

Autofagia del cardiomiocito: ¿Un nuevo mecanismo de adaptación al estrés o de muerte celular?

Pablo Aránguiz^{1,2*}, Ariel Contreras^{1,2*}, Diego Rojas^{1,2}, Rodrigo Troncoso^{1,2}, Paola Marambio^{1,2}, Bárbara Toro^{1,2}, Carlos Sanhueza^{1,2}, Christian Penannen^{1,2}, Jessica Diaz-Elizondo^{1,2}, Valentina Parra^{1,2}, Mario Chiong^{1,2}, Guillermo Díaz-Araya², Sergio Lavandero^{1,2,3}.

¹Departamento Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, ²Centro FONDAF Estudios Moleculares de la Célula y ³Programa Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Históricamente, la apoptosis y la necrosis han sido consideradas como las dos formas fundamentales de muerte celular. Sin embargo, evidencias recientes sugieren que la muerte celular programada no está confinada sólo a la apoptosis sino que las células disponen de distintos mecanismos de autodestrucción, entre los que se cuenta la autofagia. Esta última se define como un proceso dinámico y programado que procede con el secuestro de proteínas citoplasmáticas y organelos enteros dentro de vacuolas de doble membrana, que se contactan y se fusionan con los lisosomas, formando los autolisosomas. Los elementos capturados en las vacuolas son degradados por proteasas lisosomales y removidos de la célula por exocitosis. La autofagia se describió inicialmente como un proceso fisiológico clave para la supervivencia celular en respuesta al estrés derivado de la privación de nutrientes. Además, la autofagia también se ha observado en algunas patologías cardiovasculares, especialmente aquellas asociadas a procesos de isquemia/reperfusión. En esta revisión se sintetiza el conocimiento actual de la autofagia, sus implicancias y proyecciones en el área cardiovascular.

Cardiomyocyte autophagy: A new adaptative mechanism to stress or new form of cell death?

Historically, apoptosis and necrosis have been considered the two unique and fundamental types of cell death. However, recent evidence suggests that the programmed cell death is not only confined to apoptosis because other cell autodestruction mechanisms also exist such as autophagy. This new cellular process is a dynamic and programmed mechanism that involves sequestering of both cytoplasmatic proteins and organelles within double membrane vacuoles, which are contacted and fused with lysosomes, forming the autolysosomes. The captured elements are degraded by lysosomal proteases and removed from the cell by exocytosis. Autophagy was initially described as a critical physiological event for cell surviving to stress derived from nutrient deprivation. Autophagy has also been observed in some cardiovascular pathologies, specially those linked to ischemia/reperfusion. We review here the actual knowledge on autophagy, its implications and future relevance for the cardiovascular area.

Key words: Autophagy, cardiomyocyte, cell death.

Recibido el 9 de noviembre de 2006, aceptado el 7 de diciembre de 2006.

Rev Chil Cardiol 2006; 25 (3): 331-338

Correspondencia: Dr. Sergio Lavandero, PhD
Centro FONDAF Estudios Moleculares de la Célula
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile. Olivos 1007, Santiago
Correo electrónico: slavander@uchile.cl

Introducción

El corazón es una bomba mecánica compuesta por diversos tipos celulares. Los cardiomiocitos y los fibroblastos dan cuenta del 33 y 66% del total de las células cardíacas, respectivamente. Los cardiomiocitos, protagonistas centrales en el proceso de contracción cardíaca, son células terminalmente diferenciadas que dejan de dividirse poco después del nacimiento, y por lo tanto, los individuos adultos poseen un número definido y limitado de ellos y cualquier evento que comprometa su supervivencia, afectará la función miocárdica. Esta natural restricción evolutiva convierte al tejido cardíaco en un órgano particularmente vulnerable a eventos isquémicos, tóxicos e inflamatorios¹.

La apoptosis de células cardíacas ha sido descrita como uno de los principales mecanismos de muerte celular en respuesta a hipoxia, estrés osmótico o mecánico, citoquinas, doxorubicina y angiotensina II². Sin embargo, nuevas evidencias han mostrado la presencia de distintas formas de muerte en el corazón³.

Históricamente, la apoptosis y la necrosis han sido

consideradas como las dos formas fundamentales de muerte celular. El término necrosis se ha usado por más de 200 años para definir los drásticos cambios en tejidos, visibles a simple vista. La necrosis es un proceso de muerte no controlado genéticamente, caracterizado por depleción de los niveles intracelulares de ATP, aumento del volumen celular y pérdida de la integridad de la membrana plasmática, produciendo la liberación de los componentes celulares y desarrollo de inflamación (figura 1)^{4,5}. La apoptosis o muerte celular programada tipo I, en cambio, es un proceso dependiente de energía y por el cual las células mueren a través de un proceso secuencial, ordenado y finamente regulado. Este tipo de muerte se caracteriza morfológicamente por compactación de la cromatina, condensación del citoplasma y disminución del volumen celular, seguido de una fragmentación del núcleo y la célula, junto a una rápida fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por células del sistema inmune o vecinas, en ausencia de inflamación (figura 1)⁶. En la apoptosis, la fragmentación del DNA depende de la activación y síntesis de novo de endonucleasas⁷, resultando en el corte del DNA denominado intranucleosomal y la aparición de fragmentos de doble hebra, múltiplos de 180 a 200 pb⁸.

