

## Otofaji ve Sinyal Yolakları

Devrim GÖZÜAÇIK

Sabancı Üniversitesi, Biyolojik Bilimler ve Biyomühendislik Programı, İstanbul.

dgozuacik@sabanciuniv.edu

### PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ

Programlı hücre ölümü fizyolojik ve evrimsel olarak korunmuş bir süreç olup, özellikle çok hücreli organizmalarda embriyolojik gelişim, doku sağlığı ve patojenlere karşı savunma gibi birçok yaşamsal olayda önemlidir. 1972 de yayınladıkları makalede, Kerr, Wyllie ve Currie, iki hücre ölümü türünden bahsederler; apoptoz, genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümü ve nekroz, programlanmamış ve kazara olan hücre ölümü (Kerr et al. 1972). Takip eden 30 yılda, "apoptoz" terimi programlı hücre ölümünü tanımlamak için genel terim olarak kullanılıp, oluşumunun ardındaki moleküler mekanizma konusunda çok miktarda bilgi toplanmıştır. Apoptoz ve nekroz kavramlarının biyoloji camiasında yarattığı heyecan nedeniyle öne çıkması, apoptotik olmayan alternatif hücre ölüm mekanizmalarının varlığının bilim dünyasının büyük bölümü tarafından göz ardı edilmesine neden olmuştur.

Son yıllarda, moleküler biyoloji alanında bilgi dağarcığının giderek genişlemesi ve apoptoz araştırmalarının artık bir doygunluğa ulaşması nedeniyle, alternatif programlı hücre ölüm yollarına olan ilgi artmıştır. Alternatif programlı hücre ölüm mekanizmalarından biri olan otofajik hücre ölümüne ilgi, maya otofaji genlerinin memeli karşılıklarının bulunması ve çalışmaların morfolojik tanımlardan moleküler düzeye inmeye başlaması sayesinde artmış, sonuç olarak, otofaji, apoptoza ek veya alternatif olarak düşünülen temel yollardan birisi haline gelmiştir.

Bu makalede, otofaji ve otofajik hücre ölümünün morfolojik ve moleküler temelleri ve, apoptotik yollarla ilişkisi tanımlanacaktır. Bu konudaki temel problemlerden biri otofajinin katabolik ve yaşamsal rolleri ile hücre ölümündeki özelliklerini bir araya getirmektir. Bu yazıda bu konu son gelişmeler ışığında anlatılacaktır.

## PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ MORFOLOJİLERİNİN TANIMLANMASI

Schwartz ve Merker'in ilk çalışmalarını (Schwartz ve Merker, 1973) tekrar inceleyen 1990 tarihli makalesinde Clarke, doğal gelişimsel hücre ölümü ve toksin uygulanması sonrası oluşan hücre ölümünün temel 3 hücre morfolojisinden bahsetmiştir (Clarke, 1990). Clarke, apoptozu tip I hücre ölümü olarak tanımlamıştır. Bu tip hücre ölümü, hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması, çekirdek içinde bulunan DNA'nın bozulması ve "apoptotik cisimlerin" parçalara ayrılması özellikleriyle ayırt edilmektedir.

Kaspazlar, bu tip hücre ölümünün önemli birer aracı olup, hücrede gözlemlenen birçok morfolojik değişiklik, hücre yaşamı için önemli proteinlerin bu sistemin proteazlar tarafından kesilmesine bağlanmıştır. Bu apoptotik cisimlerin son durakları fagositlerin lizozomları veya heterofagositoz sonrası komşu hücrelerin lizozomlarıdır.

