

5. årsoppgave MED-3950
Profesjonsstudiet i medisin ved Universitetet i Tromsø
Norges Arktiske Universitetet



Steroidhormoner og Autofagi i Kreftutvikling
- et litteraturstudium

Thea Grindstad, MK11

Mobil: 95878050

E-mail: theagrindstad@gmail.com

Veileder: Elin Richardsen MD, PhD,
IMB, UIT, Norges Arktiske Universitet

Tromsø, 31.05.14

INNHALDSFORTEGNELSE

Resymé	4
Formålet med oppgaven	4
Metode	4
Om oppgaven	4
Nøkkelord	5
Forkortelser	6
1. Introduksjon	7
1.1 Kreft	7
1.2 Autofagi og kreftsykdom	9
1.3 Hormonregulerende celler og autofagi	10
2. Hormoner	11
2.1 Kroppens endokrine system	11
2.2 Steroidhormoner	11
2.3 Utvikling av steroidhormoner	13
2.4 Steroidhormonreseptorer	14
2.5 Kjønnshormonene	16
2.5.1 Androgener.....	17
2.5.1.1 Produksjon	17
2.5.1.2 Metabolisme	17
2.5.1.3 Biologisk effekt.....	18
2.5.2 Østrogener	18
2.5.2.1 Produksjon	18
2.5.2.2 Metabolisme	19
2.5.2.3 Biologisk effekt.....	20
2.5.3 Progesteron	20
2.5.3.1 Produksjon og biologisk effekt.....	20
2.6 Steroidhormoners rolle i kreftutvikling	22
3. Autofagi	23
3.1 Funksjon	23
3.2 En trinnvis prosess	25
3.3 Tre former for autofagi	26
3.4 Autofagimaskineriet	28
3.4.1 Autofagi initiering, phagophore dannelse og mTOR nettverket.....	28
3.4.1.1 Initiering.....	28
3.4.1.2 Beclin 1 – interagerende kompleks og nucleation	29
3.4.1.3 Beclin 1 komplekset og immunforsvaret.....	30
3.4.1.4 Elongering	30
3.4.1.5 Modning og degradering.....	30
3.5 Selektiv autofagi	32
3.5.1 Autofagi-reseptorproteiner.....	32
3.5.2 Tre grupper selektiv autofagi reseptorer	33
3.5.3 p62.....	33
3.6 Hovedsignaleringsveier i autofagiregulering	34
3.6.1 Regulering av mTOR.....	34
3.6.2 AMPK – positiv autofagi regulator.....	34
3.6.3 PI3K/AKT1 og PTEN – negativ autofagi regulator	34
3.6.4 p53 tumor suppressor og autofagi.....	35

3.7 Andre autofagi regulatorer	36
3.7.1 Cdk og autofagiregulering.....	36
3.7.2 Autofagi og ER-stress	37
4. Autofagi og kreftsykdom – et tveegget sverd	38
4.1 Tumorhemmende egenskaper	38
4.2 Tumorfremmende egenskaper.....	41
4.3 p62 – et knutepunkt mellom autofagi og kreft?	43
4.4 Autofagi og kreftbehandling.....	44
5. Steroidhormonregulert autofagi – et ledd i kreftutvikling?.....	46
6. Konklusjon	49
7. Oppsummering	50
Referanser	51

Resymé

Formålet med oppgaven

Tiden som forskerlinjestudent har gitt meg muligheten til å fordype meg i normale og patologiske cellulære mekanismer. Jeg blir til stadighet overrasket over kompleksiteten og kreativiteten som påvises i utviklingen av ulike kreftsvulster. Fortsatt føler jeg at jeg kun skraper i overflaten når jeg prøver å forstå omfanget av dette. Denne oppgaven har vært en mulighet til å sette seg inn i et svært aktuelle tema innen kreftforskning, autofagi. I tillegg har jeg fordypet meg i steroidhormonene, og da spesielt kjønnshormonene, et stort tema som stadig dukker opp innen ulike kreftformer. Arbeidet med å lete i litteraturen etter forbindelser mellom to svært store og uavklarte temaer har vært krevende, men og lærerikt. Mest utfordrende har det vært å skulle trekke ut essensen og prøve å finne en sammenhengen her. Jeg sitter igjen med mye ny kunnskap, men flere spørsmål enn svar. Ikke minst fremstår prosessene rundt kreftutvikling mer komplekse enn noen gang.

Metode

Jeg har gjort en systematisk gjennomgang av litteratur relevant for problemstillingen min. Av faglitteratur har jeg benyttet Lippincotts: Illustrated review of biochemistry, Peccorino: Molecular biology of cancer, Greenspan's: Basic & clinical endocrinology og Guyton and Hall: Textbook of medical physiology. Jeg har funnet aktuelle publikasjoner i stor grad gjennom medisinske søkebasen som PubMed. Jeg har og benyttet Google Scholar til å finne aktuelle kilder.

Om oppgaven

Autofagi og steroidhormoner er store temaer innen kreftforskning med mange ubesvarte spørsmål. I oppgaven vil jeg så systematisk som mulig undersøke om steroidhormonaktivert autofagi er sannsynlig. Innledningsvis vil jeg utdype hva steroidhormoner er, deres rolle som signaleringssubstanser og påvirkningen på ulike fysiologiske prosesser. Videre vil jeg presentere autofagi, dens mekanistiske funksjon og regulering. Jeg vil så vise at autofagi og steroidhormoner har roller i kreftutvikling og -behandling. Tilslutt vil jeg vise til forskning som knytter sammen disse temaene.

Nøkkelord

Kreft

Steroidhormoner

Kjønnsormoner

Autofagi

Selektiv autofagi

p62

Forkortelser

3 β -HSD - 3- β -Hydroxysteroid-dehydrogenase
AKT1/PKB – Protein Kinase B
AMPK - 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase
AR – Androgen reseptor
Atg – Autophagy related gene
ATP – Adenosintrifosfat
BCL-XL – B cell lymphoma- extra large
Beclin 1 – Beclin1 autophagy related
BH3-only – Bcl2 homology domain 3-only
BIF-1- BAX interacting factor 1
BLC-2 – B cell lymphoma 2
CAMKK β - calcium/calmodulin kinase kinase- β
Cdk: Cyclin dependent kinase
cFLIP – cellulare FLICE-like inhibitory protein chain 3 alpha
CYP₄₅₀ - Cytochrome P₄₅₀
DAPK – Death associated protein kinase
DHEA - dehydroepiandrosteron
DHT – dihydrotestosteron
DRAM – Damage-regulated autophagy
E3 enzym – Ubiquitine ligase
ER - Endoplasmatisk retikulum
ER α/β – Østrogen reseptor α/β
FIP200 - Scaffold protein FAK-family interacting protein
HIF – Hypoxia-inducible factor
HSV – Herpes simplex virus
IGF-1 – Insuline like growth factor - 1
IGF-BP3 – Insulin like growth factor binding protein 3
IKK – I κ B kinase
KSHV - Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus

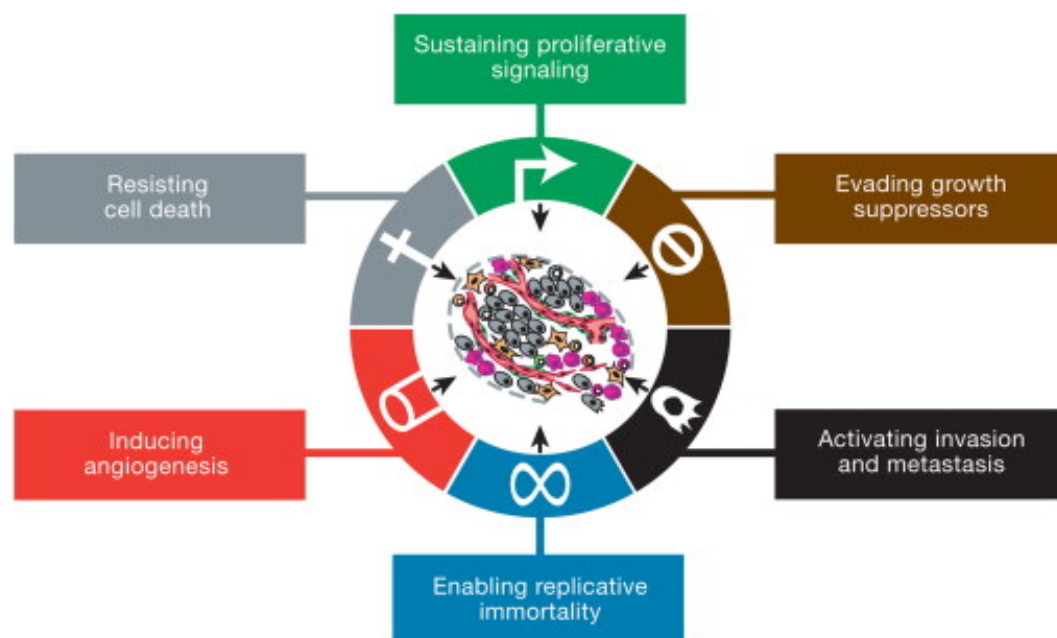
LAMP – Lysosome associated membrane protein
LC3 - microtubule-associated protein 1 light
LDL – Low density lipoprotein
LIR – LC3 interacting region
MAPK – Mitogen activated protein kinase
MCL-1 - Myeloid cell leukemia sequence 1
mTOR - Mammalian target of Rapamycin
NBR1 – Neighbor of BRACA1 gene
NDP52 – nuclear dot protein 52 kDa
NF- $\kappa\beta$ - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Nrf2 – Nuclear factor erythroid derived 2
PI3 - Phosphatidylinositide 3-kinase
PI3P - phosphatidylinositol-3-phosphate
PR – Progesteron reseptor
PTEN - Phosphatase and tensin homolog
Rab GTPase – Rab guanin triphosphates
ROS – Reactive oxygen species
SHGB – Sex hormone binding globulin
SLR – Sequestersome-1-like receptors
StAR - steroidogenic acute regulatory protein
Stbd1 - Startch-binding-domain-containing
TAK1 – Mitogen activated protein kinase kinase kinase 7
TIGAR – TP53 inducible glycolysis and apoptosis regulator
TRAIL – Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
TSC1/2– Tuberos sclerososis 1 / 2
ULK1 - unc-51 like autophagy activating kinase 1
UVRAG - UV radiation resistance associated gene protein
Vps34 – Vacuolar sorting protein 3

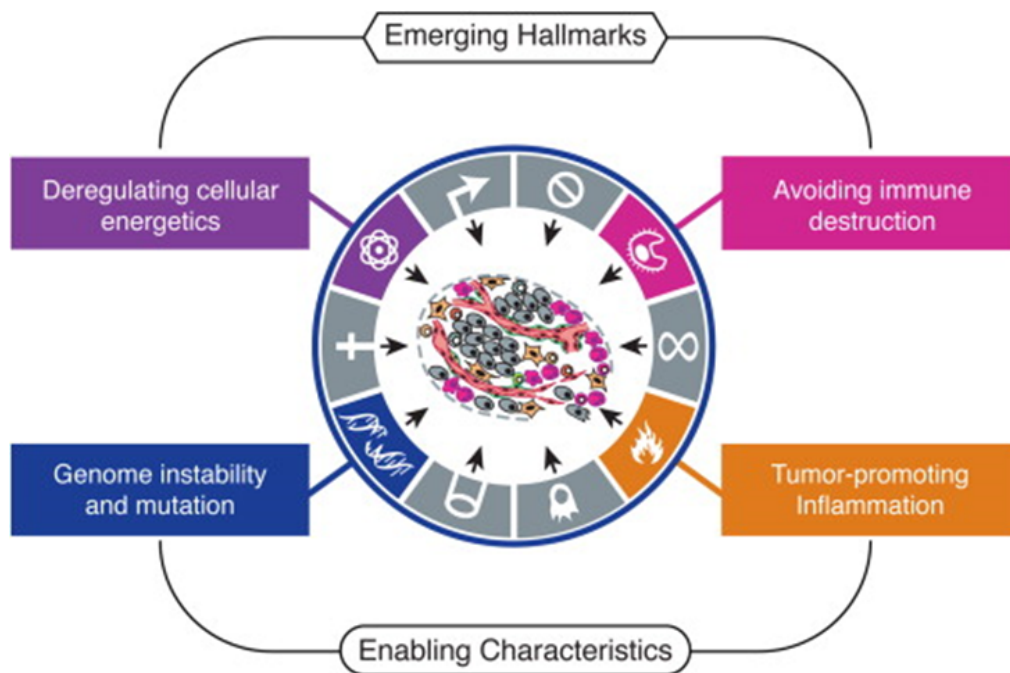
1. Introduksjon

1.1 Kreft

I vår tid er oppfatningen om hva begrepet ”kreftsykdom” innebærer svært varierende. Kreft har blitt et bredt begrep som dekker et stort spekter av sykdomstilstander forårsaket av unormal og ukontrollert cellevekst. Kroppen produserer hele tiden nye celler som erstatning for døde celler, i vevs-tilheling og under vekst av ulike organer. For at en ny celle skal bli til må modercellen gjennom en syklus hvor cellens genomiske materiale, DNAet (arvestoffet), kopieres og celledeling forberedes. Deretter skjer celledelingen hvor av to identiske datterceller dannes. En slik cellesyklus er under kontroll av ulike gener som kan starte og stoppe av cellesyklusen. Under utviklingen av en kreftsykdom har det oppstått en feil slik at kontrollfunksjonen til disse genene ikke lenger fungerer slik de skal, noe som medfører ukontrollert celledeling. Tap av kontrollfunksjon kan dermed føre til en dannelse av en abnormal celledelingsmasse i organet hvor den ukontrollerte celledelingen startet. Dette er dannelsen av en neoplasi (nyvekst), også omtalt som tumorvekst. Av denne grunn er det naturlig at krefttypen blir navngitt ut i fra hvilken celletype den ukontrollerte veksten oppstod i, for eksempel omtales kreft som oppstår i epitelceller som karsinomer, og kreft som oppstår i en del hvite blodlegemer som lymfomer. Så lenge tumormassen er velavgrenset fra omliggende strukturer er dette en benign tumormasse. Cellene i en slik benign tumormasse ligner ofte på cellene i vevet de er utgått fra. Tumorcellene kan derimot utvikle evnen til invadere omliggende vev, løsrive seg fra den primære svulsten for så å føres med lymfe- eller blodårer til andre deler av kroppen. Dette kan føre til at en ny tumor etableres i et annet type vev enn dens opprinnelige, en prosessen kalt metastasering (spredning av kreftcelle). Slike celler er gjerne lite differensierte, det vil si at de bærer lite likhet med cellene i vevet de har utgått fra. Tumorcellenes evne til å invadere omliggende vev, metastasere til andre deler av kroppen og lite differensierte utseende gjør dette til en malign tumormasse. Kreftsykdom oppstår på grunn av en slik malign tumormasse. Skillet mellom benign (godartet) og malign (ondartet) tumormasse er ofte også skillet mellom en god og en dårlig prognose.

Forskning har vist at når en kreftsykdom utvikler seg skjer det mange biologiske forandringer i grunnleggende cellulære prosesser både i den transformerte cellen, men og dens mikromiljø. Disse ulike biologiske forandringene ble oppsummert i den betydningsfulle artikkelen av Hanahan D. og Weinberg R.A. "Hallmarks of cancer" (2000), og i den reviderte utgaven (2011) (*figur 1*) (1,2). Slike "hallmarks" inkluderer i dag endringer i fysiologien nøkkeltrinn i cellen som for eksempel; programmert celledød (apoptose), cellesyklusens forskjellige kontrollpunkter, interaksjoner mellom cellen og det omliggende vev og immunologiske responser og angiogenese (nydannelse av blodårer fra allerede eksisterende blodkar). Videre har vår forståelse vedrørende kreftcellens heterogenitet økt. Vi vet nå at kreftceller opptrer og utvikler seg ulikt fra person til person, i tillegg vet vi at kreftceller i en og samme person viser stor grad av uforutsigbarhet og variasjon. Dette har før til en økt forståelse av viktigheten av å kunne tilby individualisert kreftbehandlingen til hver enkelt kreftpasient.





Figur 1

The Hallmarks of Cancer beskriver de egenskapene en celle må opparbeide seg for å bli en kreftcelle. Bilde 1: Hallmarks of cancer (Hanahan & Weinberg, The Cell 2000) Bilde 2: Hallmarks of cancer: the next generation (Hanahan & Weinberg, The Cell 2000)

1.2 Autofagi og kreftsykdom

De fleste cellulære prosesser som fremmer kreftutvikling er forbundet med cellenes ulike membransystemer. Disse spiller en rolle i å adskille hver enkelt celle fra sine omgivelser, i tillegg til å danne ulike avdelinger (organeller) inne i cellen. Endringer i cellenes membransystemer (membrandynamikk) ligger til grunn for celledeling, intracellulær transport, cellulær signalformidling, cellevandring og flere andre prosesser som kan være skadelige dersom de kommer ut av kontroll. Autofagi (eller autofagocytose) er en fysiologisk prosess som regulerer omsetningen av proteiner og organeller i cellen og som er helt nødvendig for opprettholdelsen av stabilt indre miljø (homeostase) i kroppen. Behov for oppregulert autofagi kan oppstå i situasjoner hvor cellene utsettes for indre eller ytre former for cellulært stress, eller hvis næringsbehovet i cellene er økt. Autofagi er derfor en viktig mekanisme som gjør at svekkede eller skadde celler omfordeler næringsstoffer på en slik måte at vitale prosesser blir prioritert. I hvor stor grad autofagi finner sted i en menneskekropp avhenger blant annet av menneskets alder og helsetilstand, prosessen kan og opp-

nedreguleres etter behov. Situasjoner med behov for økt oppregulert autofagi kan for eksempel oppstå ved infeksjoner av intracellulære patogener (for eksempel bakterier og virus) og ved kreftutvikling. Autofagi kan begrense DNA skade og hindre malignitetsutvikling ved å fjerne ødelagte proteiner og organeller (3–6). Samtidig kan resirkuleringen av næringsstoffer og tilpasningen til økt metabolsk stress fungere til fordel for kreftceller da et slikt krevende miljø gjerne oppstår rundt tumorcellen (hypoksi, næringsmangel økt energibehov ved metastasering) (7–11). I dag er autofagi i søkelyset som et nytt og fremtredende ”Hallmark of cancer” (1) og per dags dato er det mye forskning pågående for å avdekke sammenhengen med kreftutvikling og bruksmulighetene innen kreftbehandling. På grunn av autofagi sin evne til å motvirke genomisk skade og hindre malignitetsutvikling samtidig som det kan tilpasse kreftcellene til metabolsk stress, ansees autofagi som et tveegget sverd i kreftutvikling.