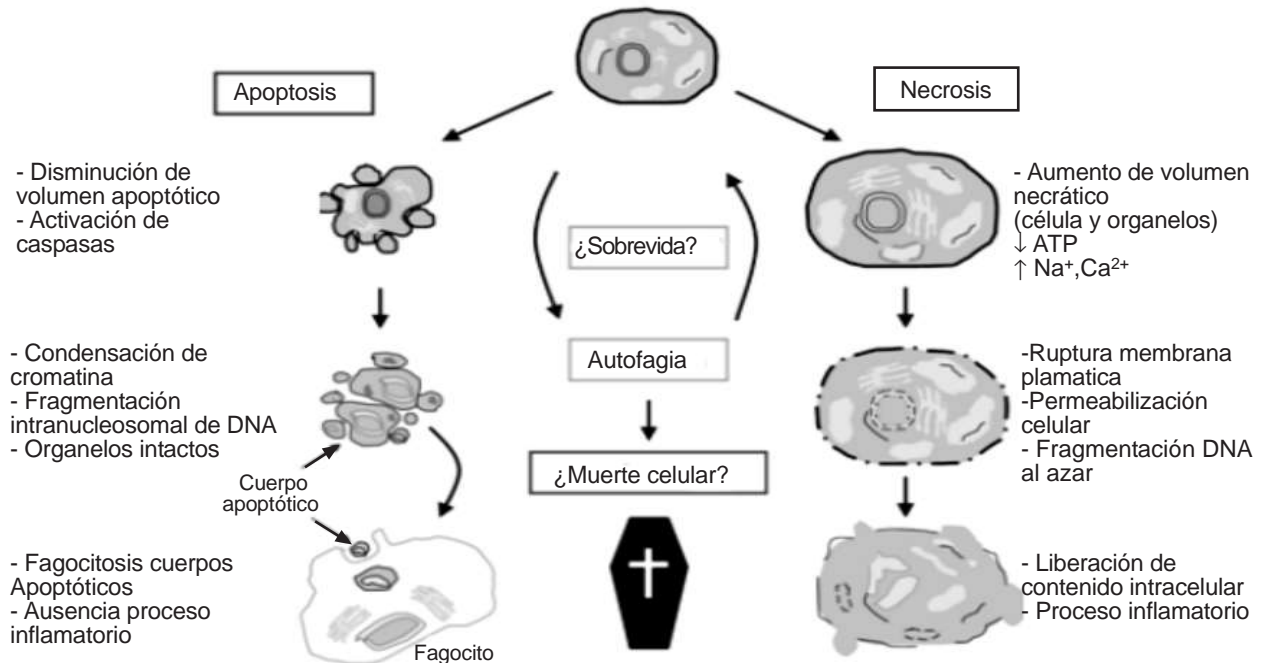


Figura 1. Diferencias morfológicas y bioquímicas entre apoptosis y necrosis. Las células normales pueden morir por necrosis y apoptosis. El proceso necrótico implica básicamente un aumento del volumen celular, depleción de ATP y aumentos en los niveles intracelulares de Ca²⁺ y Na⁺. La membrana celular se rompe, provocando el vaciamiento del contenido citoplasmático al espacio extracelular y posterior desarrollo de un proceso inflamatorio en el sitio de la necrosis. En cambio, el proceso apoptótico se caracteriza por una disminución del volumen celular, fragmentación del DNA y formación de cuerpos apoptóticos, manteniendo la estructura de la membrana plasmática intacta. Este proceso es programado genéticamente y requiere de energía en la forma de ATP. Los restos celulares son fagocitados por macrófagos o células vecinas, sin originar inflamación. La autofagia se menciona como un probable proceso de supervivencia o una forma alternativa de muerte celular programada.

Estudios recientes sugieren que la muerte celular programada no está confinada sólo a la apoptosis, sino que las células utilizan diferentes mecanismos para activar su autodestrucción. Un nuevo ejemplo de ello es la muerte celular programada tipo II o autofagia^{9,10}.

Autofagia

La autofagia se describió inicialmente como un proceso fisiológico clave para la supervivencia celular en respuesta a la privación de nutrientes, diferenciación celular y desarrollo. Además cumple un importante papel tanto en el recambio de macromoléculas y organelos, como en diversas patologías neurodegenerativas (Síndrome de Parkinson y Enfermedad de Alzheimer)^{11,12}. La autofagia se define como un proceso dinámico y programado que procede con el secuestro de proteínas citoplasmáticas y organelos enteros dentro de vacuolas de doble membrana, que se contactan y posteriormente se fusionan con los lisosomas, formando los autolisosomas. Todos estos elementos capturados en las vacuolas son degradados por proteasas lisosomales y removidos de la célula por exocitosis^{13,14}.

