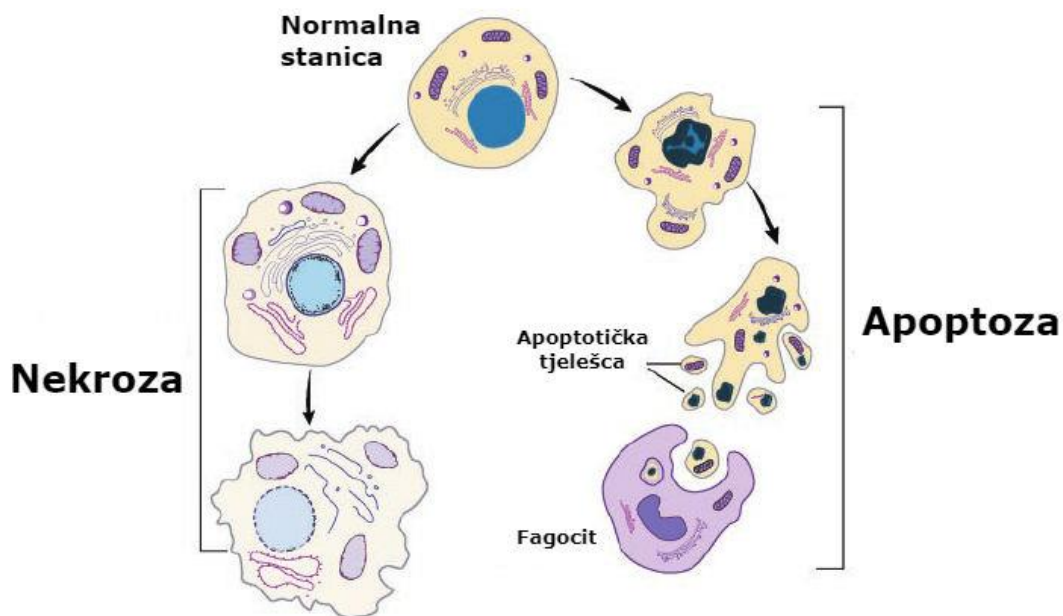
Gen *beclin1* kodira za Beclin1 protein koji je neophodan za formaciju autofagosoma. U raznim tumorskim linijama je uočena monoalelska delecija *beclin1* gena dok pojačana ekspresija Beclin1 proteina u nekim staničnim linijama može inhibirati nastanak tumora. Pokusi na miševima pokazali su da *beclin1*<sup>-/-</sup> miševi umiru rano u embriogenezi dok *beclin1*<sup>+/-</sup> miševi pokazuju povećan rizik od limfoma i karcinoma pluća i jetre te u tkivu dojke pokazuju hiperproliferativne promjene i promjene koje prethode formaciji tumora. Tumori nastali u *beclin1*<sup>+/-</sup> miševima pokazuju divlji tip *beclin1* mRNA i proteina što se može protumačiti na način da je *beclin1* haploinsuficijentan tumorski supresor (Karantza-Wadsworth i sur. 2007). Međutim, daljnja istraživanja su dovela u pitanje ulogu autofagije u supresiji tumora pomoću *beclin1* gena. Naime, uloga Beclin1 proteina u supresiji mogla biti neovisna o samoj

autofagiji. U prilog toj teoriji ide činjenica da se gen za Beclin1 protein nalazi u neposrednoj blizini gena za BRCA1 protein. Poznato je da određene vrste tumora nastaju zbog pogrešne mutacije u genu za BRCA1 što može ili ne mora uključivati deleciju *beclin1* gena (White 2015).

## **2.2. Autofagija spriječava nekrozu**

Nekroza je jedan od načina smrti stanica, a vezana je uz fizičke ozljede i potiče upalni odgovor (Degenhardti sur. 2006). Jedna od uloga upalnog odgovora je poticanje angiogeneze koja povećava dotok krvi u stanice, a time i dovoljne količine kisika i hranjivih tvari. U slučaju tumora, nekroza poticanjem upale i angiogeneze omogućava tumorskim stanicama povoljne uvjete za proliferaciju (Sato i sur. 2007).