1.3 Hormonregulerende celler og autofagi

Hormoner er et av kroppens viktigste signalsubstanser og er essensielt for regulering av celleproliferasjon og vekst. Kreftsykdom i hormonsensitive organer, som for eksempel bryst og prostata, er blant de vanligste diagnostiserte krefttypene i verden (12). Det finnes flere undergrupper hormoner og en av hovedgruppene er steroidhormoner. Steroidhormonene har en kjent påvirkning på progresjon av både prostata- og brystkreft, men og ytterligere krefttyper. Mekanismen bak denne påvirkningen er derimot i stor grad ukjent. Steroidhormoner har og vist flere forbindelse med regulering av autofagi. Steroidhormonregulert autofagi har blitt påvist i flere utviklingsprosesser i *Drosophila* fluen (13–17) og er forbundet med aktivering av brystkjertelutviklingen til storfe (16,18,19). I en eksperimentell studie av rottetestikler fant man en sammenheng mellom steroidhormoner og autofagi da det forekom en høyere hastighet av autofagi i steroidhormon utskillende Leydig celler sammenliknet med andre celler (20). Store fremskritt har blitt gjort med bruk av hormonerterapi i kreftbehandling. Økt kunnskap om de ulike reguleringsmekanismene til steroidhormoner vil kunne forbedre denne terapien ytterligere. Mye kan tyde på at dette til dels kan oppnås gjennom økt kunnskap om autofagi.

2. Hormoner

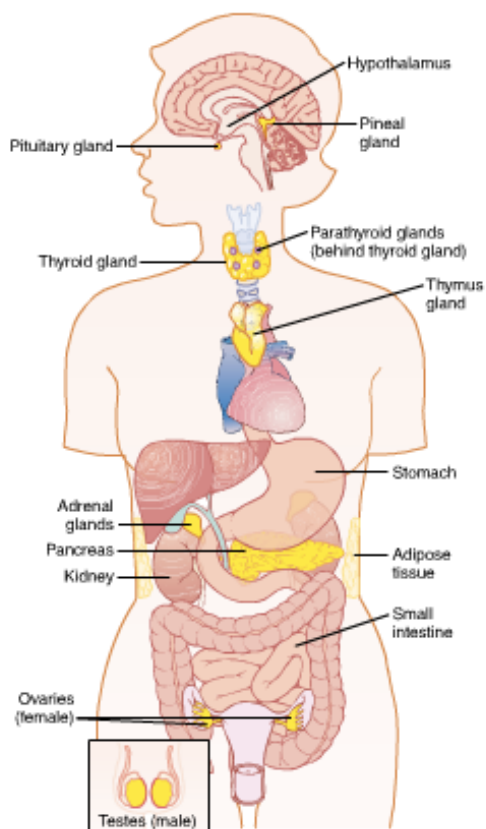
2.1 Kroppens endokrine system

Det endokrine systemet er et av kroppens viktigste kommunikasjonssystemer og er essensielt for vekst, modning og koordinering av ulike reaksjonsveier i kroppen. Systemet er bygd opp av endokrine kjertler og spesialiserte celler i ulike organer, begge med hormonsekreterende egenskaper. Kroppens endokrine kjertler skiller seg fra de eksokrine kjertlene ved at de mangler utførselsgang. Endokrine kjertler sekreterer derfor sine produkter ut i interstitiet hvorpå det diffunderer videre ut i blodbanen (21). Hormoner defineres som kjemiske signalmolekyler som skilles ut i blodbanen. Med blodbanen fraktes de så videre til målorganet hvor de utøver sin virkning ved binding til sin respektive reseptor. Hormoner omfatter alt fra enkle molekyler som aminosyrer og lipider til mer komplekse peptider, proteiner eller molekyler derivert fra kolesterol (21). Ut i fra deres kjemiske egenskaper deles hormonene videre inn i undergrupper. Den største hormongruppen er peptidhormonene. Denne gruppen omfatter proteiner, glykoproteiner og polypeptider. Insulin og glukagon er eksempler på slike hormoner. En annen stor hormongruppe, karakterisert av deres fettløselighet, er steroidhormonene. En tredje gruppe omfatter derivater fra aminosyren tyrosin og inkluderer blant annet stoffskiftehormonet tyroksin og stresshormonet adrenalin (22)

2.2 Steroidhormoner

Dette er en gruppe fettløselige hormoner derivert fra kolesterol, og utgjør en av kroppens største grupper av hormoner. Hovedmedlemmene i steroidhormonfamilien inkluderer kortikosteroider, vitamin D, progesteron, androgener og østrogener. De tre sistnevnte og omtales som kroppens kjønnshormoner (23). Opphavet til alle steroidhormoner er kolesterol. Steroidhormonproduserende cellene syntetiserer noe av dette kolesterolet selv fra acetat, men kolesterol kan og entrer cellen i form av LDL partikler (lipoproteiner). Kolesterolet lagres deretter intracellulært til det blir behov for det. Syntese og sekresjon av steroidhormoner er hovedsakelig lokalisert til binyrebarken, testiklene, eggstokkene og morkaken (*figur 2*), men organer som fettvev, hjerne, hud og lever har og kjent steroidhormon produserende funksjon (21,24). Ved sekresjon transporteres hormonene via blodet til målorganet. På grunn av deres fettløselighet er de avhengig av binding til proteiner for slik transport. Ofte er

slike transportproteiner spesifikke for steroidhormonet de transporterer, som for eksempel kjønnshormonbindende globulin (SHBG) som transporterer kjønnshormonene. Albumin, det dominerende proteinet i blodplasma, er og transportprotein for mange ulike substanser i blodet og fungerer som uspesifikk transportør av steroidhormoner i blod (22). I blodbanen er det kun den frie fraksjonen av et hormon som kan utøve sin effekt på målcellene og det innstilles kontinuerlig en likevekt mellom den bundne og den frie fraksjonen av de fettløselige hormonene. Dette skiller de vannløselige fra de fettløselige hormonene, da bindingen til transportproteiner fungerer som en slags “lagringsform” for hormonet i blodbanen. De vannløselige hormonene har en polaritet som gjør at de kan transporteres fritt i blodbanen uavhengig av transportproteiner og har dermed ikke dette lagringspotensialet (25). Eksempler på slike vannløselige hormoner er peptidhormoner og tyrosinderivatet tyroksin. Konsekvensen av denne forskjellen er at de fettløselige hormonene befinner seg i blodbanen i lengre tid enn vannløselige og utøver derfor en mer langvarig effekt.



Figur 2

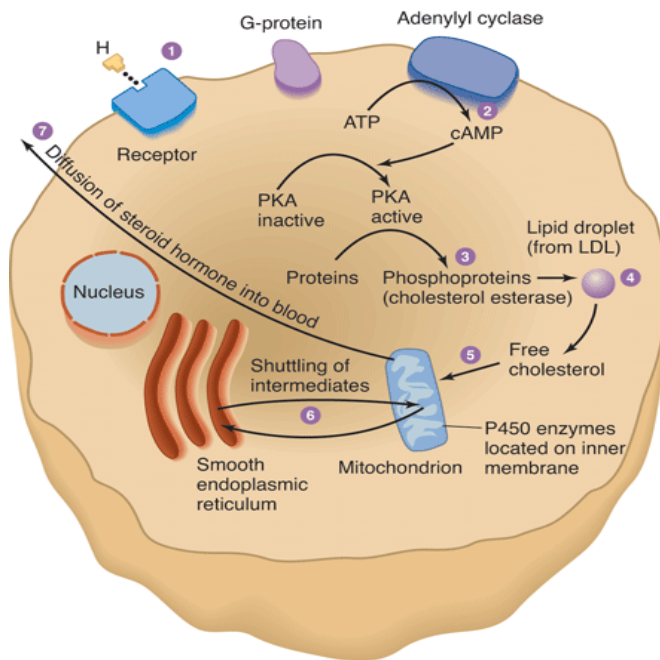
Seter for hoveddelen av hormonsyntesen i kroppen (Guyton & Hall, *Textbook of medical physiology* 11. utg., 2011)

2.3 Utvikling av steroidhormoner

Ulike medlemmer av cytochrome P₄₅₀ enzymfamilien* er viktige regulatorer av flere enzymatiske trinn i syntesen av de ulike steroidhormonene. Dette inkluderer blant annet forkortningen av kolesterlets hydrokarbonkjede og videre hydroksyleringen† av steroidkjernen. Syntesen av steroidhormonene foregår som et samspill mellom mitokondriet og endoplasmatisk retikulum (ER). Igangsettelsen skjer ved at et ekstracellulært stimuli fører til frigjøring av LDL kolesterol fra intracellulære lagre (*trinn 1-4, figur 3*) etterfulgt av at fritt intracellulært kolesterol transporteres fra cytosol til den indre mitokondriemembranen ved hjelp av proteinet StAR. Inne i mitokondriet forkortes karbonkjeden til kolesterolet ved at sidekjeden kuttes av, dette fører til dannelsen av pregnenolon (*trinn 5, figur 3 og figur 6*). Dette er et viktig hastighetsbegrensende trinn i steroidhormonsyntesen og igangsettes av CYP₄₅₀ enzymet 20-22 desmolase. Videre transporteres pregnenolon fra mitokondrie til glatt ER hvor på progesteron eller 17 α -hydroxyprogesteron dannes fra pregnenolon. Denne prosessen katalyseres av henholdsvis 3 β -HSD og CYP₄₅₀ enzymet, 17- α -hydroxylase (*trinn 6, figur 3 og figur 6*). Gjennom flere ”shuttelprosesser” mellom mitokondrie og glatt ER gir så progesteron så opphav til andre steroidhormoner via hydroxyleringsreaksjoner (*trinn 7, figur 3 og figur 6*). I vannløselige hormoner tilfelle vil de ferdigsyntetiserte hormonene midlertidig lagres i membranbundne vesikler i cytosol. Ved ekstern stimulering tømmes de så ut i ekstracellulærvæskene gjennom fusjonering av vesikler og cellemembran. Dette er ikke tilfellet for steroidhormonene. På grunn av steroidhormonenes lipofile (fettløselige) natur kan hormonene diffundere direkte over cellemembranen. Ettersom hormonene er ferdigsyntetisert skilles de derfor direkte ut i blodbanen hvor de så binder seg til sitt respektive transportprotein (23,26).

* **CYP-450 Enzymer:** En ”superfamilie” enzymer hvor alle medlemmene inneholder en essensiell hem-gruppe. De tilhører en stor familie relaterte proteiner som kan feste en OH-gruppe til karbonatomer og som kan delta i kløyvingen av karbon bånd. Enzymene er involvert i en rekke biokjemiske oksidasjonsreaksjoner i kroppen i tillegg til steroidhormonsyntese. Dette inkluderer blant annet metabolismen av legemidler og andre kjemiske substanser i leveren (21,22)

† **Hydroxylering:** Innlemming av et -OH molekyl i et organisk materiale



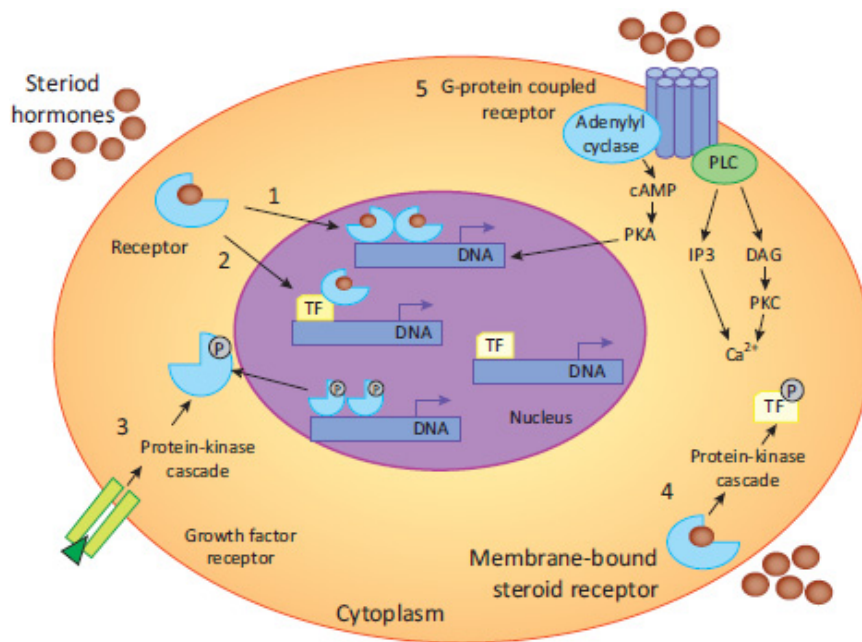
Figur 3

Skjematisk oversikt over utviklingen av steroidhormonene
(Vander's human physiology: the mechanism of human function, 12. utg, 2011)

2.4 Steroidhormonreseptorer

Steroidhormoner har flere måter å utøve sin effekt på (*figur 4*):

1. Steroidhormoner kan binde nukleære reseptorer og regulerer genuttrykk (*punkt 1, figur 4*)
2. Steroidhormon-reseptor komplekset kan binde en transkripsjonsfaktor og dermed indirekte bidra til initiering av transkripsjon (*punkt 2, figur 4*)
3. Steroidreseptoren kan og aktiveres uavhengig av steroidhormonbinding. Eksempelvis ved at en aktivert kinase fosforylerer og aktiverer reseptoren som videre kan transporteres inn i kjernen for så å binde og regulerer DNA (*punkt 3, figur 4*) (27).
4. Steroidhormoner kan utøve en ikke-genomisk regulering ved binding til steroidreseptorer i cytoplasma, membranassosierte reseptorer eller overflatereseptorer. Disse aktiverte reseptorene kan videre påvirke ulike intracellulære reaksjonsveier (*punkt 4-5, figur 4*).



Figur 4

Steroidhormonreseptorens molekylære virkningsmekanismer. TF: transkripsjonsfaktor, cAMP: cyklisk AMP, PKA: protein kinase A, PLC: phospholipase C, IP3: Inositol 1,4,5-triphosphate, DAG: dycilglycerol, PKC: protein kinase C. (Laurentino S, Pinto P, Correia S. *Structural variants of sex steroid hormone receptors in the testis: from molecular biology to physiological roles*)

Den klassiske måten steroidhormoner utøver sin effekt på er gjennom regulering av genuttrykk ved å binde spesifikke intracellulære reseptorer (*punkt 1-2, figur 4*). Steroidhormon reseptorene hører derfor til en superfamilie reseptorer som fungerer som transkripsjonsfaktorer*. Reseptorene er bygd opp av forskjellige domener (områder) med ulike egenskaper. Dette inkluderer blant annet domener med DNA-bindende egenskaper, domener som binder ko-regulatorisk kompleks† og domener som binder selve steroidhormonet. Per dags dato utgjør steroidhormon reseptorene en familie på 48 reseptorer. Majoriteten av steroidhormon reseptorene er nukleære reseptorer som allerede er bundet til DNA i kjernen, selv i fravær av ligand‡.

* **Transkripsjonsfaktor:** Et generelt begrep brukt for å beskrive et hvilket som helst protein som er nødvendig for å initiere gentranskripsjon.

† **Ko-regulatoriske kompleks:** Proteinergrupper med en regulatorisk rolle. Samarbeider om å skru av eller på genuttrykk nedstrøms for deres regulatoriske bindingssete (domene) på DNA-tråden.

‡ **Ligand:** Molekyl/ion som binder reseptor og induserer cellulær respons

Som beskrevet ovenfor er det er steroidhormonenes lipofile natur som gjør diffusjon over cellemembraner og binding til slike intracellulære reseptorer mulig. Det finnes også intracellulære steroidhormonreseptorer som er lokalisert til cytosol, i dette tilfellet dannes et hormon-reseptor kompleks i forkant av videre diffusjon inn i kjernen og binding til DNA. Uansett lokalisasjon er den inaktive reseptoren bundet til inhibitoriske komplekser. Ved binding av ligand endres så konformasjonen til reseptoren og det inhibitoriske komplekset forsvinner. Hormon-reseptor komplekset er da klart til å utøve sin effekt. Videre binder komplekset det hormonresponsive domene på DNA tråden og ved hjelp av ulike ko-regulatoriske molekyler regulerer dermed steroidhormon-reseptor komplekset hvilke gen som kommer til uttrykk (23,25). Responsen på denne ligandmedierte reseptoraktivering er dessuten nøye regulert blant annet på transkripsjonelt-, post-transkripsjonelt- og post-translasjonelt nivå (28). Flere gener kan være underlagt kontrollen av en reseptortype og aktivering av reseptoren fører nødvendigvis ikke alltid til oppregulering av et genuttrykk, men kan stimulere til nedregulering.

I tillegg til reaksjonsveien med binding til den nukleære reseptoren har og noen av steroidhormonene reseptorer som og er plassert i plasmamembranen. Dette gjelder blant annet progesteron og østradiol (*punkt 4, figur 4*). I tilfellene hvor steroidhormonet binder disse reseptorene er det en rask-, ikke genomisk respons som formidles. Det vil si en effekt som formidles uavhengig av gentranskripsjon og proteinsyntese som for eksempel aktivering av en protein kinase kaskader. Dette står i kontrast til den mer tidskrevende prosessen som kreves for å utføre en respons avhengig av syntesen av et nytt effektorprotein (21,23).

2.5 Kjønnshormonene

Denne steroidhormon undergruppen syntetiseres i stor grad i kjønnsorganene; eggstokkene, testiklene og morkaken. En liten andel produseres og i binyrebarkens innerste og midterste lag, henholdsvis zona reticularis og zona fasciculata. Dette gjelder hovedsakelig androgenene dehydroepiandrosteron (DHEA) og androstendion som er et mindre potent androgen enn testosteron og dihydrotestosteron (DHT). DHEA og androstendion kan derimot omdannes ved hjelp av enzymatisk aktivitet i perifert vev til både testosteron, DHT og østradiol (23) (*figur 6*). Denne perifere

omdannelsen har i nyere tid gitt flere organer, som tidligere har vært lite studert innen endokrinologi, mye oppmerksomhet for dets kjønnshormonproduserende rolle. Fettvev, hjernen, beinvevet og huden bidrar med betydelige mengder av visse kjønnshormoner til sirkulasjonen. Fettvevet, hjernen og beinvevet produserer blant annet CYP₄₅₀ enzymet aromatase, et enzymet som omdanner androgener til østrogener, og deltar dermed i dannelsen av østrogener (29). Hud, og da særlig talg – og svettekjertlene, bidrar til testosteronproduksjon ved å omdanne sirkulerende forstadier som DHEA og androstendion (30). Omdannelsen av androstendion til testosteron katalyseres i huden av type 5 17β -HSD isoformen, et enzym som også finnes i større doser i hårfolliklene. Type 1 5α -reductase isoformen er videre ansvarlig for omdannelsen av testosteron til det mer potente androgenet DHT (*figur 6*) (30,31).