Otofajik hücre ölümü Clarke tarafından tip II hücre ölümü olarak sınıflandırılmıştır. Bu tip hücre ölümünde en belirgin morfolojik değişiklik, sitoplazmada oluşan iki veya daha fazla katmanlı zarla çevrili, sitoplazma parçaları ve/ya mitokondri, endoplazmik retikulum (ER) gibi organelleri içeren veziküllerin varlığıdır. Bu veziküller lizozoma kaynaşır, içlerinde taşıdıkları yüklerinin lizozomal enzimler tarafından parçalanmasını sağlarlar. Bu biyolojik olay, kendini içten içe yemek anlamında, "otofaji" olarak adlandırılmıştır. Yoğun otofaji görülen bu hücrelerde, apoptozdan farklı bir ölüm gözlenmesine karşın, otofajinin bu ölümden rol oynayıp oynamadığı konusu hala yoğun bir şekilde tartışılmaktadır. Çoğu araştırmacının üzerinde birleştiği fikir, apoptozun mümkün olmadığı durumlarda, uyarıcının türü, uzunluğu ve miktarı gibi değişkenlere bağlı olarak, otofaji hücre ölümüne yol açmaktadır. Fakat, apoptozla ölebilen hücrelerde otofajik hücre ölümü konusu hala bazı araştırmacılar tarafından şüpheli karşılanmaktadır. Hücrenin kendini içten içe yemesinin hücre ölümüne nasıl yol açtığı konusu, bilimsel veriler ışığında, aşağıda ayrıntılı olarak ele alınacaktır.

Clarke tanımladığı otofajik hücre ölümünde kromatin yoğunlaşması gibi çekirdeğe özgü değişiklikler, otofajik hücre ölümünde, apoptotik hücre ölümünden çok daha

sonra olmaktadır. Ölüm kaspaz etkinliğine bağımlı olmadığından, ne DNA merdivenleri ne de apoptotik cisim oluşması gözlenmektedir. Ayrıca, otofajide ölü hücrelerin fagositoz tarafından temizlenmesi apoptozda görüldüğünden çok daha sonra ve çok daha rastgele bir biçimde olmaktadır.

Clarke'ın tanımına göre Tip III hücre ölümü, lizozomal olmayan hücre ölümü, hücre ölümleri arasında en az çalışılan türdür ve bu yazının konusu dışındadır.

Bazı dokularda ve belirli koşullarda, yukarıda belirtilen hücre ölümü morfolojilerinin birkaç tipi aynı hücrede görülebilmektedir. Bu gözlem , birden fazla hücre ölüm mekanizmasının aynı uyarın tarafından, aynı hücrede etkinleştirilebileceğine işaret etmektedir.

## **OTOFAJİK HÜCRE ÖLÜMÜ**

Çeşitli organizmaların hücre ve dokularında yapılan morfolojik analizler, gelişim sırasında ölen hücrelerde artan otofajik etkinliğin artmış olduğunu ortaya çıkarmıştır. Buna böceklerde metamorfoz, kuşlardaki kanat çıkıntısı morfolojisi ve memelilerde damak kapanması da dahildir (Bursch, 2001; Clarke, 1990; Schweichel ve Merker, 1973). Bazı toksinler de otofajik hücre ölümü özelliklerine sahip hücre ölümüne yol açabilir (Schweichel ve Merker, 1973). Her ne kadar bu çalışmalarda otofajik aktivite ve hücre ölümü arasındaki nedensel bağ gösterilemese de, bu tarz morfolojik araştırmalar otofajinin hücre ölümündeki rolünün daha ayrıntılı çalışılmasına yol açmıştır.