La autofagia participa en la degradación de proteínas normales en respuesta a la privación de nutrientes, en el remodelado celular, diferenciación, metamorfosis, envejecimiento y transformación celular¹⁴. También se le ha implicado en el crecimiento del útero durante la gestación y su atrofia después del parto; en la remoción de componentes celulares anormales acumulados durante la toxicidad celular y recientemente, con el ayuno que experimenta el recién nacido en sus primeras horas de vida¹⁵. La inhibición de la autofagia se correlaciona además con una disminución en la degradación de proteínas y el crecimiento celular neto¹⁶.

La autofagia se clasifica en: Microautofagia, macroautofagia y autofagia mediada por chaperonas¹⁷. La microautofagia involucra la captación de citoplasma o de organelos enteros directamente por la membrana lisosomal. Este mecanismo ocurre por invaginación y cumple una función importante en la degradación de los peroxisomas y renovación de la cromatina nuclear^{18,19}. La autofagia mediada por chaperonas difiere de las otras dos formas mencionadas anteriormente en que no hay participación de tráfico de vesículas. Las proteínas sustratos de esta vía presentan un motivo peptídico KFERQ que es reconocido por proteínas chaperonas, para luego ser transportadas a los lisosomas, molécula por molécula. La proteína sustrato y las chaperonas se unen a la membrana lisosomal a través del receptor LAMP2a. Luego la proteína sustrato se despliega y es empujada hacia el lumen del lisosoma para su degradación²⁰. Por último, la macroautofagia es una vía para la degradación de proteínas de vida media larga y se induce bajo condiciones de privación de nutrientes y estrés celular. La macroautofagia es un proceso de múltiples

pasos que comienza con el secuestro de material citoplasmático para formar el autofagosoma, estas estructuras son usualmente delimitadas por una doble membrana. Luego el autofagosoma se fusiona con los endosomas, formando una estructura híbrida que se acidifica por la adquisición de una bomba de protones, llamada el autofagosoma intermediario, el cual contiene además una membrana única. La estructura final formada por la fusión del autofagosoma intermediario con el lisosoma, se denomina autolisosoma. El contenido vacuolar se digiere y recicla para proveer a la célula de aminoácidos y energía^{14,21}. Estudios de microscopía electrónica muestran a los autofagosomas rodeados por dos tipos distintos de bicapas lipídicas: Las membranas externa e interna que rodean un material que es equivalente en densidad electrónica al citoplasma, mientras que el lumen entre estas dos bicapas es transparente en la microscopía electrónica. Los autofagosomas son estructuras grandes con diámetros de 500-1500 nm en células mamíferas; contienen una serie de proteínas marcadoras provenientes del retículo endoplásmico (RE), endosomas y lisosomas, lo que hace muy difícil determinar el origen de las membranas del autofagosoma. Sin embargo, la observación de la ultraestructura, así como el reconocimiento de RE mediante antisuero contra proteínas del RE rugoso, han postulado a este último como la principal fuente de estas membranas^{16,22,23}.

Las proteínas, así como los genes APG (autophagy) y AUT (autophagocytosis) involucrados en la macroautofagia, se han caracterizado inicialmente en levaduras^{24,25}. La nomenclatura para los genes APG y AUT relacionados a autofagia se han unificado bajo la sigla ATG²⁶. La formación del autofagosoma depende principalmente de dos sistemas de conjugación que se asemejan al de ubiquitinación de proteínas. Uno de ellos es el complejo Atg12-Atg5. En un primer paso, el extremo carboxilo terminal del residuo de glicina del Atg12 se activa por acción de Atg7. Posteriormente, Atg12 se transfiere a Atg10 para formar el complejo Atg12-Atg10. Finalmente, Atg12 se une covalentemente a Atg5. Luego, este complejo (Atg12-Atg5) se une en forma no covalente a Atg16²⁷. En el proceso de elongación de la nueva vesícula, la distribución de este complejo es asimétrica, asociándose principalmente a la membrana externa. Finalmente este complejo se disocia de la membrana al completarse la formación del autofagosoma (figura 2). El otro sistema involucra a la proteína LC3 o Atg8, la cual experimenta modificaciones post-traduccionales antes de unirse a la membrana. Inmediatamente después de su síntesis, 22 aminoácidos en rata o 5 aminoácidos en el humano, se remueven de su extremo carboxilo terminal. Este procesamiento es catalizado por Atg4. La forma resultante se denomina

LC3-I que reside principalmente en el citosol. Luego de la activación por Atg7, LC3-I se une a Atg3 que transfiere fosfoetanolamina. El producto final llamado LC3-II se asocia a la membrana naciente de la vesícula y permanece unido a la membrana después de haberse completado la formación

del autofagosoma (figura 2). Debido a que la cantidad de LC3-II se correlaciona con el número de autofagosomas, se ha constituido como un marcador bioquímico confiable para predecir la actividad autofágica en células animales²⁸⁻³¹.