Budući da ne potiče upalni odgovor, apoptoza je poželjniji način stanične smrti za epitelne stanice nakon oštećenja ili stresa (Degenhardti sur. 2006). Apoptoza je visoko reguliran tip stanične smrti koji održava homeostazu normalnog tkiva na način da eliminira nepotrebne ili neželjene stanice. U stresnim uvjetima koji prethode formiranju tumora aktivira se apoptoza i uništava potencijalno štetne stanice. S obzirom na to, inaktivacija apoptoze je jedan od ključnih događaja koji omogućuje razvoj tumora (Hassan i sur. 2014). Ukoliko je apoptoza inaktivirana, autofagija može kraćim djelovanjem uspostaviti normalne uvjete u stanicama ili dužim djelovanjem dovesti do smrti stanica bez aktiviranja upalnog odgovora. Također, gašenje autofagije u tumorima koji imaju inaktiviranu apoptozu, u uvjetima stresa dovodi do preusmjerenja na alternativni put stanične smrti – nekrozu. Takvi rezultati pokazuju da autofagija i apoptoza reguliraju nekrozu i tako otežavaju nastanak i održavanje tumora. S obzirom na to, autofagija bi se mogla koristiti u terapijske svrhe za liječenje tumora na način da izaziva ciljanu smrt stanica tumora ili kao regulator nekroze (Degenhardti sur. 2006).



**Slika 2.** Shema nekroze i apoptoze (preuzeto i prilagođeno od: Saikumar i sur. 1999. *The American Journal of Medicine* **107**, 489-506)

### 2.3. Autofagija potiče senescenciju

Stanična senescencija je stanje stanice s aktivnim metabolizmom i stabilno utišanim staničnim ciklusom koje može sprječavati ozbiljne posljedice prouzročene raznim oštećenjima. Stanična senescencija je najčešće kasni odgovor na stres i uključuje više efektorskih mehanizama koji ovise o poticaju i staničnoj liniji. Neki od tih mehanizama su epigenetska regulacija, odgovor posredovan oštećenjem DNA i senescencijom posredovan sekrecijski fenotip. Budući da djeluje inhibitorno na stanični ciklus, senescencija inducirana onkogenom (OIS, od engl. *oncogene-induced senescence*) ima tumor supresijsku ulogu pri čemu epigenetske promjene igraju važnu ulogu (Young i sur. 2009).

Autofagija ima dvojako djelovanje na senescenciju. Dok bazalna, selektivna autofagija djeluje kao antisenescencijski mehanizam, opća autofagija promovira senescenciju (Kang i Elledge 2016).

Otkriveno je da je OIS povezan s gubitkom proteina jezgrine ovojnice (NE, od engl. *nuclear envelope*) u koje spadaju proteini lamine i proteini pridruženi unutarnjoj jezgrinoj membrani. Za gubitak tih proteina upravo je zaslužna autofagija (Lenain i sur. 2015) što ukazuje na njenu ulogu u poticanju senescencije inducirane onkogenom te moguću neposrednu ulogu u supresiji tumora.

### **3. AUTOFAGIJA POTIČE NASTANAK TUMORA**

#### **3.1. Autofagija potiče preživljavanje tumorskih stanica u uvjetima gladovanja i hipoksije**

U nekim lokalno razvijenim tumorima poremećene su strukturne i funkcionalne uloge njihove mikrovaskulature pa imaju sustavno smanjenu razinu glukoze i kisika koja onemogućava proliferaciju tumorskih stanica. Također, u nekim je malignim tumorima uočen smanjen broj krvnih žila. Takve tumorske stanice za održavanje i proliferaciju imaju alternativan izvor kisika i nutrijenata što potvrđuje činjenica da su neke tumorske stanične linije otporne na uvjete gladovanja.

Dokazano je da autofagija može izravno djelovati na preživljavanje tumorskih stanica u uvjetima gladovanja iako stanice ne ovise o njoj u uvjetima normalne dostupnosti hranjivih tvari. Naime, u uvjetima manjka glukoze ili aminokiselina fosforilira se i aktivira AMPK koja onda potiče aktivaciju autofagije. Budući da se u različitim tumorskim linijama razlikuju biološke karakteristike i mikrookoliš, uloga autofagije kao alternativnog izvora hranjivih tvari može varirati u različitim tumorskim linijama (Sato i sur. 2007).