3-MA, wortmannin ve LY294002 gibi kimyasalların otofajiyi baskıladığının keşfedilmesi, otofajik hücre ölümünün analizinde bir dönüm noktası olmuştur (Blommaert et al., 1997; Seglen ve Gordon, 1982). Farklı hücre tipleri ve farklı uyarıcılar kullanan birbirinden bağımsız grupların çalışmaları, otofajik vesiküller oluşturarak ve lizozomal aktiviteyi arttırarak ilerleyen ve yukarıda sıralanan kimyasallar tarafından baskılanabilen ve kaspazlardan bağımsız bir hücre ölümü varlığını göstermiştir. MCF-7 meme kanseri hücrelerinin estrogen reseptör antagonisti tamoksifen tarafından tetiklenen ölümü (Bursch et al., 1996), lösemi

hücrelerinin TNF- $\alpha$ 'ya bağılı ölümleri (Jia et al., 1997), mide ve gliom hücrelerinin aktive olmuş Ras tarafından öldürülmesi (Chi et al., 1999) ve sinir hücrelerinin büyüme faktörü eksikliğinden dolayı ölümleri (Xue et al., 1999), bu tür çalışmalara örnek gösterilebilir. Araştırmalarda kullanılan çoğu kimyasal madde gibi, otofaji baskılayıcıların da hücreyel yan etkileri görülmüştür. En yaygın kullanılan otofaji baskılayıcısı 3-MA bile, otofaji çalışmalarında kullanılan optimum doz aralığında kullanıldığında otofajiyi baskılamayla sonuçlanan 3. Tip PI3-kinazları baskılama ana etkisi yanında, JNK ve p38 stres proteinlerini de baskılamış, (Xue et al., 1999), mitokondiri geçirgenliğini etkilemiş (Xue et al., 2002), lizozom pH'ını artırmıştır (Caro et al., 1988). 3-MA ve diğere kimyasalların yan etkilerden dolayı, bunlarla yapılan çalışmalardan elde edilen bulgulara bilimsel camia tarafından ihtiyatla yaklaşılmıştır. Bu nedenle, ölen hücrelerde gözlenen otofaji, hala tartışılan bir konu olarak kalmıştır. (Gozuacik ve Kimchi, 2004; Levine ve Yuan, 2005). Otofajinin hücre ölümündeki rolü konusunda daha güçlü veriler, programlı hücre ölümüne yol açtıkları tartışmasız olarak kabul edilen BNIP3 (Vande Velde et al., 2000), DAPK ve DRP-1/DAPK2 (Inbal et al., 2002, Gozuacik ve Kimchi, 2006) gibi proteinlerin otofajik hücre ölümünü tetiklemesi ve Bcl-2 gibi hücrelerin hayatta kalmasını sağlayan proteinlerin otofajiyi baskılamasının (Cardenas-Aguayo et al., 2003; Saeki et al., 2000; Vande Velde et al., 2000; Xue et al., 2001; Yanagisawa et al., 2003) gösterilmesi ile sağlanmıştır.

Maya otofajisinin moleküler işleyişinde rol oynayan genlerin çoğunun bağımsız araştırma takımları tarafından bulunması, otofaji, bu biyolojik olayın altında yatan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını sağlamış ve otofaji araştırmalarında yeni bir dönem açmıştır (Kim ve Klionsky, 2000; Ohsumi, 2001). Maya otofaji genlerinin ortologları çok kısa bir süre içinde *Dictyostelium*, *C. elegans*, *Drosophila*, fare ve insanda bulunmuştur (Klionsky et al., 2003). Daha sonraki çalışmalar bu ortologların otofajideki işlevlerinin, evrimsel olarak daha gelişmiş canlılarda da korunduğunu ortaya koymuştur. Bu önemli gelişmeler, otofajinin hücre ölümündeki rolünün daha ayrıntılı çalışılmasını sağlamış, otofajik genlerinin silinmesi (knock-out), gen ürünlerinin RNAi ve antisens yöntemlerle baskılanması gibi genetik yöntemlerin kullanılmasının önünü açmıştır.