2.5.1 Androgener

2.5.1.1 Produksjon

På grunn av dets evne til å stimulere til utvikling av mannlig kjønnskarakteristika og muskelvekst er androgener en fellesbetegnelse for steroidhormoner med maskuliniserende effekt. Dette inkluderer blant annet de mannlige kjønnshormonene testosteron, DHT, DHEA og androstendion, i tillegg til andre naturlige og syntetiske stoffer med testosteronlignende virkning. Hos menn syntetiseres androgener i størst grad i testiklene og testosteron utgjør det dominerende androgenet. Det er Leydig cellene, lokalisert i bindevevet omkring sædlederne, som står for produksjonen av testosteron i testiklene. Det foregår og en viss produksjon av androgener i binyrebarken, men disse har en såpass liten biologisk effekt at de ikke forårsaker noe videre utvikling av mannlig karakteristika, men kan som nevnt i forrige avsnitt omdannes til mer potente androgener i perifert vev (23).

2.5.1.2 Metabolisme

Etter sekresjon kan testosteron tas opp i vevet og omdannes videre til to ulike metabolitter, enten det mer potente androgenet DHT eller det kvinnelige kjønnshormonet østradiol (*figur 6*). Omdannelsen av testosteron til DHT foregår i vev som prostata, lever og hud ved hjelp av enzymet 5α reductase I/II (23,24). Den alternative metabolismeveien er omdannelsen av testosteron til østradiol ved hjelp av

aromatase enzymet (24). Aromatase har og evnen til å konvertere andre androgener til deres respektive østrogener. Dette enzymet uttrykkes blant annet i testiklene og tilhørende organer hos menn, men andre deler av kroppen til menn er og med på dannelsen av større doser østrogener fra testosteron og androstendion. Eksempel på slike organer er hjernen, beinvev og fettvev (29). Kun en liten andel av testosteron (ca. 0,2 %) omdannes til østradiol, men siden østradiol er svært mer potent enn testosteron muliggjøres dermed viktige østradiolmedierte responser i kroppen gjennom østradiols binding til østrogenreseptorene ER α og ER β (24). Androgener metaboliseres til slutt til inaktive metabolitter i lever, nyre, tarm, muskel og fettvev for så å skilles ut med urinen eller galle (32).

2.5.1.3 Biologisk effekt

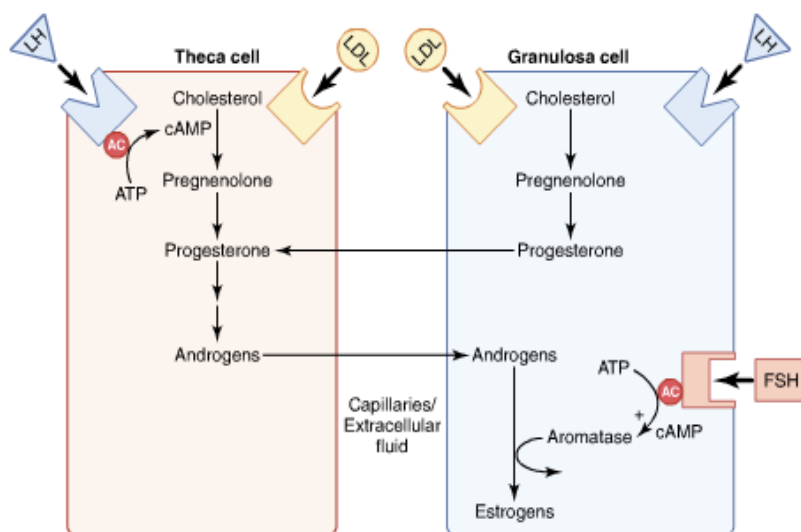
Den viktigste biologiske effekten til androgener medieres gjennom binding til androgen reseptor (AR) og videre regulering av transkripsjon og genuttrykk av androgenresponsive gener. Utrykk av slike gener sørger for produksjon av proteiner nødvendig for at testosteron sin virkning utføres. Testosteron er blant annet essensielt for utviklingen av det mannlige reproduksjonsorganet og sekundære kjønnskarakteristika som kroppshår, stemmeskiftet og hudtykkelse. Testosteron forårsaker og en økning i muskelmasse og bentetthet. I tillegg er det et hormon viktig for lengdeveksten, da testosteron forårsaker lukking av epifyseskivene etter en siste stimulering til vekst mot slutten av puberteten. Testosteron påvirker og elektrolyttbalansen i kroppen ved å føre til en liten økning i saltkonsentrasjonen, forårsaker en økning i kroppens metabolisme og stimulerer til dannelse av røde blodceller (32). Med andre ord er testosteron et hormon med mange svært viktige roller innen utviklingen av en normal og sunn kropp.

2.5.2 Østrogener

2.5.2.1 Produksjon

Østrogener er en fellesbetegnelse som omfatter de kvinnelige kjønnshormonene østradiol, østron og østriol. Østrogenreseptoren har større affinitet for østradiol enn de andre overnevnte østrogenene, men nivåene i kroppen av de forskjellige østrogenene varierer svært i forhold til omstendighetene. Alle østrogener syntetiseres fra

androgener ved hjelp av enzymet aromatase. Hos kvinner er det hovedsakelig ovariene som står for østrogenproduksjonen, men små mengder syntetiseres også i binyrebarken. I ovariene foregår syntesen i et samspill mellom i thecacellene og granulocellene i eggstokkens follikler. Thecacellene stimuleres til sekresjon av androgener som videre omdannes til østrogener i de aktiverte granulosa cellene ved hjelp av aromatase (figur 5). I ovariene er det i stor grad østrogenet østradiol som produseres. Østron produseres og til en viss grad her, men syntetiseres ellers i hovedsak i perifert vev gjennom omdannelsen av androgener sektrert fra binyrebarken og ovariene. På samme måte som østrogener ikke er unike for kvinner er ikke androgener unike for menn. Androgener sektreres i små doser fra kvinnens ovarier og i større grad fra binyrebarken. Noen av disse androgenene kan på samme måte som hos menn videre omdannes til østrogener i ulike vev som inneholder aromatase enzymet, mens andre binder AR (21,33).



Figur 5

Interaksjon mellom follikulære theca- og granulosa celler ved østrogenproduksjon. AC: adeny cyclase, ATP: adenosin trifosfat, cAMP: cyclic adenosine monophosphate, LDL: low-density lipoprotein (Guyton & Hall textbook of medical physiology. 12. utg, 2011)

2.5.2.2 Metabolisme

Etter frigjøring til blod kan de mest potente østrogenene, østradiol og østron, metaboliseres i lever til det mye svakere østrogenet østriol. Østradiol er 12 ganger så potent som østron og 80 ganger så potent som østriol. Hoveddelen av østriol

produseres ved graviditet og sekreseres da fra placenta. I leveren metaboliseres østrogenene videre til vannløselige metabolitter som siden utskilles fra kroppen med gallen eller gjennom nyrene (32).

2.5.2.3 Biologisk effekt

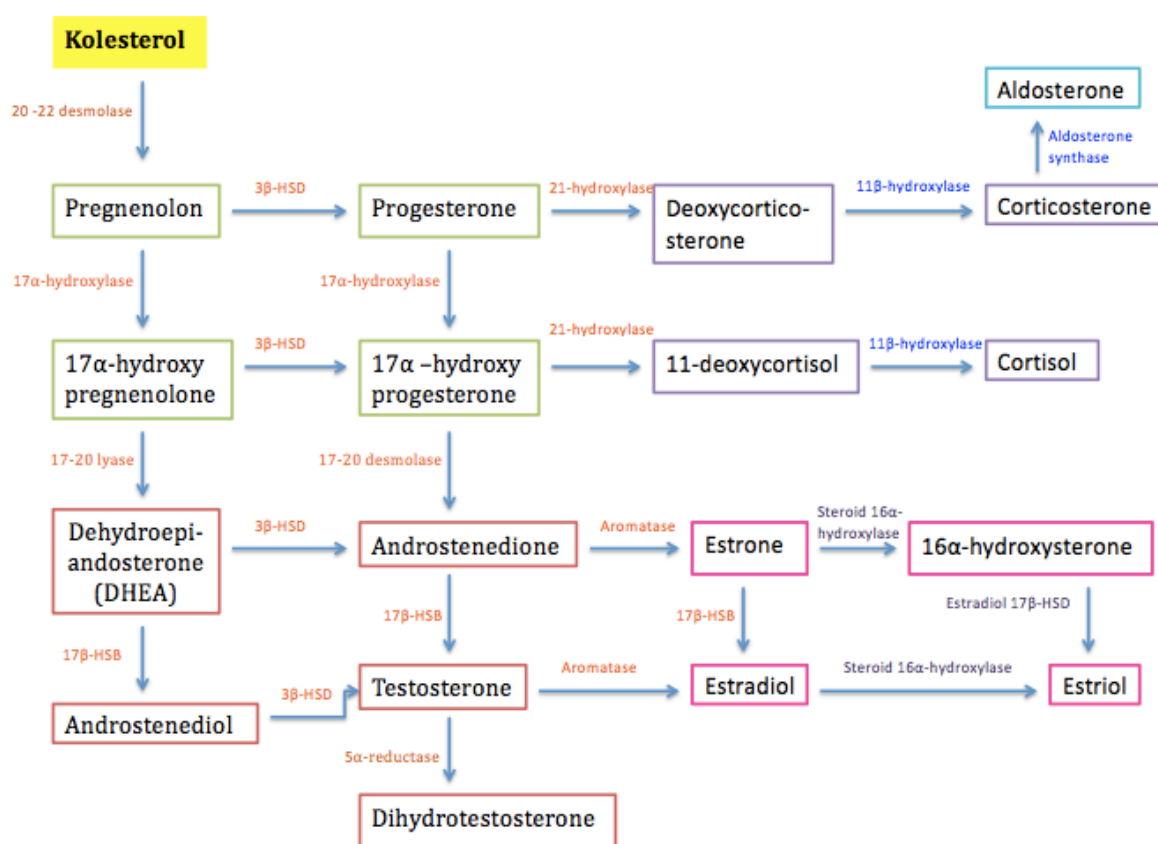
Østrogen er, som androgen hos menn, avgjørende for utviklingen av kvinnelige primære og sekundære kjønnskarakteristika under puberteten. Østrogen utfører sin effekt ved binding til en av de to hoved undergruppene av østrogenreseptorer, ER α eller ER β . En av hovedfunksjonene til østrogenene er å stimulere til utvikling av det kvinnelige kjønnsorganet. Østrogen igangsetter også utvikling av bryster og muliggjør melkeproduksjon. I tillegg hemmer østrogen osteoklastaktivitet (celler som bryter ned beinvev) og stimulerer dermed til beinvekst. Østrogen stimulerer også til lukking av epifyseskivene, noe som foregår på et mye tidligere stadium enn hos menn. Østrogen øker og metabolismen, men ikke i like stor grad som hos menn. Isteden forårsaker østrogen en stor deponering av fett i subkutant vev, og er dermed en viktig for dannelsen av den kvinnelige figuren. På lik linje med testosteron hos menn kan østrogen og bidra til en viss grad av saltretensjon i nyrene (32). Androgen som ikke omdannes til østrogen spiller og en viktig rolle innen kvinnens fysiologi ved å blant annet påvirke vekst av kroppshår, muskelvekst og libido (21).

2.5.3 Progesteron

2.5.3.1 Produksjon og biologisk effekt

Progesteron er i stor grad kjent som et kvinnelig kjønnshormon da det i all hovedsak sekreseres i siste halvdel av menstruasjonssyklusen til ikke-gravide kvinner. Sekresjonen skjer fra eggstokkens corpus luteum, også kjent som det gule legemet. Dette er en midlertidig endokrin struktur som dannes etter at egget frigjøres fra follikkelen under eggløsningen. Hos gravide er morkaken en viktig kilde til progesteronproduksjon. Dette hormonet er essensielt for modningen av endometriet under menstruasjonssyklusen, for graviditeten og utvikling av brystene. I tillegg til dette fungerer progesteron som utgangspunktet for syntesen av androgen og østrogen i vev med de aktuelle enzymene nødvendig for omdannelsen til disse

hormonene (figur 6) (21,32). Syntesen av progesteron er dermed ikke kun begrenset til kvinnelige kjønnsorganer. Hormonet spiller også en viktig rolle hos menn (34). Hjernen har opp gjennom flere år fått oppmerksomhet på grunn av dens evne til *de novo* dannelse av progesteron eller *in situ* dannelse fra metabolitter i blod (35,36) og progesteron er antatt å ha en nevrobeskyttende rolle. Progesteron har og flere antatte viktige funksjoner i kroppen. Dette inkluderer blant annet en rolle innen opprettholdelsen av ionebalansen, hukommelsen, immunforsvaret og reguleringen av synaptisk aktivitet. Progesteron er derfor i dag ansett som mer en kun et reproduksjonshormon (37).



Figur 6

Steroidhormonsyntesen. Inkluderer essensielle enzymatiske trinn i syntesen av kjønnshormoner, glukokortikoider og mineralokortikoider fra kolesterol. *Grønn boks* – progestagener; *Rød boks* – androgener; *Lilla boks* – mineralokortikoider; *er*; *Rosa boks* – østrogener; *Orange enzym* – mitokondrielt; *Blått enzym* – glatt ER. (Thea Grindstad)

2.6 Steroidhormoners rolle i kreftutvikling

Steroidhormoner bidrar i reguleringen av celleproliferasjon, -overlevelse og – utvikling. Flere viktige mekanismer er aktivert under kopiering av genomet for at prosessen skal være så nøyaktig som mulig, og for at eventuelle feil rettes opp. En hyppig celleproliferasjon øker sannsynligheten for at enkelte av disse mekanismene svikter og genetiske feil oppstår. En opphopning av slike tilfeldige genetiske feil gjennom utallige cellyklusser legger grunnlaget for kreftutvikling (28,38). En feilregulert respons ved steroidhormonstimulering kan oppfattes som vekststimuli medføre kreftutvikling. Kreftutvikling i steroidhormonresponsive organer, som for eksempel bryst- og prostatakraft, er blant de vanligste diagnostiserte krefttypene i den vestlige verden (39), det er og velkjent at endometriekraft er assosiert med dysregulert steroidhormonrespons (40). Steroidhormoner antas derfor å spille en viktig rolle i utviklingen av flere kreftsykdommer, men kunnskap om de cellulære prosessene bak steroidhormonregulert kreftutvikling er mangelfull. Det hersker derimot liten tvil om at slik kunnskap vil kunne danne et viktig grunnlag for nye behandlingsmetoder fremover. Så langt har hormonterapi vært et stort bidrag til kurativ behandling i flere krefttyper, i tillegg til å redusere antall pasienter med sykdomstilbakefall og dermed forlenge levetiden (41). Så mye som 80% av brystkrefttilfellene er østrogenreseptorpositive og hos slike pasienter antas østrogenet å stimulere til proliferasjon av epitelceller i brystet (28). Så langt har derfor endokrin behandling vært en av de viktigste behandlingsformene i brystkreftbehandling (42). På tilsvarende måte har ulike former for anti-androgen behandling blitt brukt mot prostatakraft for å motvirke den proliferative rollen androgener utøver på prostatakjertelen. Den nøyaktige mekanismen bak denne prosessen er derimot fremdeles ukjent (43). Tilstedeværelsen av østrogenreseptorene (α og β) (44) og progesteronreseptorene (A og B) (45) i prostata har blitt påvist. Selv om disse reseptorene og antas å utøve en viktig rolle i organet er, er deres rolle i utviklingen av prostatakraft fortsatt uklar. Dysregulering av steroidhormonene er videre assosiert med kreftutvikling i organer som til vanlig ikke assosieres med hormonsensitivt vev. Dette inkluderer blant annet lunge- (46), lever- (47) og kolorektal kraft (48), men så langt har ikke hormonterapi fungert som effektiv behandlingsform av disse krefttypene (28).

Et velkjent problem med hormonterapi innen prostata- og brystkreft, som innen de fleste krefttyper, er utviklingen av resistens (49–51). Tilsynelatende evner

tumorcellene som overlever den initiale behandlingen å utvikle en uavhengighet fra hormonet som det blokkeres for. Kreftcellen kan dermed fortsetter å stimulere til celleproliferasjon og vekst. Årsaken til en slik resistens antas å skyldes utvikling av ulike fenotyper i kreftcellen som grovt kan kategoriseres som: 1) reseptorpositiv – ligandavhengige, 2) reseptorpositiv – liganduavhengige eller 3) reseptornegativ-liganduavhengige. Når først tumorcellene har ervervet seg slike egenskaper er dette forbundet med mer aggressiv tumorvekst og en svært dårligere prognose (52–56). Mekanismen bak utviklingen av slike fenotyper og behandlingsresistens er fremdeles til dels uavklarte og er sannsynligvis en kompleks prosess som inkluderer ulike signalleringsveier og vekstfaktorer. Jo større kunnskap vi tilegner oss om mekanismer bak utviklingen av resistens og de ulike kreftcellefenotypene, jo mer skreddersydd vil hormonterapien som tilbys de ulike pasientgruppene være.