Također, i uvjeti manjka kisika potiču autofagiju te je koriste kao mehanizam prilagodbe na hipoksični stres. Ukoliko je tumorskoj stanici smanjen pristup kisiku uzrokovan manjkom krvnih žila ili inhibicijom angiogeneze, u njoj će se aktivirati proces autofagije i omogućiti prilagodbu na stres. Mehanizam aktiviranja autofagije ovisi o duljini izlaganja i razini hipoksije. Takve rezultate potvrđuje činjenica da su se metode liječenja tumora ograničavanjem angiogeneze pokazale neefikasnim u kasnijim stadijima primjene. Međutim, ta bi se terapijska metoda mogla pospješiti kombinacijom inhibicije angiogeneze i autofagije (Hu i sur. 2012).

#### **3.2. Nedostatak autofagije može suprimirati tumore**

Kao i u normalnim stanicama, autofagija u tumorskim stanicama održava stanične funkcije i potiče preživljavanje u uvjetima stresa. To svojstvo može biti pogodno za stvaranje i opstanak tumora, međutim autofagija u uvjetima stresa može djelovati i na smanjenje oštećenja u DNA te tako djelovati inhibitorno na nastanak tumora.

Normalne stanice s neispravnom autofagijom nakupljaju ubikvitinirane i oštećene proteine koji potiču razgradnjustanica dok tumorske stanice s defektnom autofagijom pokazuju povišenu razinu oštećene DNA. U stanicama s neispravnom autofagijom smanjena je prilagodba na stres što može rezultirati manjkom ATP-a i oštećenim mitohondrijima s viškom reaktivnih oblika kisika (ROS, od engl. *reactive oxygen species*). Ograničavajuće količine ATP-a te ROS-ovi mogu proizvesti replikacijski stres i aktivaciju mehanizma za popravak DNA što uzrokuje zastoj u replikaciji te apoptozu i tako inhibira ranu tumorsku aktivnost.

Da bi gubitak autofagije mogao djelovati poticajno na nastanak tumora potrebna je inaktivacija p53 proteina koji inhibira stanični ciklus. Naime stanice s defektnom autofagijom i p53 proteinom ne odlaze u apoptozu već nakupljaju oštećenja u DNA te tako stvaraju povoljne uvjete za razvoj tumora.

Amplifikacija gena je česta pojava kod solidnih tumora, a uzrokuju je dvolančani lomovi u DNA kod stanica s defektnom regulacijom staničnog ciklusa. Defektna autofagija u kombinaciji s defektnim p53 proteinom bez obzira na uzrok defektnosti ili tip stanice može uzrokovati genomsku nestabilnost u obliku amplifikacije gena kao odgovor na metabolički i replikativni stres te tako promovirati tumorski fenotip.

Ova bi se saznanja mogla primjeniti u razvoju novih terapijskih pristupa. Tumorske stanice s defektnom autofagijom, a normalnom apoptozom i p53 proteinom osjetljive su na tvari koje potiču metabolički stres kao npr. tvari za poticanje oštećenja DNA. Takve bi se tvari moglo koristiti u terapijske svrhe za liječenje tumora, a veća bi se učinkovitost postigla kombinacijom tvari koje na različit način suprimiraju tumore. S druge strane, takve bi tvari pojačale tumorski fenotim u tumorskim stanicama kojima su i autofagija i apoptoza defektne (Karantza-Wadsworth i sur. 2007).

### **3.3. Tumori uzrokovani RAS mutacijama ovisni su o autofagiji**

RAS proteini su članovi obitelji malih GTP-aza koje su ključne za provođenje staničnih signala potaknutih izvanstaničnim faktorima. Onkogene mutacije RAS-a nađene su u gotovo



30% ljudskih karcinoma. Neke od karakteristika RAS mutacija su proliferacija, visoka stopa preživljenja, migracija, invazija te promjeneu diferencijaciji koje potiču nastajanje i progresiju tumora (Lock i sur. 2014).