Atg5, Atg7 ve beclin-1 gibi otofaji proteinlerinin RNA'larının baskılanması ile yapılan ifade azaltma (knock-down) deneyleri, belli deneysel koşullar altında, hücre ölümünü

de baskılamıştır. L929 fare fibroblastları, U937 monosit hücreleri ve makrofajlarda kaspaz baskılayıcı Z-VAD'ın yol açtığı ölüm (Xu et al., 2006; Yu et al., 2004), Bax/Bak genleri silinmiş fibroblastların etoposid ve staurosporin etkisi altındaki ölümleri (Shimizu et al., 2004) ve tümör baskılayıcı smARF'ın hücrelerde yüksek düzey ifade edilmesi sonrası görülen hücre ölümleri (Reef et al., 2006), otofaji gen ifadesi baskılanarak önlenmiştir.

Otofaji yollarında rol oynayan genlerin ifadelerinin baskılanmasının hücre ölümünü önlemesi, kaspazlardan bağımsız fakat otofaji proteinlerine bağımlı ve otofajik vezikül brikimi ile seyreden bir hücre ölüm mekanizmasının varlığını inkar edilemez bir şekilde ortaya koymuştur. Geçmişte, 3-MA ve wortmannin gibi yan etkileri olan kimyasal baskılayıcılar kullanılarak çalışılan programlı hücre ölümlerinde otofajinin rolü, genetik temelli ve yan etkileri en az düzeyde olan güncel stratejiler kullanılarak yeniden çalışılmalıdır.

## **OTOFAJİ VE APOPTOZ BAĞLANTISI**

Farklı temel moleküler mekanizmalar tarafından kontrol edildiklerine dair veriler olmasına karşın (apoptoz için kaspaz şelaleleri, otofaji için Atg protein sistemleri), bu iki programlı hücre ölümü arasında bir çeşit bağlantı ve iletişim bulunduğu dair yayınlar artmaktadır (Gozuacik D, 2004). Apoptozun engellendiği koşullar altında otofajinin baskın bir programlı ölüm mekanizması olarak ortaya çıkması da bu bağlantı ve iletişimin varlığına dair işaretlerden birisidir (Gozuacik D, 2008).

Bcl-2 protein ailesinin Bcl-2 ve Bcl-XL gibi anti-apoptotik üyelerinin, yalnızca BH3 içeren proapoptotik proteinler (örn, Bad) yanında, en temel otofaji proteinlerinden birisi olan Beclin1 ile ilişkiye girdiği ve bu şekilde otofajiyi baskıladığı tanımlanmıştır (Pattingre S, 2005). Yani Bcl-2 proteinleri hem anti-apoptotik, hem de anti-otofajik bir özellik göstermektedir ve otofaji ile apoptozu koordine etmektedir. DAPk ya da JNK1/2 adlı hücre stres ve hücre ölümü ile bağlantılı kinazların sırasıyla Beclin1 ve Bcl-2'yi fosforilemeleri sonrası Beclin1, Bcl-XL proteininin baskılayıcı etkisinden kurtulup otofajiyi aktive edebilir (Wei Y, 2008; Zalckvar E, 2009). Biz de, DAPk'ın hücre stres koşullarına bağlı olarak apoptoz ya da otofajiye yol açtığını gözlemledik. DAPk nakavt fareler ve bunlardan elde ettiğimiz hücrelerle yaptığımız çalışmalar

sonucunda, DAPK'ın bu iki ölüm mekanizması arasında kesişim noktalarından birisi olduğunu önerdik (Gozuacik D, 2008). İlginçtir ki, apoptoz sırasında Beclin1'in kaspaz'lar tarafından kesilip etkisiz hale getirildiğine dair son dönemde birçok makale yayınlanmıştır (Norman JM, 2010). Demek ki kaspaz aktivasyonu önemli bir otofaji proteini olan Beclin1'i parçalayarak, apoptoz sırasında otofajiyi sınırlandırabilmektedir.