3. Autofagi

3.1 Funksjon

Et fenomen som har vekt stor interesse innen kreftforskningen i nyere tid er *autofagi*. Direkte oversatt betyr dette ”å spise seg selv”. Dette er en alternativ, ikke-apoptotiske cellulær degraderingsvei som spiller en viktig rolle innen utvikling, i normale fysiologiske situasjoner, men og i ulike sykdomsprosesser. Autofagi innebærer dannelse av en dobbelmembran, autofagosomet, som omslutter komponenter i cellen som skal degraderes. Autofagosomet med sitt innhold fusjonerer så med lysosomer* hvorpå innholdet blir degradert, resirkulert og transportert tilbake til cytoplasma. Her kan produktene så gjenbrukes i metabolismen eller som byggeklosser for ulike molekyler. Autofagi fungerer derfor som en resirkuleringsmekanisme som genererer ATP og begrenser skadeomfang ved å fjerne ødelagte og ikke-funksjonelle cellulære komponenter (57). Andre mekanismer bidrar og til den cellulære opprydningen, som for eksempel proteasomet[†]. I motsetning til proteasomet som virker i kortere tidsrom og håndterer mindre proteiner med kortere levetid, spiller autofagi en essensiell rolle

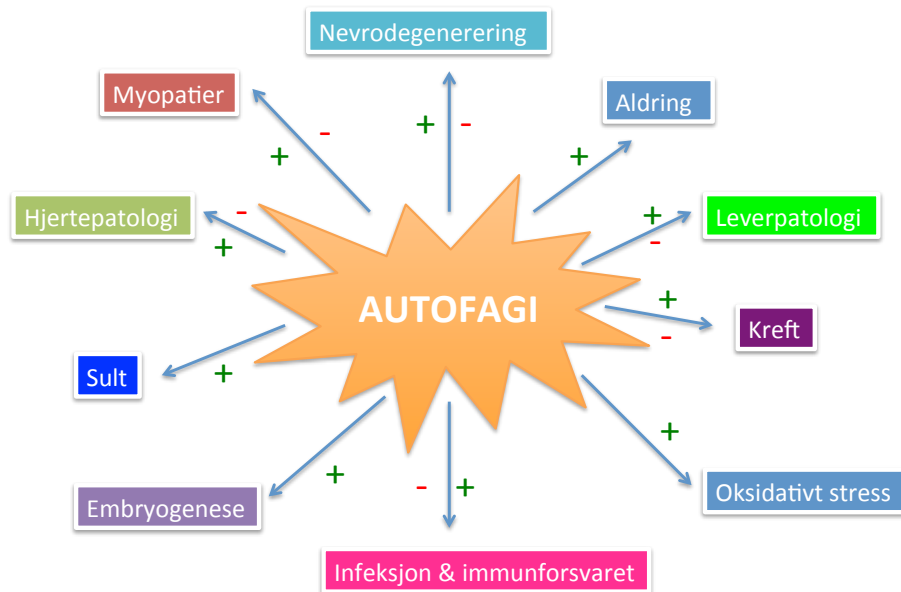
* **Lysosomer:** membranøse vesikler i cellens cytosol som inneholder rundt 40 spesialiserte fordøyelsesenzymmer (hydrolytiske enzymer). Disse er særlig viktige innen degradering av ekstracellulære partikler og molekyler tatt opp i cellen gjennom endocytose eller eventuelt fagocytose i spesialiserte fagocytterende celler, men kan og degradere ulike intracellulære komponenter som lipider, proteiner, nukleinsyrer gjennom sin fusjonering med autofagosomet (111)

[†] **Proteasom:** Store proteinkomplekser som bryter ned intracellulære proteiner

for håndteringen av større proteinaggregater. I tillegg assisterer autofagi proteasomet under særlige stressende situasjoner (57). Av disse grunnene er autofagi viktig for opprettholdelsen av kroppens homeostase og foregår derfor kontinuerlig på et lavt basalt nivå i cellene som kan oppreguleres ved behov. En slik oppregulering er særlig viktig i situasjoner med økt cellulært stress som for eksempel ved mangel på næringsstoffer, lave vekstfaktor nivåer og hypoksi (oksygen mangel). Autofagi aktiveres da som en adaptiv katabolsk prosess hvor nødvendige metabolske komponenter som aminosyrer og fettsyrer resirkuleres (58). Ved å fjerne og resirkulere ødelagt eller skadde organeller som mitokondria, kroppens hovedkilde til ROS, beskytter og autofagi mot oksidativt stress*. Oksidativt stress kan være farlig for cellen blant annet gjennom evnen til å indusere DNA-skade og kromosomal ustabilitet. I tillegg fremmer autofagi eliminering av patogener og presentasjon av antigener på celleoverflaten (57). Mange assosiasjoner mellom defekt autofagi og ulike sykdommer som kreft, nevrodegenerering, mikrobielle infeksjoner, kardiomyopati, autoimmunitet og diabetes i tillegg til aldring, har blitt påvist (*figur 7*) (59). Blant annet har mangelfull evne til å eliminere proteinaggregater gjennom autofagi blitt assosiert med flere sykdomsmekanismer; ansamling av Mallory-Denk legemer i lever, ubiquitinerter[†] og muterte proteinaggregater i hjernen og α 1-antitrypsin aggregater i lungene og andre organer (4,60,61).

* **Oksidativt stress:** En tilstand med ubalanse mellom ROS og antioksidanter i cellen. Dette kan potensielt ødelegge cellens levedyktighet da høye nivåer av ROS kan forårsake irreversibel skade på lipider, proteiner og DNA.

[†] **Ubiquitinerer:** En posttranslasjonell modifisering hvor det lille regulatoriske proteinet ubiquitin fastes på substratproteinet. Denne koblingen kan affisere proteinet på ulike måter: Det kan signalere degradering av proteinet, endre dens cellulære plassering og påvirke proteinets egenskaper og interaksjoner. Ubiquitinerer foregår vha. ubiquitin-aktiverende enzymer (E1), ubiquitin-konjugerende enzymer (E2) og ubiquitin ligase (E3) (187).



Figur 7

Ulike fysiologiske og patologiske prosesser under påvirkning av autofagi. Autofagi kan fungere som en cytoprotektiv mekanisme som beskytter mot ulike sykdommer og dysfunksjonell autofagi kan føre til sykdom. I andre tilfeller kan selve autofagiprosessen være skadelig. (Thea Grindstad).

På grunn av de overnevnte egenskapene har autofagi i stor grad blitt regnet som en overlevelsesfunksjon i cellen, men funn av økning i autofagimarkører ved celledød har bidratt teorien om at autofagi kan være involvert i en ny type celledød (type II celledød) som skiller seg fra den mer velkjente apoptotiske celledøden (type I celledød). Bakgrunnen for en slik autofagimediert celledød kan omfatte aktiv degradering av essensielle cellulære komponenter frem til det punktet hvor cellen ikke lenger kan overleve (62). Om autofagi fremmer celledød eller beskytter cellen mot celledød i stressende situasjoner kan vise seg å være avhengig av den cellulære konteksten. Forståelsen av autofagi sin rolle i normalfysiologi og sykdomsutvikling har økt betydelig i løpet av de siste årene, men det er fortsatt mye kunnskap om autofagi og dens reguleringsmekanismer som må erverves før dette kan implementeres i ulike behandlingsregimer.

3.2 En trinnvis prosess

Autofagi kan sees på som en kompleks, nøye regulert, trinnvis prosess delt inn i 6 hovedtrinn:

- 1) Initiering
- 2) Nukleation - phagophoredannelse
- 3) Elongering - autophagosomdannelse
- 4) Lukking
- 5) Modning – autophagolysosom dannelse
- 6) Degradering

Det innledende steget inkluderer dannelse av en dobbelt membran, phagophoret, gjennom ansamlingen av organeller og andre komponenter i cytosol i en isoleringsmembran. Det eksisterer en viss usikkerhet rundt hvilket materiale som er utgangspunktet for dannelsen av denne membranen. Hoveddelen antas å stamme fra ER membraner, men andre membranstrukturer i cytosol som Golgi og mitokondriet antas å være involvert. *De novo* dannelse av autophagosommembranen er heller ikke utelukket (63). Gjennom fusjonering av endene til slike membraner utvikles vesikler med dobbeltmembran, dette er selve autofagosomet. Autofagosomer gjennomgår så en modningsprosess som inkluderer fusjonering med lysosomer og/eller endosomer med surt miljø. Tilslutt fører dette til fusjonering av innholdet fra cytoplasma med innholdet i lysosomet og videre degradering og resirkulering (*figur 8*) (57).

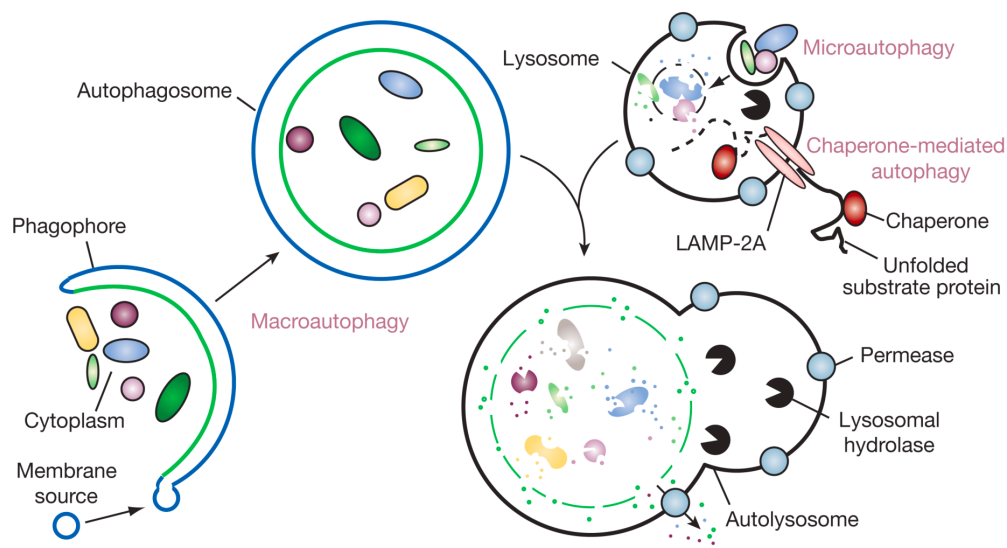
3.3 Tre former for autofagi

Det finnes tre former for autofagi som skiller seg fra hverandre i måten de frakter materialet som skal degraderes til lysosomet på (*figur 9*): Makro-autofagi, mikro-autofagi og chaperone*-mediert autofagi (CMA). Generelt sett beskrives makro-autofagi som autofagi, prosessen beskrevet i forrige avsnitt er makro-autofagi. Ved mikro-autofagi tas komponentene direkte opp i lysosomet fra cytosol gjennom invaginering av den lysosomale membranen. Proteiner i cytosol kan og degraderes gjennom CMA. I visse cellulære situasjoner, som for eksempel ved cellulær stress, interagerer et cytosolisk chaperone ("gjeter") protein med proteinet som skal degraderes. Komplekset dirigeres deretter mot lysosommembranen hvor det binder et protein kalt LAMP-2A. Bindingen fører til translokasjon av komplekset over

* **Chaperone proteiner:** Proteingruppe med funksjonell likhet. Involvert i energikrevende reaksjoner som bidrar til folding av nysyntetiserte proteiner til deres endelige form. Kan og delta i aktiv degradering av andre proteiner gjennom dirigering av substrat-proteinet til overflaten av lysosomet.

membranen og påfølgende degradering i lysosomet (64). Denne degraderingsveien skiller seg fra mikro- og makro-autofagi ved at det ikke foregår noen vesikkeldannelse.

Autofagi kan være både en selektiv og en ikke-selektiv prosess. Selektiv autofagi skiller seg fra den generelle, ikke-selektive autofagien ved at de cellulære komponentene som skal degraderes gjenkjennes av spesifikke reseptor proteiner som fungerer som brobyggere ved å interagerer med både den cellulære komponenten og det voksende phagophoret (65). CMA er en form for selektiv autofagi. Selv om det ikke foregår noen phagophore dannelse skjer det en seleksjon av proteiner som skal degraderes ved at chaperone proteinene binder proteiner i cytosol med spesifikke peptid sekvenser for så å binde den spesifikke reseptorer på lysosomet (LAMP-2A) (65). Selektiv autofagi kan videre deles inn i flere undergrupper avhengig av substratet som skal degraderes. Mitofagi refererer til den spesifikke autofagien av dysfunksjonelle mitokondrier som har mistet sitt potensiale. På grunn av mitokondriets viktige rolle innen ROS-generering kan denne eliminering være en potensiell måte å redusere ROS nivåene i cellen på. Andre undergrupper er den selektive degraderingen av organeller som peroxisomer (paxofagi), bakterie og virus (xenofagi), ribosomer (ribofagi) og ER (retikulofagi) (65).



Figur 9

De ulike typene autofagi. Microautofagi, Macroautofagi og Chaperone-mediert autofagi (Mizushima et al., Nature 451, 2008)

3.4 Autofagimaskineriet

En nøye regulert autofagiprosess er svært viktig. Konsekvensen av svikt i autofagimaskineriets og deregulert autofagiaktivitet kan by på flere problemer og potensielt skade cellen. Forskning som fremmer vår forståelse rundt den komplekse prosessen som regulerer autofagi er under stadig utvikling. På grunn av den viktige rollen innen opprettholdelse av kroppens normale fysiologi responderer autofagimaskineriet på stimulering av faktorer som signaliserer miljøendringer i kroppen (66). Slike faktorer er blant annet med på å regulere autofagi relaterte gener (Atg) som koder for det intracellulære maskineriet, en nødvendighet i dannelsen av autofagosomet og utførelsen av autofagiprosessen (57). Disse proteinene ble først identifisert i gjær. Proteiner ekvivalente til disse står for reguleringen av autofagi hos mennesker (67). Forskning avdekke stadig nye krysninger mellom autofagi og regulatoriske reaksjonsveier involvert i apoptose og cellulær homeostase som mTOR, p53, RAS, Bcl-2 og Beclin 1 (1).

3.4.1 Autofagi initiering, phagophore dannelse og mTOR nettverket

3.4.1.1 Initiering

Initiering av autofagi kontrolleres av ULK1 kinase komplekset som består av ULK1 (den humane homologen til Atg1), Atg13, Atg101 og FIP200 (den humane homologen til Atg17) (*figur 8*) (68,69). Dette trinnet er under nøye regulering av mTOR (*figur 8, figur 10*), en reaksjonsvei kjent som en av hovedregulatorene av autofagimaskineriet. mTOR er et sentralt metabolsk integreringspunkt i cellen som matcher vekstsignaler med energitilgjengelighet. mTOR signalveien består av to komplekser mTORC1 og mTORC2, aktivering av komplekset stimulerer i friske celler til cellevekst når det er tilstrekkelig med metabolitter og energi tilgjengelig i cellene. Overuttrykk av komponentene i mTOR komplekset har demonstrert flere forbindelser til kreftutvikling (70). En aktivert mTOR reaksjonsvei vil føre til negativ regulering av autofagi gjennom fosforylering av Atg13, hvilket hemmer interaksjonen med ULK1 (69). Ved inhibering av mTORC1 kinase aktivitet muliggjøres autofagi gjennom fosforylering av Beclin 1 (*figur 8*) (71).

3.4.1.2 Beclin 1 – interagerende kompleks og nucleation

Beclin1 komplekset er et makromolekylkompleks viktig for det neste trinnet i aktiveringen av autofagi, nucleation. Kjernen i komplekset er bygd opp av Beclin 1 proteinet (den humane homologen til Atg6), VPS34 (klasse III PI3K) og VPS15 (PI3K regulator) (72). Stimulering øker kompleksets katalytiske aktivitet og fremmer autofagosomdannelse gjennom invaginering av membranen ved domener som er rike på PI3P, også kjent som omegasomer. Dette er et essensielt ledd i rekrutteringen av ytterligere Atg'er, elongering av phagophoret og dannelsen av isolasjonsmembranen (*figur 8*) (73).

Beclin 1 proteinet tilhører en undergruppe av apoptose regulatoriske proteiner kalt BH3-only familien (74). Beclin 1 komplekset aktiveres i situasjoner med cellulært stress, for eksempler ved økt ROS nivå i cellen. Mange proteiner kan interagere med dette komplekset (*figur 10*) og fremmer autofagiprosessen, dette inkluderer blant annet kofaktorer som UVRAG, Rubicon (i assosiasjon med UVRAG), Atg14L (også kjent som Barkor), Ambra 1 og Bif-1 (75–78). Det BH3 bindende domene til Beclin 1 muliggjør og interaksjon med de anti-apoptotiske medlemmene av Bcl-2 familien, blant annet de kjente oncogenene Bcl-2/Bcl-X_L. Ved tilknytning til Beclin 1 hemmer disse oncogenene autofagi, men ved dissosiering fra Bcl-2/Bcl-X_L, som for eksempel i næringsfattige situasjoner, kan den frigjorte Beclin 1 aktiveres (74). Bcl-2 interaksjonen med Beclin 1 kan videre reguleres av Jnk1, et medlem av MAP-kinase familien* som fosforylerer og inaktiverer Bcl-2. Dette forstyrrer videre Bcl-2 sin inhibering av autofagi (79). DAPK er en tumor suppressor med evnen til å dissosiere Beclin 1 fra BCL-X_L gjennom fosforylering av Beclin 1. DAPK proteinfamilien er stressaktiverte kinaser og fungerer som en ytterligere forbindelse mellom autofagi og cellulært stress (80,81). Bcl-2 spiller på denne måten to roller innen regulering av celleoverlevelsen. Den har både en autofagiinhibitorisk aktivitet gjennom interaksjon med Beclin 1 og en velkjent anti-apoptotisk funksjon ved å hemme cytochrome c frigjøring fra mitokondriet (74).

* **MAP kinase familien:** Mitogen-aktivert protein kinase familien er en familie protein-serin/threonine kinaser som deltar i mange viktige intracellulære signaloverføringsveier involvert i bl.a. hormonresponser og responser på store endringer i organismen. MAP kinaser aktiveres i protein kinase kaskader (188).

3.4.1.3 Beclin 1 komplekset og immunforsvaret

I nyere tid har Beclin 1 komplekset blitt assosiert med proteiner fra ulike patogener. Dette inkluderer viral Bcl-2* hos KSHV, HSV, M2 protein fra influensa B virus og Nef proteinet i HIV. Studier tyder på at disse patogenene interagerer med Beclin 1 og hemmer autofagi gjennom ulike mekanismer. Dette kan være en indikator på at autofagi spiller en viktig rolle i immunforsvaret og kroppens forsvar mot patogene mikroorganismer (74,82–84).

3.4.1.4 Elongering

Det neste steget i autofagosom dannelsen, elongering, innebærer rekruttering av to ubiquitin-like-konjugeringssystemer Atg12-Atg5-Atg16L og LC3 (den humane homologen til Atg8) (*figur 8*). Begge konjugeringssystemene er avhengig av det samme E3 enzymet, Atg7, for å dannes og utøve sin funksjon. Konjugering av fosfatidylethanolamine (PE) til LC3 igangsetter translokasjon av LC3 fra cytosol til den voksende autofagosommembranen. Atg12-Atg5-Atg16L systemet utøver sin funksjon ved å interagere med det voksende autofagosomet. Teorien er at dette induserer kurvaturdannelse gjennom rekruttering av den endelige aktivert formen av LC3, LC3B-II (57). Den fullstendige rollen til LC3B-II er enda ikke helt avklart, men LC3B-II er funnet lokalisert til både den interne og den eksterne siden i autofagosomet. Den spiller trolig en rolle innen både selektering av materiale som skal degraderes (65) og fusjon av membraner som videre fører til utvidelse av autofagosomet (85,86).