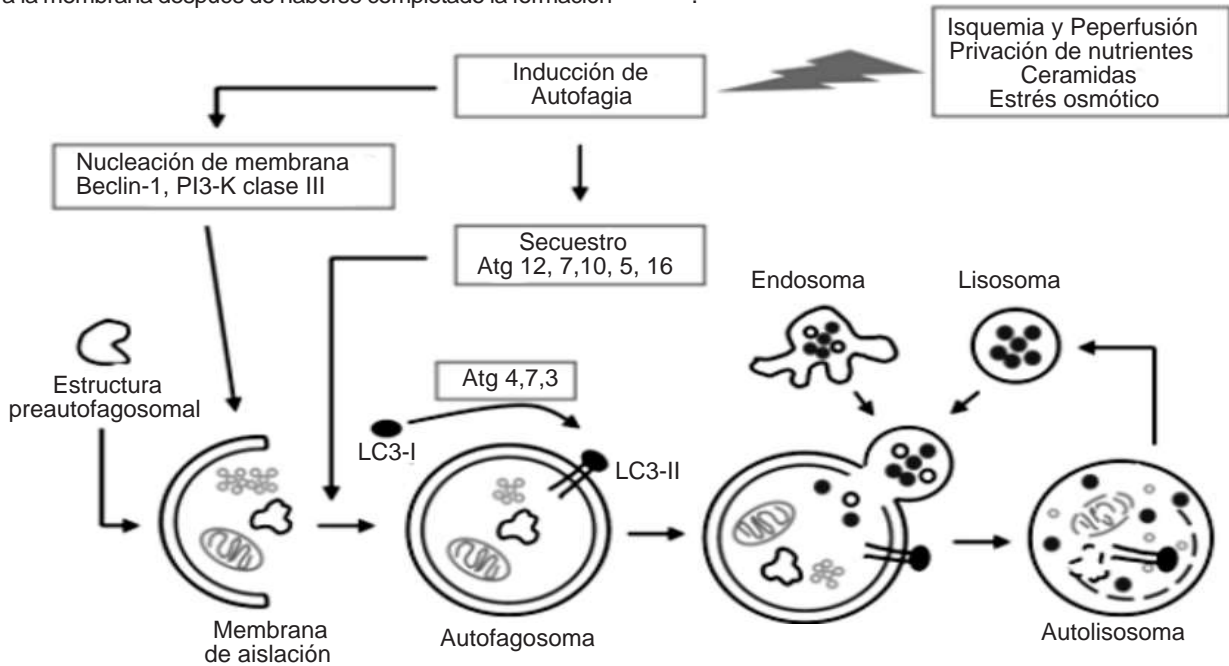


Figura 2. Etapas del proceso de formación del autofagosoma. Diferentes estímulos como eventos de isquemia-reperfusion, privación de nutrientes, cerámidas y estrés osmótico inducen la autofagia. La etapa de nucleación o formación de la estructura membranosa pre-autofagosomal requiere el concurso de las proteínas Beclin-1 (Atg 6) y PI3-K clase III. El progresivo desarrollo de esta estructura ocurre conjuntamente con la captura tanto elementos del citoplasma como organelos subcelulares (mitocondria, retículo endoplásmico, etc). Con la participación de distintas proteínas de la familia Atg se forma el autofagosoma, estructura esférica de doble membrana, que se fusiona con el endosoma y, posteriormente, con el lisosoma para dar origen al autolisosoma. LC3 es un marcador específico del autofagosoma.

Regulación de la autofagia

Diferentes condiciones de estrés pueden activar la autofagia y diferentes vías transduccionales están involucradas en su regulación (figura 3). Las fosfatidilinositol 3-quinasas (PI3-K) constituyen una familia de enzimas que catalizan la fosforilación del grupo hidroxilo en la posición 3' del anillo inositol de los fosfoinositidos [PI, PI(4)P y PI(4,5)P₂]. En mamíferos, las PI3-Ks se dividen en 3 clases. La de tipo I utiliza como sustratos a PI, PI(4)P y PI(4,5)P₂; la de clase II fosforila a PI y a PI(4)P; mientras que la de clase III tiene como sustrato sólo al PI³². Las PI3-K son importantes en la vía autofágica en mamíferos. Mientras la PI3-K de clase III se requiere en los estadios tempranos de la generación del autofagosoma, la PI3-K de clase I tiene un efecto inhibitor dependiente de la proteína quinasa mTOR (mammalian target of rapamycin)³². La inhibición de la PI3-K de clase III por wortmanina, 3-metiladenina (3-MA) o LY294002 previene la formación de los precursores de autofagia. En células animales mediante estudios de

coprecipitación y entrecruzamiento se ha descrito que PI3-K clase III está asociada con Beclin-1 (Bcl-1)³³. Este complejo a través de la generación de PIP3 es vital para el reclutamiento de proteínas que participan en la autofagia. Bcl-1 o Atg6 es un importante regulador de la autofagia y esencial para la supervivencia bajo condiciones nutricionales adversas. La expresión de Bcl-1 correlaciona directamente con la formación del autofagosoma y sus niveles están disminuidos en el cáncer de ovario y mama^{34,35}. Bcl-1 también interactúa con PI3-K clase III y se une a proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2^{34,36}.