Beclin1'e benzer şekilde, Atg4'ün de aralarında bulunduğu birçok Atg proteininin kaspazlar tarafından yıkıldığına dair veriler mevcuttur (Betin VM, 2009; Norman JM, 2010). Biz de eni çalışmalarımızdan birinde, temel bir otofaji proteininin kaspaz hedefi olduğunu gösterdik ve kaspaz kesim bölgesini haritaladık (Oral Ö, Öz-Arslan D ve Gözüaçık D, BBRC dergisine gönderildi). Ayrıca, Atg5 adlı diğer bir otofaji proteininin calpain proteazlar tarafından kesildiğini iddia eden bir çalışma yayınlanmıştır (Yousefi S, 2006). Kesildikten sonra ortaya çıkan otofaji protein parçalarının, BH3 yapısına benzer özellikler taşıyan bölgelerinin mitokondriye geçerek burada hücre ölümüne katkıda buldukları öne sürülmüştür. Yani, proteazlar tarafından kesilen otofaji proteinleri, proapoptotik proteinlere dönüşüp, mitokondrial apoptoza katkıda bulunabilmektedirler.

Apoptoz ve otofaji arasında başka ilginç ve karmaşık bağlantılar da mevcuttur. Örneğin, otofaji proteini Atg5'in FADD adlı apoptoz adaptörü ile protein-protein ilişkisi içine girebileceği, bunun TNF- $\alpha$ 'ya yanıt veren ve RIPk1/2'yi içeren bir protein kompleksinin regülasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (Bell BD, 2008). Aslında RIPk'ın kendisi de kaspaz-8 tarafından kesilebilmekte ve böylece RIPk-JNK1/2 sinyal yolu tarafından otofaji aktivasyonunu önlenmektedir (Yu L, 2004). Öte yandan kaspaz-8'in seçici otofajinin bir hedefi olduğu ve otofaji tarafından yıkıma uğratıldığı gösterilmiştir (Hou W, 2010). Atg5-FADD ilişkisinin, gama-interferon uyarımı sonrası otofaji aktivasyonunda rol oynadığına dair veriler de mevcuttur (Pyo JO, 2005).

Bütün bu veriler, otofaji ve apoptoz arasında karmaşık ilişkiler bulunduğuna işaret etmektedir. Otofaji ve apoptoz, benzer türde stres uyaranlarına yanıt olarak aktive olmakta, bazı düzenleyici proteinleri paylaşmakta, bunlar aracılığıyla koordine olmaktadır. Bu iletişim ve koordinasyonda çeşitli enzim-substrat ilişkileri (örneğin,

kaspaz-8'in çeşitli otofaji proteinlerini kesmesi, fakat kendisinin de otofaji hedefi olması gibi), protein-protein ilişkileri (Atg5-FADD gibi) ve proteinler arası rekabet (Bcl-2'ye bağlanma konusunda Beclin1 otofaji proteini ve BH3 içeren proapoptotik Bcl-2 proteinleri arasında görülen yarış gibi) belirleyici rol oynamaktadır.

Geçmiş yıllarda yapılan yayınlarda, otofajinin apoptoz için gerekli olduğu ya da birlikte aktive olarak hücre ölümüne katkıda bulunduğu dair veriler mevcuttur (Gozuacik D, 2004). Hatta bazı hücre ölüm otoriteleri, klasik apoptozun bağışıklık sistemi hücreleri ve kalın bağırsak epitel hücreleri gibi küçük hücrelerde görülmesine karşın, özellikle büyük hücrelerde (örneğin aksonu bir metreyi bulabilen sinir hücreleri ya da uzun iskelet kas lifleri gibi) sitoplazma parçalanması konusunda otofajiye ihtiyaç duyduğunu önermektedirler (Richard Lockshin, kişisel görüşme). Bu durumda da, otofaji ve apoptozun birlikte koordine olması gerekmektedir.