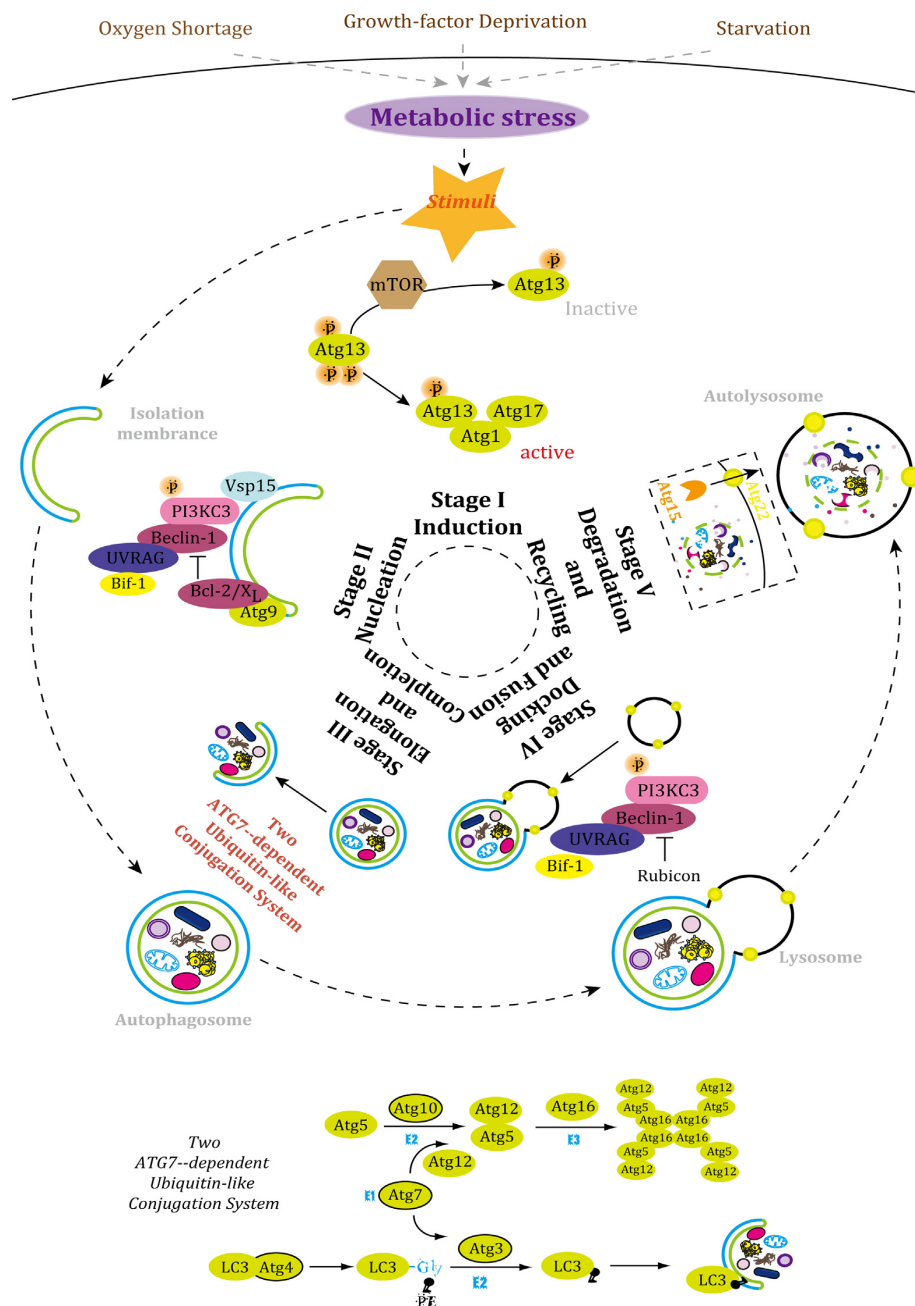
3.4.1.5 Modning og degradering

Den endelige fusjoneringen med lysosomet til dannelsen av autofagolysosomet krever små Rab GTPaser[†] og lysosomets transmembrane proteiner, LAMP (57,87). Etter fusjoneringen degraderes autofagosomets indre membran og dets innhold ved hjelp av lysosomets sure miljø. I lysosomet er cathepsin proteasene B og D nødvendige for den videre resirkuleringen av autofagosomet (88). Resirkuleringsproduktene frigjøres

* **Viral Bcl-2:** Virus som koder for Bcl-1 homologer

† **Rab GTPase:** Rab familien tilhører Ras GTPaser superfamilien. Det finnes minst 60 forskjellige Rab gener i det humane genomet. De forskjellige Rab GTPasene finnes knyttet til cytosolsiden av spesifikke intracellulære membraner. Her fungerer de som regulatorer av spesifikke trinn i membran transportveier. Bundet til GTP rekrutterer de spesifikke effektorproteiner til membranen og regulerer så vesikkeldannelse, actin- og tubulin avhengig vesikkeltransport og membranfusjonering(189).

så tilbake til cytosol hvorpå de kan benyttes til oppbygningen av andre makromolekyler eller benyttes som energikilde, men mekanismen bak denne frigjøringen er fortsatt ukjent (57). Membranen til autofagosom kan videre omdannes til lysosomer gjennom en prosess kjent som ”autofagisk lysosom dannelse” (figur 8) (89).

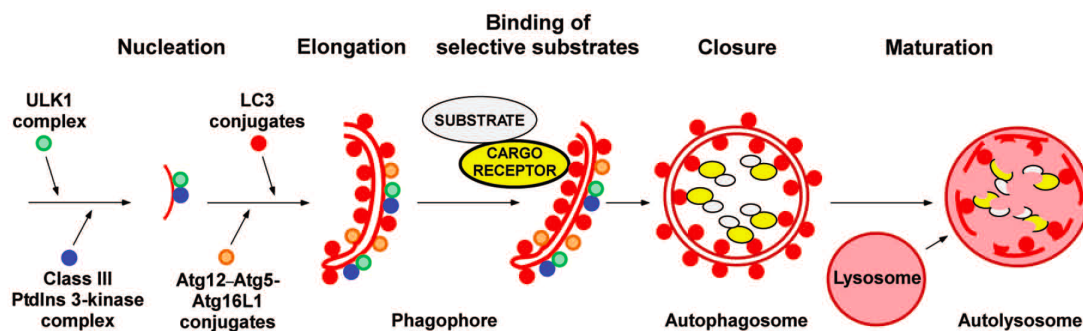


Figur 8

De ulike stadiene i dannelsen av autofagosomet og dens molekylære regulatorer. (Zheng et al., *Cancer Letters* 337, 2013)

3.5 Selektiv autofagi

Lenge trodde man at autofagi kun foregikk som en prosess hvor store deler av cytosol ble degradert på en ikke selektiv måte. Nå eksisterer det derimot en betydelig mengde bevis som tyder på at det i stor grad og foregår en selektiv degradering av cellulære komponenter gjennom autofagi og forståelsen rundt denne selektive prosessen er stadig økende (90). Initieringstrinnene er tilsvarende de overnevnte for ikke-selektiv autofagi, men skiller seg fra ikke-selektiv ved at det voksende phagophoret gjennom forskjellige brodannende reseptorproteiner kan sørge for degraderingen av *spesifikke* cellulære komponenter (figur 10). Dette står i kontrast til den ikke-selektive degraderingen av store deler av cytosol som ellers foregår ved autofagi.



Figur 10

Illustrasjon av de forskjellige trinnene i selektiv autofagi. (Johansen et Lamark, *Autophagy* 7, 2011).

3.5.1 Autofagi-reseptorproteiner

Fire kriterier må imøtekommes for å kvalifisere som en autofagi reseptor: 1) Reseptoren må binde Atg8/LC3 i phagophore membranen gjennom et konservert bindingssete, LC3-interagerings regionen (LIR) motif, 2) Autofagi reseptoren må interagere med substratet som skal degraderes gjennom protein-protein- eller membranbindings- domener, 3) Autofagi reseptoren må degraderes sammen med substratet, 4) Delesjonen av en autofagi reseptor må ikke påvirke det grunnleggende autofagimaskineriet (65).

3.5.2 Tre grupper selektiv autofagi reseptorer

Autofagi reseptorene kan deles inn i tre gruppert basert på hvordan interaksjonen med substratet som skal degraderes gjennomføres: 1) NIP3-like protein x (NIX, alternativt kalt BNIP3L) er en membran assosierte autofagi reseptorer forankret i den ytre mitokondrie membranen. Denne gruppen av reseptorer medierer selektiv degradering av mitokondriet (mitofagi) gjennom LIR-avhengig interaksjon med Atg8/LC3-familieproteiner i autofagosom membranen, 2) Spesialiserte reseptorer som kun interagerer med en type substrat ved spesielle forhold. Denne gruppen inneholder foreløpig 2 medlemmer, Startch-binding-domain-containing protein 1 (Stbd1) og E3-ubiquitin ligase Cbl (91), 3) Sequestosome 1-Like Receptors (SLRs), medlemmer av denne gruppen er proteiner med domener som kan interagere med ubiquitinerte substrater og fungere som en brobygger med substratet og phagophoret (65,92). Eksempler på slike adaptorproteiner er p62/SQSTM1 (nå av kjent som p62), NBR1, NDP52 (også kjent som CALCOCO2) og optineurin (65).

3.5.3 p62

Den første selektive autofagi reseptoren beskrevet var det stress-induserte, intracellulære proteinet p62. Dette proteinet har vært avgjørende for forståelsen av selektiv autofagi. p62 består av mange bindingsområder som muliggjør ansamling av proteiner i større komplekser, polymerisering med flere p62 proteiner og brodannelser mellom disse kompleksene og den voksende autofagosom membranen (phagophoret). Denne egenskapen genereres gjennom binding av p62 til polyubiquitin på komponenter som skal degraderes og autofagosomproteinet LC3 via dens LIR domene (65,93). Eksempler på slike degraderingskomponenter kan være peroxisomer, proteiner og mikrober i tillegg til ødelagt mitokondria, ribosomale proteiner og viruscapsid proteiner (65,94,95). Til slutt blir p62 selv inkorporert i autofagosomet og degradert gjennom autofagi (4,93). p62 kan også interagere med andre adaptorproteiner og dermed fremme selv-aggregering eller aggregering av adaptorkomplekser. Siden p62 er et substrat for autofagosomal degradering vil defekter i autofagi føre til opphopning av p62. Som konsekvens kan det skje en oppregulering av de mange ulike reaksjonsveiene p62 er involvert i, i tillegg er p62 proteinet assosiert med protein aggregater involvert flere sykdomsmekanismer (96–98).

3.6 Hovedsignaleringsveier i autofagiregulering

3.6.1 Regulering av mTOR

Mange ulike substrater, som blant annet aminosyrer, ATP, vekstfaktorer, samt nivået av ROS er med på å regulere mTOR aktiviteten. Situasjoner med cellulært stress og lavt energitilskudd vil føre til en nedregulering av mTOR og videre aktivering av autofagi. mTOR reguleringen kan foregå gjennom flere prosesser, og reguleringen er forbundet med både tumor suppressor gener, som for eksempel PTEN, NF- κ B, TSC1 og TSC2, og oncogener som PI3K, Akt og Bcl-2 (*figur 11*) (71). På denne måten er reguleringen av mTOR reaksjonsveien en kompleks prosess som spiller en avgjørende rolle for initiering eller terminering av autofagi.

3.6.2 AMPK – positiv autofagi regulator

En viktig reaksjonsvei i mTOR reguleringen er AMPK (*figur 11*). Dette er en sentral metabolsk sensor som medvirker til opprettholdelsen av cellulær homeostase. Den aktiveres av blant annet lavt energinivå nivå i cellen (høy AMP/ATP ratio) og HIF-1* og bidrar til oppregulering av autofagi gjennom inhibering av mTOR komplekset (99,100). Flere kinaser kan og bidra i reguleringen av AMPK-reaksjonsveien, dette inkluderer blant annet CAMKK β som aktiveres av Ca²⁺ i cytosol og transkripsjonsfaktoren NF- κ B[†], samt regulatoriske kinaser oppstrøms for denne som IKK komplekset og TAK1 (101,102). AMPK kan i tillegg aktivere autofagi uavhengig av mTOR ved å fosforylere ULK1 direkte (103).

3.6.3 PI3K/AKT1 og PTEN – negativ autofagi regulator

mTOR er en nedstrøms effektor for den sentrale PI3K-AKT reaksjonsveien. PI3K er en kinase med en viktig regulatorisk rolle i denne reaksjonsveien. Den utøver sin virkning ved å regulere nivået av fosforylert PIP3 i plasmamembranen. PI3K

* **HIF-1:** En transkripsjonsfaktor som aktiveres ved hypoxiske forhold. Er involvert i reguleringen av cellens glukoseforbruk(190)

† **NF- κ B:** En familie transkripsjonsfaktorer som vanligvis holdes i inaktiv tilstand gjennom interaksjoner med inhiberende molekyler i IKK komplekset. Ved forskjellige stimuli som signaliserer skadelige mekanismer i cellen, eks. inflammatoriske cytokiner, bakterie/virus produkter eller ulike typer stress, fosforyleres IKK molekylene. Dette fører til ubiquitinerings og destruksjon av IKK molekylene og frigjøring av NF- κ B som videre kan aktivere gentranskripsjon av gener involvert i immunforsvaret, vekstkontroll og anti-apoptose(191). TAK1 er del av et kinasekompleks oppstrøms for IKK komplekset og som utøver sin funksjon bl.a. ved å fosforylere og aktivere dette(192).

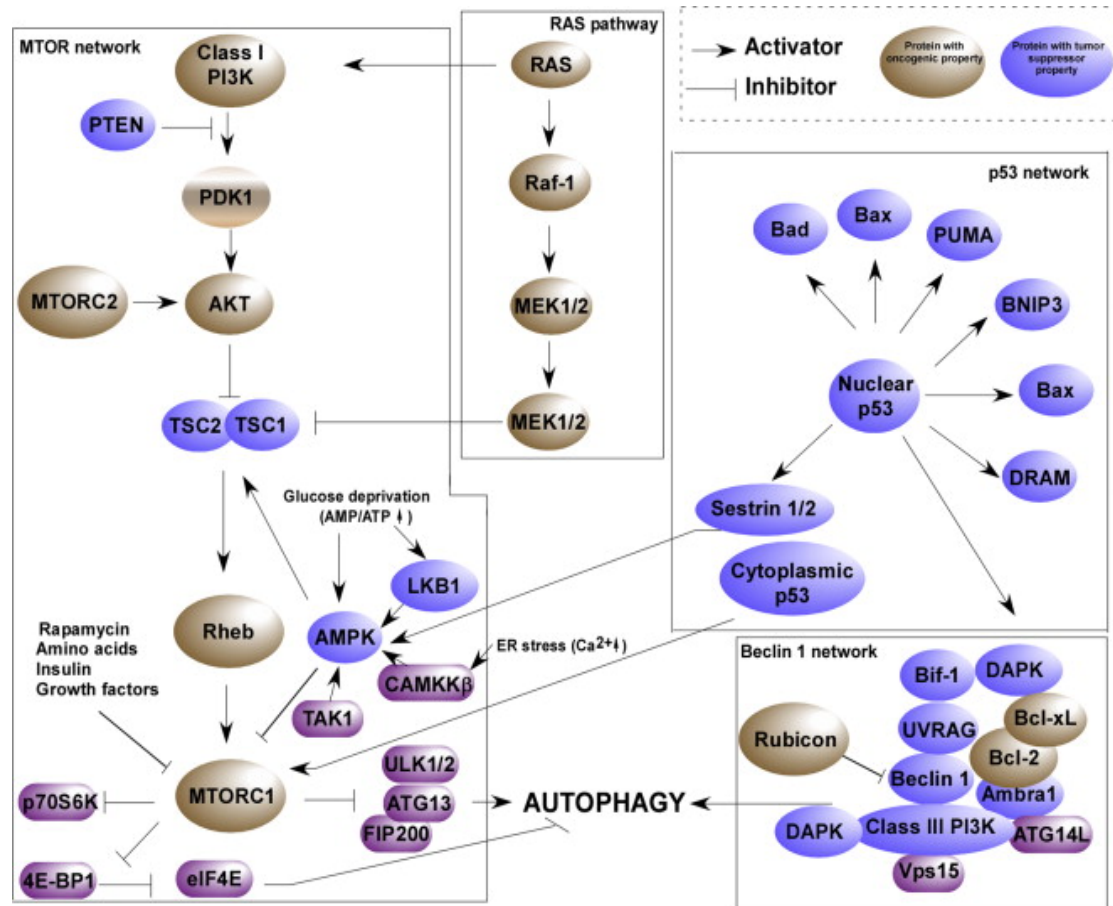
aktiveres av vekstfaktorer og stimulerer videre til cellulær anabolisme gjennom blant annet AKT1 (/PKB) regulering (*figur 11*). AKT1 utfører videre sin funksjon ved å fosforylere målproteiner og transkripsjonsfaktorer i cellekjernen (11). AKT1 hemmer autofagi ved blant annet å regulere mTORC1. Denne reguleringen foregår ved at AKT1 opphever den nedregulerende effekten TSC1/TSC2 komplekset (oppstrøms for mTOR) har på mTORC1 (104). PTEN er en tumor suppressor med inhibitorisk effekt på PI3K-AKT reaksjonsveien og fungerer dermed som en stimulator av autofagi (*figur 11*) (105).

3.6.4 p53 tumor suppressor og autofagi

Tumor suppressor proteinet p53 er velkjent for sin beskyttende rolle i cellen gjennom å opprettholde cellulær homeostase og hindre utviklingen av prosesser som er involvert i tumordannelse (11). p53 mutasjon er den vanligste mutasjonen blant ulike kreftformer som rammer mennesker. Inaktivering av p53 har blitt registrert i over 50% av ulike krefttyper og er assosiert med metastaser og dårlig prognose (106). p53 aktiveres på grunn av ulike cellulære stressituasjoner. I aktivert form fungerer den blant annet som en transkripsjonsfaktor og utøver sin effekt ved å regulere uttrykket av gener som fremmer cellyklusarrest og apoptose. Det er også påvist at p53 kan fremme pro-apoptotiske mekanismer via ikke-nukleære prosesser (11). Nyere forskning har vist at p53 spiller en kompleks regulatorisk rolle i autofagi. Denne rollen avhenger av lokalisasjonen til p53 i cellen (107). Nukleært p53 fremmer autofagi gjennom et stort mangfold av mekanismer. Dette inkluderer aktiveringen av tidligere nevnte autofagi fremmende faktorer som AMPK, PTEN, TSC2 (*figur 11*) (108). I tillegg stimulerer nukleært p53 til autofagi ved aktivering av det lysosomale enzymet DRAM som regulerer flere trinn i autofagiprosessen (*figur 11*) (109). Regulatoriske proteiner som Sestrin 1/2 og IGF-BP3, begge med en nedregulerende effekt på IGF-1/AKT* og mTOR reaksjonsveien, er under nukleær p53 kontroll (*figur 11*) (108). Ytterligere oppreguleres DAPK-1 av aktivert nukleært p53. DAPK-1 kan, stimulere til autofagi blant annet ved å frigjøre Beclin 1 fra Bcl-2/Bcl-X_L (81). Cytosolisk p53 utøver derimot en motsatt effekt (*figur 11*). Så langt antas p53 i cytosol

* **IGF-1:** Et polypeptid som i stor grad syntetiseres i lever og frisettes under påvirkning av veksthormon. Høyt energi nivå, som for eksempel ved høye glukoseverdier, stimulerer til insulin- og videre IGF-1 produksjon. Binding av IGF-1 til sin reseptor resulterer i rekruttering av PI₃K til plasmamembranen med påfølgende katalysering av PIP₃ dannelse og aktivering av AKT-reaksjonsveien (108)

sin negative regulering av autofagi i stor grad å skyldes aktivering av TIGAR, som er et av målgene til p53. TIGAR utøver sin autofagi hemmende funksjon ved å nedregulere glycolysen og videre ved å senke ROS nivåene i cellen (110).