Los aminoácidos, factores de crecimiento y el ATP son reguladores negativos de la autofagia, siendo esta inhibición mediada por mTOR, una proteína quinasa que sensa los niveles intracelulares de energía³⁷. La función de Tor está conservada a lo largo de la evolución y su inhibición por el inmunosupresor rapamicina remeda varias de las características fenotípicas de células privadas de nutrientes³⁸.

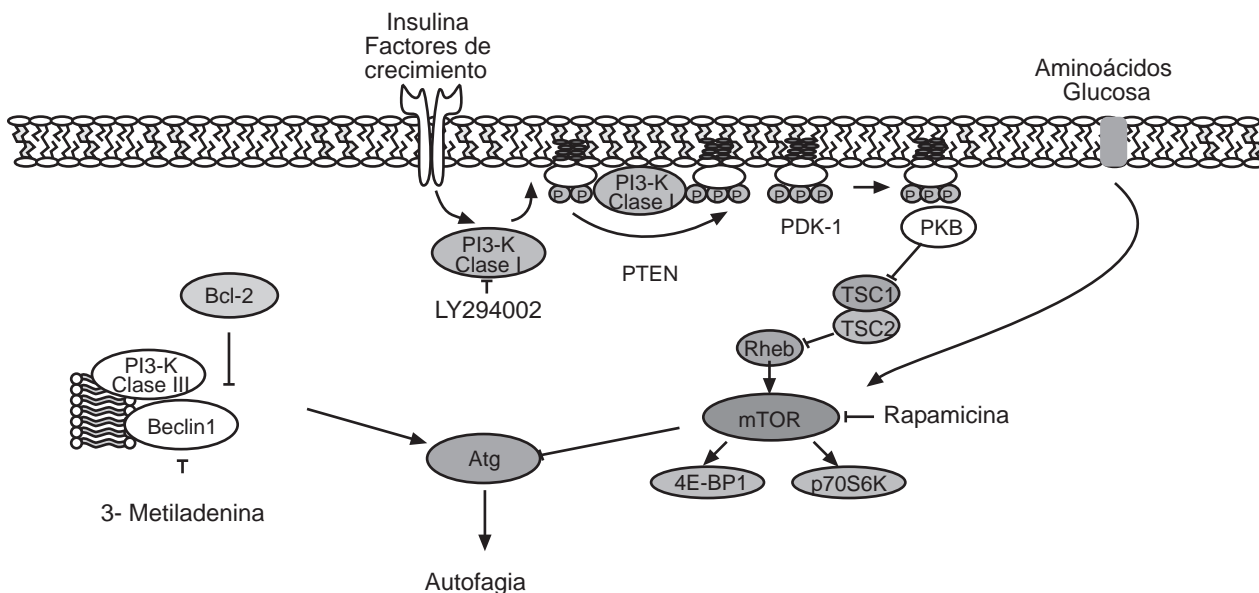


Figura 3. Vías de regulación de la autofagia en células eucariotas. En células de mamíferos, la proteína quinasa PI3-K clase I se activa en respuesta a la unión del ligando (ejemplo insulina o factores de crecimiento) a su receptor. PI(3,4)P2 y PI(3,4,5)P3 generados en la membrana plasmática activan a PDK1 y la proteína quinasa B (PKB), mientras que la proteína fosfatasa PTEN antagoniza esta vía. PKB inhibe la actividad GTP-asa del complejo proteico TSC1/TSC2, estabilizando a Rheb-GTP, proteína que estimula a mTOR, concluyendo todo en inhibición de la autofagia. Tanto mTOR como PDK1 estimulan a la proteína quinasa p70S6. En abundancia de nutrientes, la actividad de p70S6K inhibe la actividad de PI3-K, resultando en bajos niveles de autofagia, suficientes para mantener la homeostasis. Bajo condiciones de limitación de nutrientes, p70S6K se inactiva y se estimula la activación de PI3-K clase I para prevenir una excesiva autofagia. En cambio, la proteína PI3-K clase III es un estimulador de la autofagia a través de su acción sobre beclin-1 (bcl-1).

Autofagia: Muerte celular programada tipo II

La muerte celular por autofagia es principalmente una definición morfológica, es decir, muerte asociada a la presencia de autofagosomas y/o autolisosomas. Aún no hay evidencia concluyente de que sea un mecanismo específico de muerte. Sin embargo, se acepta que la autofagia puede destruir una célula⁹. Una interrogante actual en esta área es si la actividad autofágica es un proceso de muerte o, por el contrario, uno de sobrevivencia.

Los estudios morfológicos e histoquímicos aún no han podido probar una relación causa-efecto entre autofagia y muerte celular, en contraste con la apoptosis, donde existe un colapso de los elementos del citoesqueleto pero una preservación de organelos hasta etapas tardías del proceso. En la autofagia existe degradación temprana de organelos, pero preservación de elementos del citoesqueleto hasta etapas tardías, mientras que la muerte apoptótica puede ser dependiente o independiente de caspasas y caracterizada por procesamiento intranucleosomal del DNA.