## **SONUÇ**

Otofaji alanı son yıllarda artan bilimsel ilgiden son derece olumlu bir şekilde etkilenmiştir. Son yıllarda otofaji konusunda çıkan makalelerin sayısındaki artış da buna işaret etmektedir. Maya otofaji genlerinin bazılarının başka canlılardaki ortologları bulunmuştur. Önemli otofaji genleri değiştirilmiş ve otofaji belirteçleri taşıyan organizma sayısı giderek artmaktadır. Özellikle kaspazların etkin olmadığı durumlarda ortaya çıkan otofajik hücre ölümünün bazı mekanizmaları belirlemeye başlamıştır. Fakat hem otofaji hem de hücre ölüm araştırmaları topluluklarında yer alan bazı seçkin üyelerin, otofajinin doğrudan bir öldürücü etki gösterebileceği fikrine karşı dirençleri ve otofajik hücre ölümünün fizyolojik bir mekanizma olduğunun, özellikle *Drosophila* ve ipek böceği modellerindeki gelişimsel görevlerine (örn. Berry DL, 2007; Facey CO, 2010) rağmen inkar edilmesi, bu konuda çalışma yapanların cesaretini kırmakta ve çalışmalarını yavaşlatmaktadır (örn. Kroemer G, Levine B, 2008 ve Levine B, Yuan J, 2005). Bunun da etkisiyle, otofajinin hücre ölümü yönüyle ilgilenen araştırmacılar, otofaji ile apoptoz arasındaki bağlantılara yönelmiş ve bu bağlantıların moleküler temelleri konusunda önemli yol katetmişlerdir. Otofaji alanındaki gelişmeler sadece hücre ölümünü ve yaşamını düzenleyen temel mekanizmalar hakkındaki bilgimizi arttırmayacak, hayvanlardan bitkilere, oradan insanlara çok geniş bir yelpazede moleküler mekanizmaların anlaşılması, son

dönemde ivme kazanan bir konu olan, otofaji bozukluklarının insan hastalıklarındaki rolü konusunu daha iyi anlamamıza ve yeni ilaç hedefleri geliştirmemize yol açacaktır.

## **KAYNAKLAR**

- 1) Bell BD, Leverrier S, Weist BM, Newton RH, Arechiga AF, Luhrs KA, Morrisette NS, Walsh CM. FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 43, 16677-82.
- 2) Berry DL, Baehrecke EH. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell*. 2007 Dec 14;131(6):1137-48.
- 3) Betin VM, Lane JD. Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *J Cell Sci*. 2009, 122(Pt 14):2554-66.
- 4) Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelárová H, Meijer AJ. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*. 1997 Jan 15;243(1-2):240-6.
- 5) Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Török L, Pandey S, Sikorska M, Walker R, Hermann RS. 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*. 1996 Aug;17(8):1595-607.
- 6) Bursch W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ*. 2001 Jun;8(6):569-81.
- 7) Cárdenas-Aguayo Mdel C, Santa-Olalla J, Baizabal JM, Salgado LM, Covarrubias L. Growth factor deprivation induces an alternative non-apoptotic death mechanism that is inhibited by Bcl2 in cells derived from neural precursor cells. *J Hematother Stem Cell Res*. 2003 Dec;12(6):735-48.



8) Caro LH, Plomp PJ, Wolvetang EJ, Kerkhof C, Meijer AJ. 3-Methyladenine, an inhibitor of autophagy, has multiple effects on metabolism. *Eur J Biochem.* 1988 Aug 1;175(2):325-9.

9) Chi S, Kitanaka C, Noguchi K, Mochizuki T, Nagashima Y, Shirouzu M, Fujita H, Yoshida M, Chen W, Asai A, Himeno M, Yokoyama S, Kuchino Y. Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene.* 1999 Apr 1;18(13):2281-90.

10) Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl).* 1990;181(3):195-213.

11) Facey CO, Lockshin RA. The execution phase of autophagy associated PCD during insect metamorphosis. *Apoptosis.* 2010 Jun;15(6):639-52.

12) Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene.* 2004 Apr 12;23(16):2891-906.