Figur 11

Hovedsignaleringsveier involvert i aktivering og regulering av autofagi (S. Lorin et al., *Seminars in Cancer Biology* 23, 2013)

3.7 Andre autofagi regulatorer

3.7.1 Cdk og autofagiregulering

Egenskapen til å stimulere overgangen fra et stadium i cellyklusen til det neste gjør at Cdk'er proteinene er nødvendige for at celledeling skal inntreffe. Aktiviteten deres er nøye regulert og finner sted på spesifikke steder i cellyklusen (111). En forbindelse mellom Cdk 1, Cdk 5 og autofagi har blitt påvist av flere

forskningsgrupper (112,113). Teorien er at Cdk1 og Cdk5 fosforylerer Vps34 og inhiberer dermed dens interaksjon med Beclin 1 og videre autofagiprosessen. Denne teorien styrkes av funn som viser at mitotiske celler har færre autofagosomer og reduserte nivåer av PI3P (112). En slik regulatorisk forbindelse mellom Cdk'er og autofagi kan være av betydning for kreftprogresjon. Gjennom ukontrollert aktivering av Cdk'er i forskjellige krefttyper kan autofagi inhiberes på en lite hensiktsmessig måte og dermed bidra til økt genomisk ustabilitet.

3.7.2 Autofagi og ER-stress

ER er en sentral organelle i cellen som er helt nødvendig for at proteiner kvalitetssikres og får sin edelige konfigurasjon (111). ER-stress er innledningsvis en beskyttende cellulær respons som kan utløses av flere forhold som forstyrrer proteinfoldingen i ER. Ideelt sett skal proteiner som ikke foldes korrekt utløse en redningsrespons kalt "unfolded protein respons" (UPR) som sørger for at proteinene fjernes og homeostasen i ER gjenopprettes. Kan derimot ikke homeostasen gjenopprettes, som for eksempel ved vedvarende ER-stress, kan det føre til en feilregulert celle eller celledød (114). Det foreligger nå resultater som indikerer at det eksisterer et viktig samspill mellom ER-stress og autofagi. Yorimitsu et al. (115) har rapportert at ER-stress stimulerer til dannelse av autofagosomet og flere rapporter understreker flere tett knyttede forbindelser mellom disse to prosessene (116–118). Det kan derfor virke som at autofagi er en essensiell mekanisme i cellen for å redusere ER-stress ved å fjerne feilfoldede og skadde proteiner og ved å gjenopprette den cellulære homeostasen. Overdreven autofagi som et resultat av ER-stress kan til og med føre til celledød. Flere sykdomsmekanismer forbundet med ER-stress og ER-stress modulatorer regnes derfor som potensielle terapeutiske mål. ER-stress relaterte sykdommer inkluderer neurodegenerative sykdommer som Parkinson (119) og Alzheimers (120), metabolske tilstander (121,122) og mange flere. ER-stress er og forbundet med kreftutvikling (123,124) og et er og mye som tyder på at ER-stress aktivert autofagi kan påvirke kreftutvikling både positivt og negativt (125,126).

4. Autofagi og kreftsykdom – et tveegget sverd

I tillegg til å spille en viktig rolle innen opprettholdelse av kroppens homeostase har flere ulike forsøk demonstrert at delesjon av Atg-er og videre tap av autofagimekanismen forårsaket flere livstruende sykdommer (4,5,127–131). En av de første sykdomstilstandene knyttet opp mot dysfunksjonell autofagi var kreft. Dette tema fikk særlig oppmerksomhet da det ble oppdaget at Beclin-1 genet ofte er nedregulert eller gått tapt i ulike krefttyper. Dette inkluderer blant annet lungekreft, hepatocellulære karsinomer og lymfomer (3,132). Monoallelisk tap av Beclin 1 genet har blitt funnet i opptil 40 – 75% av prostata-, bryst og livmorhalskreft pasienter (3). Dette indikerer at Beclin 1 spiller en tumor supressor rolle, og flere studier viser til at autofagidefekter som er assosiert med økt tumorgenese (3–6,131–133). Det strides likevel om autofagi sin hovedfunksjon er å hemme kreftutvikling eller holde kreftcellene i live under cellulære stressituasjoner. Slike stressituasjoner oppstår ofte i tumormiljøet på grunn av de høye metabolske kravene forbundet med celleproliferasjon, i tillegg til den dårlige vaskulariseringen som kan oppstå i tumormassen og føre til hypoksi (11). Kjemoterapi og stråling er og stressinduktorer som fører til et ugunstige leveforhold i cellen. Celler utsatt for slik behandling har demonstrert autofagiaktivering som en overlevelseshjelp (134–142). Kanskje kan anti-autofagibehandling vise seg å være et viktig supplement til annen kreftbehandling, klarhet rundt dette tema er derfor en viktig målsetning. Før autofagi i kreftbehandlings øyemed kan bli en realitet må hvilke forutsetninger som ligger til grunne for at autofagi fungerer tumorhemmende eller tumorfremmende avdekkes.

4.1 Tumorhemmende egenskaper

Genetisk ustabilitet kan føre til økt mutasjonsfrekvens, ukontrollert cellevekst og sannsynligvis til økt behandlingsresistens (11). Gjennom evnen til å fjerne skadde og ødelagte cellulære komponenter motvirker autofagi genetisk ustabilitet (*figur 12*). En defekt i autofagiprosessen vil kunne føre til en opphopning av proteiner, celleorganeller og deler av DNA med skade. I tillegg vil det kunne føre til utilstrekkelige nivåer av ATP i cellen til å opprettholde essensielle cellulære prosesser som mitose, DNA replikasjon og reparasjon. Dette er faktorer som øker mutasjonsfrekvensen i tumorceller. Særlig vil dette være gjeldende i tumorceller hvor

apoptose prosessen er nedregulert og ikke kan ta seg av slike cellulære skader som normalt (133). Det er derfor mulig at autofagi kan hemme tumorvekst. Studier utført på udødeliggjorte, autofagidefekte epiteliale celler som demonstrerte en oppregulering av DNA skade responsen, DNA "double strand breaks", aneuploiditet og genamplifisering i assosiasjon med tumorprogresjon, er med på å underbygge denne teorien (5,6). Involveringen til de tidligere nevnte tumor suppressorene som p53, PTEN og TCS1/2 i aktiveringen av autofagi styrker og denne assosiasjonen. Disse faktorene og flere faktorer, inkluderende både tumorsuppressorer og oncogener, med foreslått påvirkning på autofagi er oppsummert i tabell 1. Bevis som underbygger autofagis tumorhemmende rolle har blant annet blitt funnet gjennom eksperimentelle studier på mus hvor heterozygot knockdown av BECN1 genet resulterte i en økning i tumordannelse (3), samtidig er det rapportert at et overuttrykk av BECN1 fører til inhibering av tumorvekst (143). Nedregulering av andre gener som er involvert i autofagiregulering er også assosiert med kreftutvikling. Kolorektal og gastrisk kreft er blant annet assosiert med Bif-1 nedregulering (144) og mutasjoner i flere Atg-er (145). Det er i tillegg påvist at autofagi hemmer progresjonen av K-Ras induserte lungetumorer ved å danne en mer benign tumorformasjon (146). Det er og kjent at vedvarende aktivering av PI3K-Akt-reaksjonsveien, som medfører kontinuerlig inaktivering av autofagi og mangelfull respons ved stress-stimuli, er et svært vanlig funn ved tumorprogresjon (133). Ulike tumorfremmende roller ved aktivering av denne reaksjonsveien ble oppsummert av Manning og Cantley i 2007 (147).

Table 1
Several key autophagic mediators which are involved in cancer.

Genes	Autophagy inducer/inhibitor	Oncogenic/tumour suppressive
Anti-apoptotic Bcl-2 family	Inhibitor	Oncogenic
mTORC1	Inhibitor	Oncogenic
PI3K1	Inhibitor	Oncogenic
Akt	Inhibitor	Oncogenic
ERK	Inhibitor	Oncogenic
Bcl-2	Inhibitor	Oncogenic
Beclin-1	Inducer	Tumour suppressive
UVRAG	Inducer	Tumour suppressive
Bif-1	Inducer	Tumour suppressive
BH3-only Bcl-2 family	Inducer	Tumour suppressive
PTEN	Inducer	Tumour suppressive
Atg4C	Inducer	Tumour suppressive
p53	Inducer/inhibitor	Tumour suppressive
DAPK	Inducer/inhibitor	Tumour suppressive

Tabell 1

Oversikt over oncogener og tumorsuppressor gener foreslått involvert i reguleringen av autofagi (Zheng et al., *Cancer letters* 337, 2013)

Autofagi er også funnet å kunne forhindre nekrotisk celledød når kreftceller nedregulerer apoptosen. Nekrose er en uryddig form for celledød. Denne typen celledød oppstår når celler utsettes for ulike former for skadelig stimuli og medfører lysering av cellen og frigjøring av intracellulært innhold. Nekrose vil kunne fremme vedvarende lokal inflammasjon og stimulere til tumorvekst. Dette gjør at nekrose assosieres med en dårligere prognose (133). Inflammasjon har av flere grunner etablert seg som en viktig ”hallmark of cancer” (1). En sammenheng mellom autofagi og inflammasjon kan være av avgjørende betydning for videre behandlingsregimer. I et eksperimentelt studie på melanoma- og embryoniske nyreceller (HEK 293T) førte oppregulering av autofagi til redusert tumorutvikling gjennom immunregulering. Det ble antatt at autofagidefekter fremmet tumorvekst blant annet ved å påvirke antigen krysspresentasjon og dermed adaptiv immunitet (148).

Autofagi har og en potensiell tumorhemmende rolle gjennom induksjon av autofagisk celledød/ type II celledød når apoptosen svikter. Flere studier har bekreftet en autofagimediert celledød i apoptosedefekte celler (149,150). Autofagimediert celledød har og blitt assosiert med flere cellulære stressituasjoner som virale infeksjoner, ER stress og toksiner (149,151–153). Et overuttrykk av Jnk1, tidligere nevnt som inhibitor av Bcl-2 og dermed en autofagi aktivator, har dessuten ført til induksjon av autofagisk celledød i kreftceller (154).

Dette kan tyde på at autofagi spiller flere viktige tumorhemmende roller i cellene, innledningsvis ved å motvirke genomisk ustabilitet og økt mutasjonsfrekvens, i tillegg til å indusere celledød. Hva som avgjør autofaginivået og dermed hvilken prosess som igangsettes krever nærmere undersøkelse. Mye tyder allikevel på at visse intracellulære forhold som for eksempel etter behandling med visse kjemoterapeutiske midler, sviktende apoptose og ytterligere dødssignaler er involvert i denne avgjørelsen.

4.2 Tumorfremmende egenskaper

Fravær av apoptose er et fellestrekk i utlikningen av mange ulike krefttyper. Ved redusert apoptoseaktivitet kan tumorceller overleve ulike stressfaktorer og onkogenstimulering hvilket fremmer ukontrollert proliferering av tumorcellene (11). Selv om fravær av apoptotiske stimuli kan forklare hvordan cellene overlever ulike situasjoner som normalt skulle ført til celledød, forklarer ikke dette hvordan kreftcellene overlever lengre perioder med cellulært stress og mangel på næringsstoffer. Tumorer trenger et høyt nivå av energiproduksjon i tillegg til cellulære byggeklosser som proteiner, lipider og nukleinsyrer for å etablere seg og å vokse (11). Autofagi sin evne til å resirkulere metabolitter og forsyne cellen med byggeklosser og energi gjør dette til den mulige x-faktoren som kan forklare hvordan overlevelse i fravær av apoptose muliggjøres (*figur 12*). Slike egenskaper kan gjøre autofagi særlig viktig i raskt voksende tumorområder utsatt for hypoksi og næringsbegrensninger. Endringer i tumorcellenes metabolisme er et tema som har fått økt oppmerksomhet de siste årene og det pågår mye forskning på dette feltet. Warburg effekten* (155) har opplevd en renessanse gjennom økende kunnskap om tumorcellenes store behov for glukose, økende anaerob glukosemetabolisme gjennom glykolysen[†] og reduserte oksidative fosforylering[‡] (156,157). Autofagi utgjør derfor en potensiell måte å imøtekomme kravene til de metabolske reaksjonsveiene i kreftcellen på.

Flere studier har blitt utført der man har undersøkt sammenhengen mellom H-ras og K-ras[§] muterte kreftcellelinjer og et høyt basalt autofaginivå, selv med tilstrekkelig med næringsstoffer tilgjengelig (8–10). Det kan virke som et høyt autofaginivå er essensielt for å opprettholde den mitokondrielle funksjonen som er nødvendig for å imøtekomme de metabolske kravene til kreftcellene. I et eksperimentelt studie utført på mus med pankreaskreft induisert av K-ras mutasjon ble det påvist forsinket

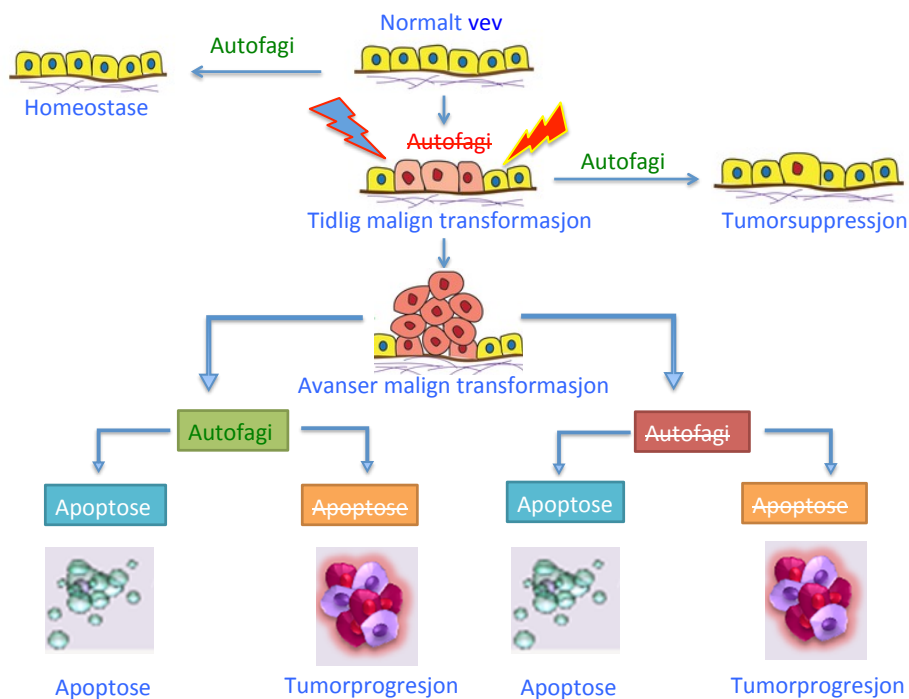
* **Warburg effekten:** Teori utviklet i 1924 av Otto Warburg om kreftcellens evne til å oppregulere glycolysen og utvinne tilstrekkelig energi og metabolitter til cellevektst gjennom aerob glycolyse.

[†]Glykolyse: Katabolismen av glukose til energi i form av ATP og metabolske intermediater

[‡] **Oksidativ fosforylering:** Oksygenavhengig prosess i mitokondriet som kombinerer oksidering av energirike molekyler og elektrontransportkjeden med syntese av ATP

[§] **Ras-genene:** En liten gruppe gener tilhørende en større familie (Ras- superfamilie: Ras, Ral, Rho, Rab). Involvert i en rekke viktige cellulære prosesser blant annet er intracellulær signaloverføring. H-ras, N-ras og K-ras er forbundet tumorutvikling da disse genene er hyppig mutert og kontinuerlig aktivert i ulike krefttyper, spesielt pancreas-, colon-, lunge- og thyroidea kreft.

tumorprogresjon og økt overlevelse ved behandling med autofagi inhibatoren chloroquine (10). Knockdown av Atg5 og Atg7 i Ras-styrte humane brystkreftceller viste en redusert cellevekst *in vitro* og en redusert tumordannelse i mus (8). Slike funn kan indikere en ”autofagi avhengighet” hos Ras-styrt tumorutvikling, men står derimot i kontrast til det overnevnte studiet hvor autofagi hemmet progresjonen av K-Ras induerte lungetumorer ved å inducere en mer benign tumorformasjon (146). Selv med slike motstridende funn er det allikevel mye som tyder på at denne kunnskapen kan åpne flere dører til behandlingsregimer med inhibering av autofagi i slike Ras-regulerte krefttyper. Autofagi har videre vist brystkreftfremmende egenskaper i en ny cellelinje med arvelig brystkreft ved å undertrykke p53 aktivering induert av DNA skade (7). I lungekreftceller avhengige av oncogenet B-raf er det rapportert at autofagi fremmer tumorvekst gjennom opprettholdelse av den mitokondrielle glutaminmetabolismen (158). Defekt autofagi er og assosiert med akkumulering av α -1-antitrypsin aggregater i lever og lunge. Dette er en prosess som gjør cellene resistente mot apoptose og forårsaker inflammasjon og oksidativt stress, begge disse situasjonene fremmer kreftprogresjon (159,160).



Figur 12

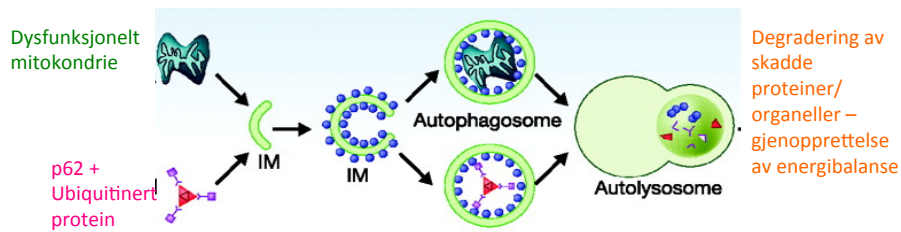
Potensielle responssenarioer i tumorigenese ved metabolsk stress avhengig av den funksjonelle statusen til autofagi og apoptose i tumorcellen (*Thea Grindstad*)

4.3 p62 – et knutepunkt mellom autofagi og kreft?