Estos dos eventos (activación de las caspasas y fragmentación del DNA) ocurren muy tarde en la muerte por autofagia. En contraste con la necrosis, tanto la apoptosis como la autofagia no presentan respuesta inflamatoria³⁹.

Existen múltiples evidencias de muerte celular autofágica en varios tipos celulares. Algunos ejemplos son las células tumorales MCF-7 tratadas con tamoxifeno, las cuales

mueren con acumulación de vacuolas autofágicas en el citoplasma, en ausencia de apoptosis⁴⁰. También en células leucémicas HL-60, una disminución en los niveles de Bcl-2 gatilla eventos de muerte independientes de señales mitocondriales y activación de caspasas que se caracteriza por la presencia de vacuolas autofágicas⁴¹. En macrófagos, la inhibición de la caspasa-8 induce muerte autofágica, siendo severamente afectada por la ausencia de Atg-7 y Bcl-1, dos proteínas esenciales en este proceso⁴². Células MEF carentes de las proteínas proapoptóticas Bax/Bak son resistentes a la apoptosis, pero mueren por autofagia dependiente de Atg-5 y Bcl-1⁴³.

Existen distintas señales proapoptóticas que inducen autofagia, componentes de la vía apoptótica extrínseca, TRAIL, TNF y ceramidas³⁹. Por otra parte, la inhibición de vías antiapoptóticas como PI3-K/proteína quinasa B/mTOR activan la autofagia⁴⁴. Las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 también modulan la autofagia. La disminución de Bcl-2 aumenta la autofagia por un mecanismo independiente de caspasas en células leucémicas humanas⁴¹, mientras que a sobreexpresión de Bcl-2 inhibe la autofagia y muerte independientemente de caspasas en células progenitoras neuronales privadas de factores de crecimiento⁴⁵. Evidencias recientes sugieren que Bcl-2 inhibe la autofagia a través de su unión directa con Bcl-1 y esta interacción funcionaría

como un reóstato que mantiene a la autofagia en niveles compatibles con la supervivencia celular⁴⁶. En contraste, la sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-XL potencia la autofagia en células MEF carentes de Bax/Bak tratadas con el estímulo proapoptótico etopósido⁴³. Las bases para estos efectos opuestos de la familia de proteínas Bcl-2 en diferentes condiciones no están claras. Pattingre y cols.⁴⁶ mostraron que la autofagia es inhibida por Bcl-2 localizado en el retículo endoplásmico más que en la mitocondria y que esta inhibición depende de su interacción con Bcl-1.

Papel de la autofagia en la pérdida de cardiomiocitos

La pérdida progresiva de cardiomiocitos es una de las características más importantes en la insuficiencia cardíaca. La apoptosis es una forma importante de muerte celular, pero como hemos mencionado anteriormente, no es la única forma de muerte⁴⁷ utilizando muestras de ventrículo izquierdo de pacientes con insuficiencia cardíaca mostraron que los cardiomiocitos también mueren por autofagia, en forma independiente de la activación de caspasas. En condiciones de isquemia, los cardiomiocitos presentan vacuolas autofágicas, visualizándose algunas de ellas con organelos enteros y otras con material residual. Estudios morfológicos de corazones cardiomiopáticos muestran cambios degenerativos tales como vacuolización y lisis miofibrilar. En corazones de pacientes con cardiomiopatías

dilatadas, aumenta la actividad de enzimas lisosomales, aunque el mecanismo exacto de la función lisosomal en esta patología aún se desconoce⁴⁸. Otro estudio en corazones humanos insuficientes reveló aumentos tanto en el mRNA como en las enzimas conjugadoras de ubiquitina. Además, a nivel ultraestructural, se observó degeneración celular, incluyendo la formación de agregados de proteínas poliubiquitinadas en vacuolas autofágicas³.

Trabajos muy recientes han demostrado el papel de la autofagia en modelos de isquemia y reperfusión (I/R). Valentim y cols observaron que ciclos de isquemia/repercusión (I/R) inducen muerte por autofagia en cultivos primarios de cardiomiocitos y que este proceso se revierte usando un RNA de interferencia contra bcl-1⁴⁹. Al contrario, en una línea de cardiomiocitos (células HL-1) expuestos a I/R, se midió la formación de autofagosomas en estado estacionario y total, registrándose en este trabajo que la I/R deteriora el flujo autofágico a nivel de formación y degradación, donde la inducción de la autofagia disminuye la muerte por I/R⁵⁰.

Investigaciones en marcha en nuestro laboratorio han mostrado que en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata privados de glucosa por 24 horas, se observan características morfológicas típicas de autofagia, evaluadas por microscopía electrónica (figura 4). Su aparición concordó con la formación de vesículas GFP-LC3 positivas (figura 4).