Tumori nastali RAS mutacijama pokazuju visoku razinu autofagije koja promovira njihov rast, preživljavanje, invaziju i metastaziranje(White 2015). Mehanizam kojim autofagija djeluje na tumore nastale RAS mutacijama razlikuju se ovisno o vrsti tumora, a jedan od temeljnih mehanizama bazira se na održavanju mitohondrija i njegove funkcije u svrhu ostvarivanja metaboličkih potreba tumora. Ukoliko se ugase geni esencijalni za autofagiju u takvim tumorima, dolazi do nakupljanja neispravnih mitohondrija, smanjuju se normalne razine ciklusa limunske kiseline i respiracije što dovodi do metaboličkog stresa i u konačnici rezultirata staničnom smrću (Guo i sur. 2013).

## **4. AUTOFAGIJA I ANTITUMORSKE TERAPIJE**

Mnogi antitumorski lijekovi kao i ionsko zračenje djeluju na autofagiju, dapače, ne postoje trenutno poznati antitumorski terapeutici koji nemaju nikakvog utjecaja na autofagiju. Iako neke tvari djeluju inhibitoryno, većina ipak promovira autofagiju, dok neke tvari imaju dvojako djelovanje. U većini slučajeva mehanizmi djelovanja na autofagiju i dalje nisu poznati te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se moglo selektivno i sustavno djelovati na autofagiju. Nadalje, djelovanje autofagije na terapiju također može biti dvojako. S jedne strane autofagija može štiti tumore od terapije i smanjivati terapijsku učinkovitost, dok je u drugim slučajevima nužna za antitumorske učinke terapeutika. Osim toga, mnoga su istraživanja pokazala da autofagija može djelovati na otpuštanje signala u stanicama te tako utjecati na otpornost susjednih stanica na terapeutike.

Lijekovi kojima se može djelovati na autofagiju nisu savršeni i postoji potreba za provjerom njihovog djelovanja, međutim, to je vrlo teško za dokučiti u živom organizmu. Potencijalna rješenja za taj problem pružaju imunocitokemijska provjera uzorka biopsije na neki protein povezan s autofagijom ili traženje autofagosoma i autolizomsoma elektronskom mikroskopijom. Ni jedna od tih metoda ne može precizno odrediti je li došlo do inhibicije autofagije i u kojoj mjeri pa postoji potreba za razvitkom novih metoda (Thorburn i sur. 2014).

## 5. ZAKLJUČAK

Autofagija igra bitnu ulogu u nastanku i razvitku tumora (Glick i sur. 2010, Degenhardt i sur. 2006). Može imati tumor supresorsku ulogu ukoliko sprječava upalni odgovor nastao nekrozom (Degenhardt i sur. 2006, Sato i sur. 2007, Hassan i sur. 2014) ili poticanjem senescencije (Young i sur. 2009, Lenain i sur. 2015). S druge strane autofagija može poticati tumorske stanice pružajući im alternativni izvor kisika i nutrijenata u hipovaskularnim uvjetima (Sato i sur. 2007, Hu i sur. 2012). Osim toga, smanjenjem oštećenja nastalih stresom sprječava aktivaciju mehanizma popravka DNA i na taj način potiče tumorsku aktivnost (Karantza-Wadsworth i sur. 2007). Hoće li autofagija poticati ili suprimirati tumore ovisi o vrsti tumora te stadiju razvoja (Glick i sur. 2010). Utjecaj autofagije na terapiju i terapeutika na autofagiju nije dovoljno poznato i potrebna su daljnja istraživanja na tom području kako bi se moglo ciljano i učinkovito djelovati na autofagiju u slučajevima gdje promovira tumore ili iskoristiti je kao terapeutsko sredstvo u slučajevima gdje inhibira tumorsku aktivnost (Thorburn i sur. 2014).

## 6. LITERATURA

Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson KL, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gélinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E, 2006. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation and tumorigenesis. *Cancer Cell* **10**, 51– 64.

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

Guo JY, Xia B, White E, 2013. Autophagy-mediated tumor promotion. *Cell Press* **155**, 1216–1219.

Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N, 2014. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Research International* vol. 2014, Article ID 150845, 23 pages

Hu Y-L, DeLay M, Jahangiri A, Molinaro AM, Rose SD, Carbonell WS, Aghi MK, 2012. Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma. *Cancer Research* **72**, 1773–83.

Kang C, Elledge SJ, 2016. How autophagy both activates and inhibits cellular senescence. *Autophagy***12**, 898-99.

Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, White E, 2007. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes & Development***21**,1621–1635.