13) Gozuacik D, Kimchi A. DAPk protein family and cancer. *Autophagy.* 2006 Apr-Jun;2(2):74-9.

14) Gozuacik D, Kimchi A., Autophagy and cell death *Curr Top Dev Biol.* 2007, 78 , 217-45.

15) Gozuacik D, Bialik S, Raveh T, Mitou G, Shohat G, Sabanay H, Mizushima N, Yoshimori T, Kimchi A. DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. *Cell Death Differ.* 2008, 15(12):1875-86.

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

- 17) Inbal B, Bialik S, Sabanay I, Shani G, Kimchi A. DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J Cell Biol.* 2002 Apr 29;157(3):455-68.
- 18) Jia L, Dourmashkin RR, Allen PD, Gray AB, Newland AC, Kelsey SM. Inhibition of autophagy abrogates tumour necrosis factor alpha induced apoptosis in human T-lymphoblastic leukaemic cells. *Br J Haematol.* 1997 Sep;98(3):673-85.
- 19) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57.
- 20) Kim J, Klionsky DJ. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:303-42.
- 21) Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell.* 2003 Oct;5(4):539-45.
- 22) Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Dec;9(12):1004-10.
- 23) Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest.* 2005 Oct;115(10):2679-88.
- 24) Norman JM, Cohen GM, Bampton ET. The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases. *Autophagy* 2010, 6(8):1042-56.
- 25) Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Mar;2(3):211-6.
- 26) Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 2005 122(6):927-39.

- 27) Pyo JO, Jang MH, Kwon YK, Lee HJ, Jun JI, Woo HN, Cho DH, Choi B, Lee H, 28) Kim JH, Mizushima N, Oshumi Y, Jung YK. Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *J Biol Chem.* 2005, 280, 20722-9.
- 29) Reef S, Zalckvar E, Shifman O, Bialik S, Sabanay H, Oren M, Kimchi A. A short mitochondrial form of p19ARF induces autophagy and caspase-independent cell death. *Mol Cell.* 2006 May 19;22(4):463-75.
- 30) Saeki K, Yuo A, Okuma E, Yazaki Y, Susin SA, Kroemer G, Takaku F. Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells. *Cell Death Differ.* 2000 Dec;7(12):1263-9.
- 31) Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology.* 1973 Jun;7(3):253-66.
- 32) Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol.* 2004 Dec;6(12):1221-8.
- 33) Vande Velde C, Cizeau J, Dubik D, Alimonti J, Brown T, Israels S, Hakem R, Greenberg AH. BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol.* 2000 Aug;20(15):5454-68.
- 34) Wei Y, Patingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell.* 2008, 30(6):678-88.
- 35) Xu Y, Kim SO, Li Y, Han J. Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death. *J Biol Chem.* 2006 Jul 14;281(28):19179-87.
- 36) Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM. Autophagy is activated by apoptotic signalling

in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol Cell Neurosci.* 1999 Sep;14(3):180-98.

37) Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM. Mitochondria are selectively eliminated from eukaryotic cells after blockade of caspases during apoptosis. *Curr Biol.* 2001 Mar 6;11(5):361-5.

38) Xue L, Borutaite V, Tolkovsky AM. Inhibition of mitochondrial permeability transition and release of cytochrome c by anti-apoptotic nucleoside analogues. *Biochem Pharmacol.* 2002 Aug 1;64(3):441-9.

39) Yanagisawa H, Miyashita T, Nakano Y, Yamamoto D. HSpin1, a transmembrane protein interacting with Bcl-2/Bcl-xL, induces a caspase-independent autophagic cell death. *Cell Death Differ.* 2003 Jul;10(7):798-807.

40) Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science.* 2004 Jun 4;304(5676):1500-2.

41) Zalckvar E, Berissi H, Mizrachy L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M, Sabanay H, Pinkas-Kramarski R, Kimchi A. DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep.* 2009, 10(3):285-92.