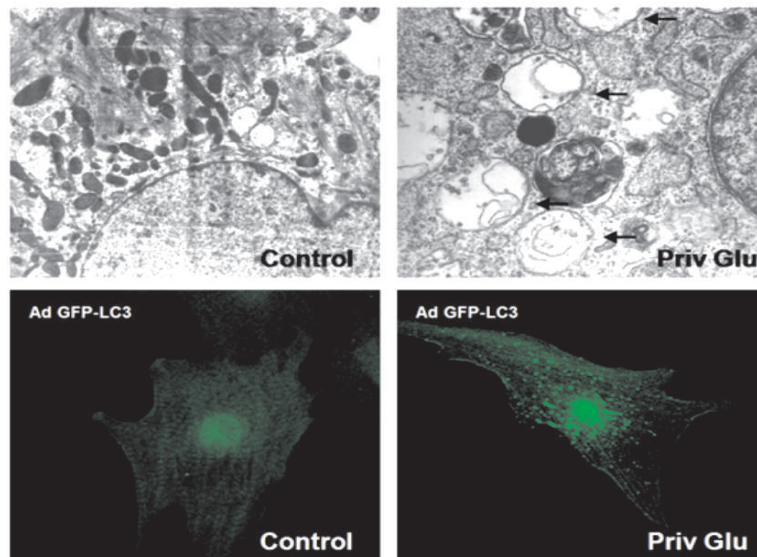


Figura 4. Presencia de vacuolas autofágicas en cultivos primarios de cardiomiocitos privados de glucosa. Paneles superiores: cardiomiocitos cultivados en medio DME/M199 (4:1) con 10% suero fetal de bovino en presencia (control) o ausencia de glucosa (Priv Glu) por 6 h. Las células se fijaron con glutaraldehído 3% y luego se trataron con 2% de OsO₄ y se embebieron en resina de Epon. Posteriormente, cortes ultradelgados obtenidos mediante micrótomo se tiñeron con acetato de uranilo y plomo y se analizaron por microscopía electrónica. En las fotografías se observan distintas fases del proceso autofágico desde autofagosomas, autolisosomas y cuerpos residuales. Paneles inferiores: cardiomiocitos se transdujeron por 24 h con un adenovirus GFP (proteína fluorescente verde) unido a LC3 (GFP-LC3) y luego se cultivaron en presencia (control) o ausencia de glucosa (Priv Glu). En el control se observa distribución de la proteína GFP-LC3 en todo el citoplasma celular. En cambio, en los cardiomiocitos privados de glucosa se observa formación de conglomerados proteicos ricos en GFP, dando cuenta de formación de vacuolas autofágicas enriquecidas en proteína GFP-LC3.

Los mecanismos por los cuales los cardiomiocitos desaparecen del tejido cardíaco no están completamente resueltos. El concepto de que los cardiomiocitos mueren principalmente por apoptosis, se ha puesto en duda en el

último tiempo y se está comenzando a estudiar la autofagia como un mecanismo alternativo de muerte y la influencia que tendrían distintos fármacos cardiovasculares sobre este proceso.

Referencias

- WOODCOCK EA, MATKOVICH SJ. Cardiomyocytes: structure, function and associated pathologies. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1746-1751.
- GÁLVEZ A, MORALES MP, ELTIT JM, OCARANZA P, CARRASCO L, CAMPOS X, et al. A rapid and strong apoptotic process is triggered by hyperosmotic stress in cultured rat cardiac myocytes. *Cell Tissue Res* 304, 279-285.
- KOSTIN S, POOL L, ELSASSER A, HEIN S, DREXLER HC, ARNON E, et al. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ Res* 92, 715-724.
- KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- OKADA Y, MAENO E, SHIMIZU T, DEZAKI K, WANG J, MORISHIMA S. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol* 532, 3-16.
- MAJNO G, JORIS I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. *Am J Pathol* 146, 3-15.
- BUJA LM, ENTMAN ML. Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease. *Circulation* 98, 1355-1357.
- COLLINS RJ, HARMON BV, GOBÉ GC, KERR JFR. Internucleosomal DNA cleavage should not to be the sole criterion for identifying apoptosis. *Int J Radiat Biol* 61, 451-453.
- BURSCHE W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* 8, 569-581.
- SHIMOMURA H, TERASAKI F, HATASHI T, KITAURA Y, ISOMURA T, SUMA H. (2001) Autophagic degeneration as a possible mechanism of myocardial cell death in dilated cardiomyopathy. *Jpn Circ J* 65, 965-968.
- ANGLADE P, VYAS S, JAVOY-AGID F, HERRERO MT, MICHEL PP, MARQUEZ J, et al. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* 12, 25-31.
- YU WH, CUERVO AM, KUMAR A, PETERHOFF CM, SCHMIDT SD, LEE JH, et al. Macroautophagy- a novel beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 171, 87-98.
- KABEYA Y, MIZUSHIMA N, UENO T, YAMAMOTO A, KIRISAKO T, NODA T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 19, 5720-5728.
- KLIONSKY DJ, EMR SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290, 1717-1721.
- KUMA A, HATANO M, MATSUI M, YAMAMOTO A, NAKAYA H, YOSHIMORI T, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032-1036.
- DUNN WA JR. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* 110, 1923-1933.
- CUERVO AM. Autophagy: in sickness and in health. (2004) *Trends Cell Biol*, 14, 70-77.
- SUBRAMANI S. Self-destruction in the line of duty. *Dev Cell* 1, 6-8.
- ROBERTS P, MOSHITCH-MOSHKOVITZ S, KVAM E, O'TOOLE E, WINEY M, GOLDFARB DS. (2003) Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 14, 129-141.
- MAJESKI AE, DICE JF. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2435-2444.
- PETIOT A, PATTINGRE S, ARICO S, MELEY D, CODOGNO P. Diversity of signaling controls of macroautophagy in mammalian cells. *Cell Struct Funct* 27, 431-441.
- BERG TO, FENGSRUD M, STROMHAUG PE, BERG T, SEGLEN PO. Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J Biol Chem* 273, 21883-21892.
- KIRKEGAARD K, TAYLOR MP, JACKSON WT. Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2, 301-314.
- TSUKADA M, OHSUMI Y. (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 333, 169-174.
- THUMM M, EGNER R, KOCH B, SCHLUMPBERGER M, STRAUB M, VEENHUIS M, et al. Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 349, 275-280.
- KLIONSKY DJ, CREGG JM, DUNN WA, JR., EMR SD, SAKAI Y, SANDOVAL IV, et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 5, 539-545.
- MIZUSHIMA N, NODA T, YOSHIMORI T, TANAKA Y, ISHII T, GEORGE MD, et al. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395, 395-398.
- MIZUSHIMA N, SUGITA H, YOSHIMORI T, OHSUMI Y. A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J Biol Chem* 273, 33889-33892.