Lenain C, Gussyatiner O, Douma S, van den Broek B, Peeper DS, 2015. Autophagy-mediated degradation of nuclear envelope proteins during oncogene-induced senescence. *Carcinogenesis***36**, 1263-74.

Rebecca L, Candia MK, Andrew ML, Eduardo S, Jayanta D, 2014. Autophagy dependent production of secreted factors facilitates oncogenic RAS-driven invasion. *Cancer Discovery***4**, 466-479.

Sato K, Tsuchihara K, Fujii S, Sugiyama M, Goya T, Atomi Y, Ueno T, Ochiai A, Esumi H, 2007. Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. *Cancer Research***67**,9677–84.

Thorburn A, Douglas HT, Daniel LG, 2014. Autophagy and cancer therapy. *Molecular Pharmacology* **85**,830-838.

White E, 2015. The role for autophagy in cancer. *The Journal of Clinical Investigation* **125**,42-46.

Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, Tavaré S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM, Narita M, 2009. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes & Development***23**,798–803.

## 7. SAŽETAK

Autofagija je katabolički proces u kojem stanica razgrađuje vlastite organele i proteine unutar lizosoma. Ovaj je proces bitan za očuvanje normalne fiziologije stanica u uvjetima stresa što uključuje uklanjanje oštećenih proteina i organela te pribavljanje alternativnog izvora energije u uvjetima gladovanja. Osim toga, autofagija ima bitnu ulogu u nastanku i razvitku tumora. Hoće li autofagija suprimirati tumore ili ih poticati ovisi o vrsti i stadiju napretka tumora. Do nedavno se smatralo da Beclin1, esencijalan protein za autofagiju, ima važnu ulogu u suprimiranju tumora, regulirajući autofagiju, međutim, ta je njegova uloga dovedena u pitanje novim istraživanjima. Autofagija može djelovati tumor supresijski na način da sprječava nekrozu koja potiče upalni odgovor, a time i proliferaciju stanica. Također može imati ulogu i u nastanku senescencije inducirane onkogenom te na taj način inhibira proliferaciju i tumorsku aktivnost.

S druge strane, autofagija može poticati nastanak tumora na način da omogućava proliferaciju u uvjetima manjka kisika i nutrijenata ili sprječavanjem aktivacije mehanizma za popravak DNA. Tumori nastali RAS mutacijama u potpunosti su ovisni o autofagiji i ne preživljavaju ukoliko je inaktivirana.

Gotovo sve danas poznate antitumorske terapije utječu na autofagiju. Neke je potiču, a neke inhibiraju. Također, autofagija djeluje na terapiju pospješujući je ili stvarajući otpornost tumorskih stanica. Točni mehanizmi djelovanja terapeutika na autofagiju i obrnuto još nisu poznati i potrebna su daljnja istraživanja na tu temu kako bi se moglo ciljano i učinkovito djelovati na autofagiju ili je koristiti kao oružje u borbi protiv tumora.

## **8. SUMMARY**

Autophagy is a catabolic process in which the cell digests its own organelles and proteins within the lysosome. This process is crucial for the maintenance of normal physiology in stress which includes the removal of defect proteins and organelles and the provision of an alternative energy source in starvation. Additionally, autophagy has a crucial role in tumorigenesis. Whether the role of autophagy is to suppress or to increase tumor activity depends on the cell type and/or stage.

Until recently it was believed that the Beclin1 protein, which is essential for autophagy, has a crucial role in tumor suppression by regulating autophagy. However, new findings called this into question. Autophagy can have a tumor suppressive role by inhibiting necrosis which causes inflammation and cell proliferation. Further, it can also have a role in oncogene-induced senescence and in such way inhibit proliferation and tumorigenesis. On the other hand, autophagy can promote tumorigenesis by enabling proliferation in conditions of starvation and low oxygen or by inhibiting of the DNA repair mechanism. RAS induced tumor cells are autophagy dependent and can not survive without autophagy. Almost every known anticancer agent affects autophagy. Some of them increase autophagy, while others inhibit it. Further, autophagy can affect the therapy both positive and negative.

The exact mechanisms by which therapy affects autophagy and inversely are yet not known and further research is needed in this area. This is important because better understanding of those mechanisms may provide a way to selectively interfere with autophagy or to its use in therapy.