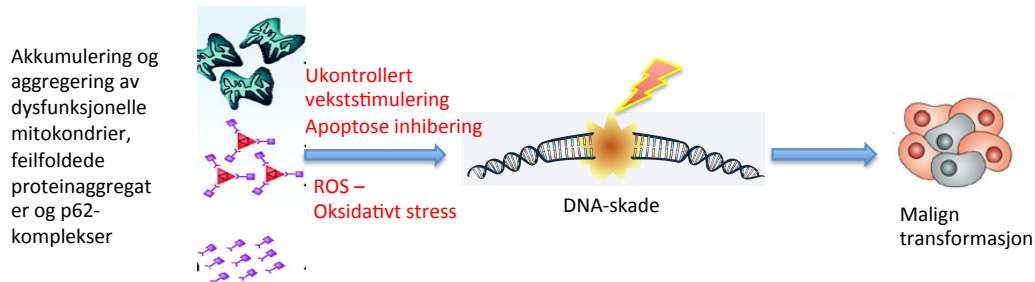
En feil i autofagiprosessen kan føre til opphopning av proteinene som fungerer som brobyggere i selektiv autofagi, for eksempel p62, da disse selv skal degraderes gjennom autofagi (4,93). Dette kan føre til akkumulering av p62 sine målproteiner, for eksempel dysfunksjonelle organeller som mitokondrier. Resultatet kan være økt oksidativt stress og påfølgende DNA-skade, inflammasjonsprosesser og vevshenfall (nekrose). Tilslutt kan dette føre til tap av kontroll over celledeling og apoptose og kreftutvikling (*figur 13*) (4). I tillegg til dens rolle som autofagireseptor er p62 blant annet involvert i reguleringen av ulike signalveier relatert til stressinduserte cellulære prosesser, celleoverlevelse og celledød. Et vedvarende overuttrykk av p62 i tumorceller med defekt autofagi fører for eksempel til en feilregulert NF- κ B signalering (4), en signaleringsvei kjent for sin involvering i tumorutvikling. En p62-forårsaket endring i denne signaleringsveien er vurdert som en av hovedmekanismene bak tumorvekst stimulering (4). Videre er de cellulære nivåene av p62 og Nrf2* korrelert, dette er påvist ved at knockdown av Nrf2 reduserer p62 nivåene og motsatt (161). En kontinuerlig p62 aktivering av Nrf2 kan bidra til kreftutvikling ved å stabilisere Nrf2 og dermed få det til å fungere som et oncogen. Nrf2 fremmer da tumorutvikling ved å redusere ROS nivåene i kreftcellene under stressende metabolske forhold, i tillegg til å modulere signaler i kreftcellene som fremmer angiogenese (162). I kreftceller med defekt autofagi kan med andre ord en p62 aktivert Nrf2 og NF- κ B reaksjonsvei, i kombinasjon med cellulært stress, bidra til generering av et tumorvennlig miljø med kronisk inflammasjon og angiogenese. Det finnes og bevis for at p62 er overuttrykket i kreftceller som er transformert av oncogenet Ras og gjennom observasjonen hvor p62 knockout hindret utviklingen av Ras-induserte lungekreft (163). Utviklingen av det tumorvennlige miljøet p62 kan indusere støtter dermed teorien om at autofagi kan hemme tumorvekst.

* **Nrf2:** en transkripsjonsfaktor involvert i regulering av gener essensielle for å takle situasjoner med oksidativt stress

FUNKSJONELL SELEKTIV AUTOFAGI



DYSFUNKSJONELL SELEKTIV AUTOFAGI



Figur 13

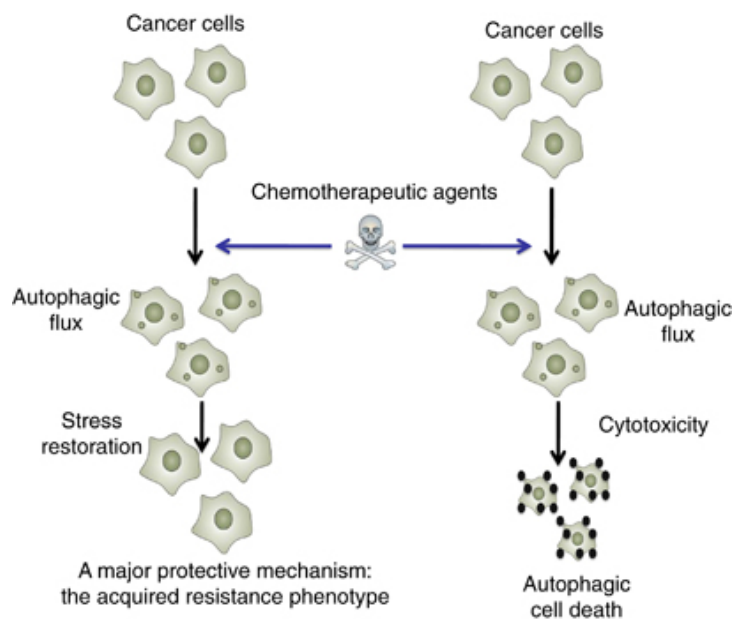
Funksjonell selektiv autofagi og dysfunksjonell selektiv autofagi i kreftutvikling. (Thea Grindstad, bilder lånt fra Moscat et. al, Cell 137, 2009)

4.4 Autofagi og kreftbehandling

Formålet med kreftbehandling er å indusere celledød og forhindre at kreftcellene overlever. Kjemoterapi og stråling virker blant annet ved å skape et stressende miljø for tumormassen gjennom induksjon av hypoksi, mangel på næringsstoffer og dannelse av ROS. Studier gjort på ulike behandlingsformer med forskjellige virkningsmekanismer, blant annet mTOR inhibitorer, arsenikk trioxider, etoposide, histone deacetylase (HDAC) inhibitorer, tamoxifen, temozolomide, tyrosin kinase inhibitorer, proteasom inhibitorer og ioniserende stråling, er bevis for at kreftbehandling kan indusere autofagi (134–142). Ved å oppregulerer autofaginivået kan kreftcellene motsette seg miljøendringen kreftbehandlingen induserer og bidra til utviklingen av en terapiresistent fenotype (figur 14). Flere nyere studier har vist hvordan autofagi inhibering i kombinasjon med ulike kreftbehandlinger kan være fordelaktig. For eksempel resulterte knockdown av autofagi relaterte gener i MCF-7 og T-47D brystkreftcellerlinjer, kombinert med tamoxifen eller 4-hydroxy-tamoxifen behandling, i en reduksjon i kreftcellenes levedyktighet (164,165). Andre studier har rapportert at anti-autofagi behandling har hatt en gunstig effekt ved å sensitivisere

bryst- og gastriske kreftceller til primærbehandlingen (166,167). Så langt er chloroquine og analogen hydroxychloroquine de eneste autofagi inhibitorer som testes i kliniske studier som et ledd i kreftbehandling (*clinicaltrial.gov, studie nummer: NCT00969306; NCT01023477; NCT01438177; NCT00933803; NCT01506973; NCT00765765; NCT01649947; NCT01480154*). Begge disse medikamentene forstyrrer lysosomal funksjon og hindrer dermed degradering av proteiner i autofagosomet. Det finnes allikevel mange flere forskjellige autofagi inhibitorer og stoffer med evnen til å slå ut autofagi regulatoriske gener som benyttes i studier på autofagi og behandlingsresistens.

På lik linje med autofagi sin paradoksale evne til å fremme både celleoverlevelse og autofagisk celledød, finnes det bevis for en like tosidig rolle innen kreftbehandling. En autofagiaktivering vil kunne sørge for at tumorcellen får et høyt autofaginivå og begynner selvdestruksjon, noe som er ønskelig ved kreftbehandling (*figur 14*). Flere studier viser til at ulik kreftbehandling kan resultere i induksjon av “målrettet autofagi”, dvs. autofagisk/ type II celledød. Et studie av Xiong et al. (168) har påvist at autofagisk celledød induseres i PUMA- eller Bax-defekte coloncancerceller etter behandling med antikreftmiddelet Fluorouracil og dermed bremse kreftutviklingen. I et nyere studie på eggstokk kreftceller har en platinaforbindelse (mono-Pt) designet for bruk i kreftbehandling rapportert induksjon av autofagisk celledød (169). Tilsvarende resultater har blitt registrert både for FK-16, derivert fra det antimikrobielle peptidet LL-37, i tykktarmskreftceller (170) og i hepatocellulære karsinomceller hvor aktivering av Beclin-1 mediert av medikamentet sorafenib og SC-59 (sorafenib derivat) førte til autofagisk celledød (171). Ursolic syre har og vist kreftcelledrepende egenskaper gjennom induksjon av autofagisk celledød (172). En ytterligere innfallsvinkelen er at man kan hemme autofagien og dermed indusere apoptose. Ved kreftbehandling er det derfor av avgjørende betydning å vite når autofagiens hemmende eller stimulerende egenskaper skal benyttes.



Figur 14

Mulige cellulær respons ved kreftbehandlingsindusert autofagi.
(Sui et al, Cell Death and Disease, October 2013)

5. Steroidhormonregulert autofagi – et ledd i kreftutvikling?

Så langt har både steroidhormoner og autofagi vist flere forbindelser med kreftutvikling, men vår kunnskap om mekanismene bak disse forbindelsene er fortsatt mangelfull. Autofagi er assosiert med krefttyper i organer med påvist steroidhormonregulering, blant annet bryst-, prostata-, endometriekreft (3,8), og en forbindelse mellom disse prosessene bør derfor ikke utelukkes. Dette er fortsatt et forholdsvis nytt felt innen kreftforskning som er under stadig utvikling. Noe forskning har så langt blitt gjort på området, men uten at man har nådd en endelig konklusjon.

Det er et kjent fenomen at steroidhormoner aktiverer programmert celledød under utviklingen av ulike organismer (173). Like kjent er det derimot ikke at dette inkluderer både type 1 (apoptose) og type 2 (autofagi) programmert celledød. Et studie fra 2001 av Lee og Baehrecke rapporterte at steroidhormonaktivert autofagi, blant annet gjennom reguleringen av nøkkelgenet E93, finner sted i spyttkjertlene til *Drosophila fluvi* under metamorfosen og er essensiell for degradering av døende spyttkjertler (17). Flere lignende autofagistudier utført på *Drosophila fluvi* er med på å underbygge teorien om steroidhormon regulert autofagi (13–16). Nyere studier

utført blant annet på brystepitelceller til storfe har videre vist at kjønnshormoner kan være involvert i en autofagiaktivering nødvendig for utviklingen av brystkjertler (18,19). Tang et al. har og undersøkte betydningen mellom autofagi og steroidhormoner og påviste et høyere nivå av autofagi i steroidhormon-utskillende celler sammenliknet med normale celler. I denne kvantitative analysen fant man en økning av autofagisk aktivitet ved utskillelse av steroidhormoner (20). Induksjon av autofagi er dessuten foreslått som en viktig mekanisme bak progesteron sin neuroprotektive rolle (174,175). Ved å blant annet vise sammenhengen mellom steroidhormonregulering og utvikling av ulike organismer er disse studiene er med på å underbygge teorien om en kobling mellom steroidhormoner og autofagi eksisterer.

Da steroidhormoner og autofagi tilsynelatende er forbundet innen normalfysiologien, er det naturlig å tenke seg at en feilregulering av en av disse faktorene kan føre til utviklingen av sykdom. I et studie fra 2009 ble et forsøk på å kartlegge sentrale punkter i den endokrine reguleringen av apoptose utført på brystkreftcellelinjene MCF7 og LCC1. Flere østrogenaktivert signaleringsveier, inkludert NFκB, ble påvist å regulere Bcl-2 familiemedlemmer og viste en påfølgende regulering av autofagi og apoptose (176). Disse signaleringsveiene utøver dermed kontroll over balansen mellom celledød og celleoverlevelse. Flere studier har underbygget denne teorien om en steroidhormon regulert autofagi i kreft. Prostata tumor kjennetegnes ofte av næringsfattige, hypoksiske og sure miljøer (177). For at kreftcellene skal overleve og spre seg her er de avhengig av å tilpasse seg denne stressende situasjonen. Androgener har lenge vært assosiert med utviklingen av prostatakreft, det er derfor ikke usannsynlig at disse hormonene spiller en rolle i tilpasningen til et slikt miljø. Et forsøk utført av Shi et al. hvor de undersøkte flere prostatakreft cellelinjer (LNCaP, VCaP, LAPC4, CWR22 og 22Rv1) fant at androgener regulerer cellulær metabolisme og vekst til fordel for kreftcellen, blant annet gjennom oppregulering av autofagi (177). Den fullstendig mekanismen bak en slik oppreguleringen ble ikke avklart, men Shi et al., foreslo androgenenes evne til å oppregulere det cellulære ROS nivået som en mulig mekanisme. Videre har Chhipa et al. rapportert en noe motstridende teori om at LNCaP cellelinjen benytter autofagi som en overlevelsesmekanisme i situasjoner med kombinert androgendepresjon og hypoksi via aktivering av AMPK-reaksjonsveien (178). Dette kan indikere at autofagi også fungerer som en bidragsyter til utviklingen av hormonuavhengig prostatakreft. Lignende funn beskrives i en

artikkel av Li et al. hvor LNCaP cellelinjen viste evnen til å overleve fravær av DHT ved hjelp av autofagiaktivering (179).

Feilregulering av det østrogeninduserte genet EIG121 er assosiert med endometriekreft (180). I et studie fra 2011 beskrev Deng et al. sammenhengen mellom EIG121 og autofagi i ulike knockdown- og oppregulerings forsøk. EIG121 beskytter kreftcellen gjennom oppregulering av autofagi under stressende situasjoner, som for eksempel ved kjemoterapi (181). Oppregulert autofagi assosieres dermed med brystkrefts resistensutvikling mot antiøstrogenbehandling. Støtte for dette finnes blant annet i et studie hvor det ble rapportert at antiøstrogenbehandling i kombinasjon med inhibering av Beclin 1 genet betydelig bedret behandlingseffekt i brystkreftcellerlinjer (182). I tillegg støttes teorien om resistensutvikling og av lignende funn i de overnevnte studiene med autofagiinhibering i kombinasjon med tamoxifen og 4-hydroxytamoxifen behandling (164,165).

Selv om slike funn kan tyde på at steroidhormoner har en autofagiaktiverende rolle som virker til fordel for kreftprogresjonen, finnes det også flere eksempler på at steroidhormonaktivert autofagi kan føre til type 2 celledød og dermed begrense tumorvekst. Blant annet har anti-østrogenbehandling av brystkreftcellerlinjen MCF-7 ført til celledød som har vist autofagi lignende trekk, hvilket kan antyde at steroidhormonaktivert autofagi også kan bekjempe kreftprogresjonen (141). Det har dessuten nylig blitt påvist at 17β -estradiol analogen C19 kan indusere både autofagi og apoptose i MCF-7 celler (183). I en studie av Guido et al. (184) er også aktivering av ER β i seminomcellerlinjer (TCAM2) assosiert med autofagi og autofagiindusert celledød. På grunnlag av dette er ER β ligand foreslått som potensiell behandlingsform for denne krefttypen. Videre har det blitt rapportert at fytoøstroget* resveratrol indusert vekstreduksjon av lungekreft- og adenokarsinomcellerlinjer gjennom autofagiaktivering (185), samme observasjon har tidligere blitt gjort i eggstokkreftcellerlinjer (186).

* **Fytoøstroget**: Plantestoffer med østrogenlignende hormonvirkning på dyr og mennesker. Virker ved å binde til ER

6. Konklusjon

Kort oppsummert er autofagi en naturlig forekommende biologisk prosess som involverer diverse signaleringsveier med overlappende funksjoner med andre cellulære stressresponser. Autofagi er sensitiv for endringer i cellens energibalanse og spiller på grunn av dette en viktig rolle under organismens utvikling, i vedlikehold av cellenes homeostase og for celleoverlevelse. Hvorvidt hemming eller oppreguleringen av autofagi kan benyttes i kreftbehandling er fortsatt uklart da autofagi har vist både tumorfremmende og tumorhemmende egenskaper. På grunn av dette har autofagi ervervet seg tilnavnet ”et tveegget sverd i kreftutvikling”. Hva er så en mulig forklaring på de motstridende funnene? Sannsynligvis er rollen til autofagi i tumorutvikling svært kompleks og avhengig av flere ulike faktorer; tumorstadiet (initiering, progresjon, metastase, behandlingsresistens), vevstype som er affisert, typen av cellulært stress og andre intra- og ekstracellulære forhold. Det kan virke som både hemmingen og oppregulering av autofagi er nødvendig for optimale vekstforhold for tumorceller. Den avgjørende faktoren er heller *når* i tumorutviklingen de aktuelle prosessene inntreffer. Dette kan forklares med at den innledningsvise tumorhemmende funksjonen til autofagi kan fungere tumorfremmende i en allerede etablert malign transformasjon. Ved undertrykkelse av autofagi forstyrres den normale homeostasen. Resultatet av dette kan være økt inflammasjon, genomisk ustabilitet og aneuploiditet. Alle disse faktorene kan fremme tumordannelse og videre føre til tidlig tumorgenese. Fortsetter undertrykkelsen av autofagi kan tumorprogresjonen stoppe på grunn av næringsstoffmangel og økt oksidativt stress som oppstår i tumormassen. Aktiveres derimot autofagien igjen på dette stadiet kan det metabolske kravet til tumorveksten imøtekommes og det oksidative stresset reguleres. På denne måten tillates tumorprogresjonen og en mer aggressiv svulst utvikles (*figur 12*).

Det eksisterer fortsatt mange ubesvarte spørsmål rundt reguleringen av autofagi, men forskningen tyder på at steroidhormoner, og da spesielt kjønnshormoner, kan være blant de regulatoriske faktorene. Steroidhormoner har i lang tid vært forbundet med regulering av de hyppigst forekommende krefttypene i verden, uten at store fremskritt har blitt gjort i forsøket på å avdekke mekanismen bak denne sammenhengen. Studier

utført på steroidhormon assosierte krefttyper har vist at en sammenheng med feilregulert autofagi kan eksistere. Også innen steroidhormon regulerte krefttyper viser autofagi evnen til å både fremme og hemme tumorvekst, hvilket underbygger teorien om en situasjonsavhengig autofagiprosess. Om steroidhormonregulert autofagi avdekkes som et viktig ledd i utvikling av enkelte krefttyper vil dette kun være toppen av isfjellet, da både kjønnshormoner og autofagi er involvert i flere komplekse prosesser med innvirkning på utallige signaleringsveier og cellulære forhold. Flere funksjonelle studier kreves for å øke kunnskapen om disse prosessene. Først gjennom større klarhet rundt ulike kryssreaksjoner, autofagiens funksjonelle status i den aktuelle tumortypen og dens stadium kan vi utnytte vår kunnskap om autofagi maksimalt og forbedre dagens kreftbehandling.

7. Oppsummering

Det er mye som tyder på at autofagi har en nøkkelrolle i cellulær fysiologi. Dette har gjort autofagi til et fremadstormende tema innen kreftforskning. På mange måter er dette forskningsfeltet kun i startfasen, men mange lovende resultater støtter fortsettelsen av arbeidet. Steroidhormoner derimot har lenge vært i søkelys, men temaet dukker til stadighet opp igjen. Her er det fremdeles mye som er uopplært, men vissheten om at mange svar finnes i forståelsen av steroidhormonenes regulatoriske rolle driver arbeidet fremover. Dette er to svært komplekse temaer med mange innfallsvinkler. Det å finne steroidhormonregulert autofagi sin rolle i kreftutvikling kan derfor på mange måter virke som å lete etter en nål i en høystakk. Allikevel kan forståelsen for denne mekanismen bidra til at vi kommer enda et skritt nærmere løsningen på kreftgåten.