29. ICHIMURA Y, KIRISAKO T, TAKAO T, SATOMI Y, SHIMONISHI Y, ISHIHARA N, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408, 488-492.
30. MIZUSHIMA N, YAMAMOTO A, MATSUI M, YOSHIMORI T, OHSUMI Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15, 1101-1111.
31. TANIDA I, UENO T, KOMINAMI E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2503-2518.
32. PETIOT A, OGIER-DENIS E, BLOMMAART EF, MEIJER AJ, CODOGNO P. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem* 275, 992-998.
33. KIHARA A, KABEYA Y, OHSUMI Y, YOSHIMORI T. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* 2, 330-335.
34. LIANG XH, JACKSON S, SEAMAN M, BROWN K, KEMPKES B, HIBSHOOSH H, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402, 672-676.
35. YUE Z, JIN S, YANG C, LEVINE AJ, HEINTZ N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 15077-15082.
36. LIANG XH, YU J, BROWN K, LEVINE B. Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function. *Cancer Res* 61, 3443-3449.
37. RAUGHT B, GINGRAS AC, SONENBERG N. The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 7037-7044.
38. KAMADA Y, FUNAKOSHI T, SHINTANI T, NAGANO K, OHSUMI M, OHSUMI Y. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 150, 1507-1513.
39. LEVINE B, YUAN J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 115, 2679-2688.
40. MARIÑO G, LÓPEZ-OTIN C. Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cell Mol Life Sci* 61, 1439-1454.
41. SAEKI K, YUO A, OKUMA E, YAZAKI Y, SUSIN SA, KROEMER G, et al. Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells. *Cell Death Differ* 7, 1263-1269.
42. YU L, ALVA A, SU H, DUTT P, FREUNDT E, WELSH S, et al. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 304, 1500-1502.
43. SHIMIZU S, KANASEKI T, MIZUSHIMA N, MIZUTA T, ARAKAWA-KOBAYASHI S, THOMPSON CB, et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 6, 1221-1228.
44. TAKEUCHI H, KONDO Y, FUJIWARA K, KANZAWA T, AOKI H, MILLS GB, et al. Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer Res* 65, 3336-3346.
46. PATTINGRE S, TASSA A, QU X, GARUTI R, LIANG XH, MIZUSHIMA N, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927-939.
45. CARDENAS-AGUAYO 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* 12, 735-748.
47. KNAAPEN MW, DAVIES MJ, DE BIE M, HAVEN AJ, MARTINET W, KOCKX MM. Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure. *Cardiovasc Res* 51, 304-312.
48. SHIMOMURA H, TERASAKI F, HAYASHI T, KITAURA Y, ISOMURA T, SUMA H. Autophagic degeneration as a possible mechanism of myocardial cell death in dilated cardiomyopathy. *Jpn Circ J* 65, 965-968.
49. VALENTIM L, LAURENCE KM, TOWNSEND PA, CARROLL CJ, SOOND S, SCARABELLI TM, et al. Urocortin inhibits beclin1-mediated autophagic cell death in cardiac myocytes exposed to ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 40, 846-852.
50. HAMACHER-BRADY A, BRADY NR, GOTTLIEB RA. Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 281:29776-29787.