Referanser

1. Hanahan D, Weinberg R a. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. Elsevier Inc.; 2011 Mar 4 [cited 2013 Aug 7];144(5):646–74.
2. Hanahan D, Weinberg R a. The hallmarks of cancer. Cell. 2000 Jan 7;100(1):57–70.
3. Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. J Clin Invest. 2003;112:1809–20.
4. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen H-Y, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. Cell. 2009;137:1062–75.
5. Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. Genes Dev. 2007;21:1367–81.
6. Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, et al. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. Genes Dev. 2007;21:1621–35.
7. Huo Y, Cai H, Teplova I, Bowman-Colin C, Chen G, Price S, et al. Autophagy opposes p53-mediated tumor barrier to facilitate tumorigenesis in a model of PALB2-associated hereditary breast cancer. Cancer Discov. 2013;3:894–907.
8. Kim M-J, Woo S-J, Yoon C-H, Lee J-S, An S, Choi Y-H, et al. Involvement of autophagy in oncogenic K-Ras-induced malignant cell transformation. J Biol Chem. 2011;286:12924–32.
9. Guo JY, Chen H-Y, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. Genes Dev. 2011;25:460–70.
10. Yang S, Wang X, Contino G, Liesa M, Sahin E, Ying H, et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. Genes Dev. 2011;25:717–29.
11. Pecorino L. Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics . Oxford: Oxford University Press; 2012.
12. IARC. IA for R on CWHO. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. GLOBOCAN. 2012.
13. Thummel CS. Steroid-triggered death by autophagy. Bioessays. 2001;23:677–82.

14. Lee C-Y, Cooksey BAK, Baehrecke EH. Steroid regulation of midgut cell death during *Drosophila* development. *Dev Biol.* 2002;250:101–11.
15. Martin DN, Baehrecke EH. Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Development.* 2004;131:275–84.
16. Baehrecke EH. Autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* 2003;10:940–5.
17. Lee CY, Baehrecke EH. Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development.* 2001;128:1443–55.
18. Sobolewska A, Motyl T, Gajewska M. Role and regulation of autophagy in the development of acinar structures formed by bovine BME-UV1 mammary epithelial cells. *Eur J Cell Biol.* 2011;90:854–64.
19. Sobolewska A, Gajewska M, Zarzy??ska J, Gajkowska B, Motyl T. IGF-I, EGF, and sex steroids regulate autophagy in bovine mammary epithelial cells via the mTOR pathway. *Eur J Cell Biol.* 2009;88:117–30.
20. Tang XM, Clermont Y, Hermo L. Origin and fate of autophagosomes in Leydig cells of normal adult rats. *J Androl.* 1988;9:284–93.
21. Widmaier EP, Raff H, Strang KT, Vander AJ. *Vander’s Human physiology: the mechanisms of body function* . New York: McGraw-Hill; 2011.
22. Lieberman MA, Ricer R. *Lippincott’s illustrated Q & A review of biochemistry* . Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
23. Whitehead SA, Miell J. *Clinical endocrinology* . Banbury: Scion; 2013.
24. Greenspan FS, Gardner DG, Shoback D. *Greenspan’s basic & clinical endocrinology* . New York: McGraw-Hill Medical; 2007.
25. Alberts B. *Molecular biology of the cell* . New York: Garland Science; 2002.
26. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry* . New York: W.H. Freeman; 2013.
27. Laurentino S, Pinto P, Correia S. Structural variants of sex steroid hormone receptors in the testis: from molecular biology to physiological roles. *oapublishinglondon.com*;1–8.
28. Folkerd EJ, Dowsett M. Influence of sex hormones on cancer progression. *J Clin Oncol.* 2010;28:4038–44.
29. Stocco C. Tissue physiology and pathology of aromatase. *Steroids.* Elsevier Inc.; 2012 Jan;77(1-2):27–35.

30. Zouboulis CC, Chen W-C, Thornton MJ, Qin K, Rosenfield R. Sexual hormones in human skin. *Horm Metab Res.* 2007;39:85–95.
31. Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Pelletier G, El-Alfy M. Intracrinology and the skin. *Horm Res.* 2000;54:218–29.
32. Hall JE, Guyton AC. *Guyton and Hall textbook of medical physiology* . Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011.
33. Jameson JL, DeGroot LJ, De Kretser DM. *Endocrinology: adult and pediatric, Vol. 1* . Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2010.
34. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. *Basic and Clinical Pharmacology. Basic And Clinical Pharmacology.* 2009.
35. Baulieu EE, Robel P, Schumacher M. Neurosteroids: beginning of the story. *Int Rev Neurobiol.* 2001;46:1–32.
36. Herson PS, Koerner IP, Hurn PD. Sex, sex steroids, and brain injury. *Semin Reprod Med.* 2009;27:229–39.
37. Kaore SN, Langade DK, Yadav VK, Sharma P, Thawani VR, Sharma R. Novel actions of progesterone: what we know today and what will be the scenario in the future? *J Pharm Pharmacol.* 2012 Aug [cited 2014 Jan 7];64(8):1040–62.
38. Madhunapantula S V, Mosca P, Robertson GP. Steroid hormones drive cancer development. *cbt. Landes Bioscience Inc.;* 2010 Oct 15;10(8):765–6.
39. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64:9–29.
40. Kim JJ, Chapman-Davis E. Role of progesterone in endometrial cancer. *Semin Reprod Med.* 2010;28:81–90.
41. Ahmad N, Kumar R. Steroid hormone receptors in cancer development: A target for cancer therapeutics. *Cancer Letters.* 2011. p. 1–9.
42. Arriola E, Hui E, Dowsett M, Smith IE. Aromatase inhibitors and male breast cancer. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico.* 2007. p. 192–4.
43. Bosland MC. The role of steroid hormones in prostate carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2000;39–66.
44. Prins GS, Korach KS. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids.* 2008. p. 233–44.

45. Bonkhoff H, Fixemer T, Hunsicker I, Remberger K. Progesterone receptor expression in human prostate cancer: correlation with tumor progression. *Prostate*. 2001;48:285–91.
46. Marquez-Garban DC, Mah V, Alavi M, Maresh EL, Chen H-W, Bagryanova L, et al. Progesterone and estrogen receptor expression and activity in human non-small cell lung cancer. *Steroids*. 2011;76:910–20.
47. Villa E. Role of estrogen in liver cancer. *Women's Heal. Future Medicine*; 2007 Dec 19;4(1):41–50.
48. Hendifar A, Yang D, Lenz F, Lurje G, Pohl A, Lenz C, et al. Gender disparities in metastatic colorectal cancer survival. *Clin Cancer Res*. 2009;15:6391–7.
49. Muss HB. Endocrine therapy for advanced breast cancer: a review. *Breast Cancer Res Treat*. 1992;21:15–26.
50. Scher HI, Sawyers CL. Biology of progressive, castration-resistant prostate cancer: directed therapies targeting the androgen-receptor signaling axis. *J Clin Oncol*. 2005;23:8253–61.
51. Yuan X, Balk SP. Mechanisms mediating androgen receptor reactivation after castration. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2009. p. 36–41.
52. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1:34–45.
53. Santen RJ, Song RX, Zhang Z, Kumar R, Jeng M-H, Masamura S, et al. Adaptive hypersensitivity to estrogen: mechanism for superiority of aromatase inhibitors over selective estrogen receptor modulators for breast cancer treatment and prevention. *Endocr Relat Cancer*. 2003;10:111–30.
54. Berstein LM, Wang J-P, Zheng H, Yue W, Conaway M, Santen RJ. Long-term exposure to tamoxifen induces hypersensitivity to estradiol. *Clin Cancer Res*. 2004;10:1530–4.
55. Berstein LM, Zheng H, Yue W, Wang J-P, Lykkesfeldt AE, Naftolin F, et al. New approaches to the understanding of tamoxifen action and resistance. *Endocr Relat Cancer*. 2003;10:267–77.
56. Gregory CW, Johnson RT, Mohler JL, French FS, Wilson EM. Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen. *Cancer Res*. 2001;61:2892–8.
57. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev*. 2007;21:2861–73.
58. Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism. *Science*. 2010;330:1344–8.

59. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. 2009;451(7182):1069–75.
60. Hidvegi T, Ewing M, Hale P, Dippold C, Beckett C, Kemp C, et al. An autophagy-enhancing drug promotes degradation of mutant alpha1-antitrypsin Z and reduces hepatic fibrosis. *Science*. 2010;329:229–32.
61. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol*. 2010;12:213–23.
62. Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy*. 2005;1:66–74.
63. Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, et al. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 2008;182:685–701.
64. Bejarano E, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy. *Proc Am Thorac Soc*. 2010;7:29–39.
65. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*. 2011 Mar 1;7(3):279–96.
66. Choi AMK, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med*. 2013;368:651–62.
67. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn Jr. WA, Emr SD, Sakai Y, Sandoval I V, et al. A Unified Nomenclature for Yeast Autophagy-Related Genes. *Dev Cell*. 2003 Oct;5(4):539–45.
68. Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22:132–9.
69. Jung CH, Jun CB, Ro S-H, Kim Y-M, Otto NM, Cao J, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*. 2009;20:1992–2003.
70. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*. 2007;12:9–22.
71. Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, Codogno P. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie*. 2008;90:313–23.
72. He C, Levine B. The Beclin 1 interactome. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22:140–9.

73. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol.* 2007 Oct;9(10):1102–9.
74. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell.* 2005;122:927–39.
75. Liang C, Lee J, Inn K, Gack MU, Li Q, Roberts EA, et al. Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol.* 2008;10:776–87.
76. Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, Omori H, Satoh T, Kurotori N, et al. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol.* 2009;11:385–96.
77. Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cualing HD, Sun M, Sato Y, et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol.* 2007;9:1142–51.
78. Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, Oliverio S, Lisi G, Antonioli M, et al. The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J Cell Biol.* 2010;191:155–68.
79. Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell.* 2008;30:678–88.
80. Zalckvar E, Berissi H, Mizrachy L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M, et al. 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;10:285–92.
81. Zalckvar E, Berissi H, Eisenstein M, Kimchi A. Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-XL. *Autophagy.* 2009;5:720–2.
82. Orvedahl A, Alexander D, Tallóczy Z, Sun Q, Wei Y, Zhang W, et al. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe.* 2007;1:23–35.
83. Kyei GB, Dinkins C, Davis AS, Roberts E, Singh SB, Dong C, et al. Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J Cell Biol.* 2009;186:255–68.
84. Gannag?? M, Dormann D, Albrecht R, Dengjel J, Torossi T, R??mer PC, et al. Matrix Protein 2 of Influenza A Virus Blocks Autophagosome Fusion with Lysosomes. *Cell Host Microbe.* 2009;6:367–80.

85. Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell*. 2007;130:165–78.
86. Weidberg H, Shpilka T, Shvets E, Abada A, Shimron F, Elazar Z. LC3 and GATE-16 N termini mediate membrane fusion processes required for autophagosome biogenesis. *Dev Cell*. 2011;20:444–54.
87. Simonsen A, Tooze SA. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J Cell Biol*. 2009 Sep 21;186(6):773–82.
88. Koike M, Shibata M, Waguri S, Yoshimura K, Tanida I, Kominami E, et al. Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Pathol*. 2005;167:1713–28.
89. Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, et al. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*. 2010;465:942–6.
90. Hubbard VM, Valdor R, Macian F, Cuervo AM. Selective autophagy in the maintenance of cellular homeostasis in aging organisms. *Biogerontology*. 2012. p. 21–35.
91. Birgisdottir ÁB, Lamark T, Johansen T. The LIR motif - crucial for selective autophagy. *J Cell Sci*. 2013;126:3237–47.
92. Shaid S, Brandts CH, Serve H, Dikic I. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death and Differentiation*. 2012.
93. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Øvervatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*. 2005 Nov 21;171 (4):603–14.
94. Weidberg H, Shvets E, Elazar Z. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Annu Rev Biochem*. 2011;80:125–56.
95. Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I. A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell*. 2009;34:259–69.
96. Kuusisto E, Salminen A, Alafuzoff I. Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies. *Neuroreport*. 2001;12:2085–90.
97. Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsichler A, Heid H, Schnoelzer M, Kenner L, et al. p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol*. 2002;160:255–63.

98. Nagaoka U, Kim K, Nihar RJ, Doi H, Maruyama M, Mitsui K, et al. Increased expression of p62 in expanded polyglutamine-expressing cells and its association with polyglutamine inclusions. *J Neurochem.* 2004;91:57–68.
99. Wang W, Guan K-L. AMP-activated protein kinase and cancer. *Acta Physiol.* Blackwell Publishing Ltd; 2009;196(1):55–63.
100. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev.* 2010;20:51–6.
101. Ruderman NB, Xu XJ, Nelson L, Cacicedo JM, Saha AK, Lan F, et al. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298:E751–E760.
102. Criollo A, Senovilla L, Authier H, Maiuri MC, Morselli E, Vitale I, et al. The IKK complex contributes to the induction of autophagy. *EMBO J.* 2010;29:619–31.
103. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011;13:132–41.
104. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell.* 2005;121:179–93.
105. Arico S, Petiot A, Bauvy C, Dubbelhuis PF, Meijer AJ, Codogno P, et al. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem.* 2001;276:35243–6.
106. Muller P a J, Vousden KH. P53 Mutations in Cancer. *Nat Cell Biol.* 2013;15:2–8.
107. Sui X, Jin L, Huang X, Geng S, He C, Hu X. p53 signaling and autophagy in cancer: a revolutionary strategy could be developed for cancer treatment. *Autophagy.* 2011;7:565–71.
108. Feng Z. p53 regulation of the IGF-1/AKT/mTOR pathways and the endosomal compartment. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:a001057.
109. Crighton D, Wilkinson S, O’Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, et al. DRAM, a p53-Induced Modulator of Autophagy, Is Critical for Apoptosis. *Cell.* 2006;126:121–34.
110. Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MNC, Nakano K, Bartrons R, et al. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell.* 2006;126:107–20.
111. Alberts B. *Essential cell biology* . New York: Garland Science; 2010.

112. Furuya T, Kim M, Lipinski M, Li J, Kim D, Lu T, et al. Negative Regulation of Vps34 by Cdk Mediated Phosphorylation. *Mol Cell*. 2010;38:500–11.
113. Rubinsztein DC. Cdks Regulate Autophagy via Vps34. *Molecular Cell*. 2010. p. 483–4.
114. Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2013. p. 3460–70.
115. Yorimitsu T, Nair U, Yang Z, Klionsky DJ. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem*. 2006;281:30299–304.
116. Høyer-Hansen M, Jäättelä M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ*. 2007;14:1576–82.
117. Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, et al. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*. 2006;26:9220–31.
118. Sakaki K, Kaufman RJ. Regulation of ER stress-induced macroautophagy by protein kinase C. *Autophagy*. 2008;4:841–3.
119. Sugeno N, Takeda A, Hasegawa T, Kobayashi M, Kikuchi A, Mori F, et al. Serine 129 phosphorylation of alpha-synuclein induces unfolded protein response-mediated cell death. *J Biol Chem*. 2008;283:23179–88.
120. Salminen A, Kauppinen A, Suuronen T, Kaarniranta K, Ojala J. ER stress in Alzheimer's disease: a novel neuronal trigger for inflammation and Alzheimer's pathology. *J Neuroinflammation*. 2009;6:41.
121. Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Plays a Central Role in Development of Leptin Resistance. *Cell Metab*. 2009;9:35–51.
122. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A-H, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004;306:457–61.
123. Koumenis C, Naczki C, Koritzinsky M, Rastani S, Diehl A, Sonenberg N, et al. Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *Mol Cell Biol*. 2002;22:7405–16.
124. Romero-Ramirez L, Cao H, Regalado MP, Kambham N, Siemann D, Kim JJ, et al. X box-binding protein 1 regulates angiogenesis in human pancreatic adenocarcinomas. *Transl Oncol*. 2009;2:31–8.

125. Ding W-X, Ni H-M, Gao W, Hou Y-F, Melan MA, Chen X, et al. Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *J Biol Chem.* 2007;282:4702–10.
126. Salazar M, Carracedo A, Salanueva IJ, Hernández-Tiedra S, Lorente M, Egia A, et al. Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J Clin Invest.* 2009;119:1359–72.
127. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol.* 2005;169:425–34.
128. Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, et al. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med.* 2007;13:619–24.
129. Raben N, Hill V, Shea L, Takikita S, Baum R, Mizushima N, et al. Suppression of autophagy in skeletal muscle uncovers the accumulation of ubiquitinated proteins and their potential role in muscle damage in Pompe disease. *Hum Mol Genet.* 2008;17:3897–908.
130. Inoue D, Kubo H, Taguchi K, Suzuki T, Komatsu M, Motohashi H, et al. Inducible disruption of autophagy in the lung causes airway hyper-responsiveness. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;405:13–8.
131. Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev.* 2011;25:795–800.
132. 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 U S A.* 2003;100:15077–82.
133. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2006;10:51–64.
134. Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI, et al. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest.* 2007;117:326–36.
135. Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, Helgason GV, Soliera AR, Ronchetti M, et al. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *J Clin Invest.* 2009;119:1109–23.
136. Carew JS, Espitia CM, Esquivel JA, Mahalingam D, Kelly KR, Reddy G, et al. Lucanthone is a novel inhibitor of autophagy that induces cathepsin D-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2011;286:6602–13.

137. Carew JS, Medina EC, Esquivel JA, Mahalingam D, Swords R, Kelly K, et al. Autophagy inhibition enhances vorinostat-induced apoptosis via ubiquitinated protein accumulation. *J Cell Mol Med.* 2010;14:2448–59.
138. Carew JS, Nawrocki ST, Giles FJ, Cleveland JL. Targeting autophagy: a novel anticancer strategy with therapeutic implications for imatinib resistance. *Biologics.* 2008;2:201–4.
139. Zhu K, Dunner K, McConkey DJ. Proteasome inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human prostate cancer cells. *Oncogene.* 2010;29:451–62.
140. 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.* 2005;65:3336–46.
141. Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Török L, Pandey S, Sikorska M, et al. 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;17:1595–607.
142. Hu Y-L, Jahangiri A, DeLay M, Aghi MK. Tumor Cell Autophagy as an Adaptive Response Mediating Resistance to Treatments Such as Antiangiogenic Therapy. *Cancer Research.* 2012. p. 4294–9.
143. 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.* 1999;402:672–6.
144. Coppola D, Khalil F, Eschrich SA, Boulware D, Yeatman T, Wang H-G. Down-regulation of Bax-interacting factor-1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer.* 2008;113:2665–70.
145. Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Kim SS, et al. Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *J Pathol.* 2009;217:702–6.
146. Guo JY, Karsli-Uzunbas G, Mathew R, Aisner SC, Kamphorst JJ, Strohecker AM, et al. Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytomas and maintains lipid homeostasis. *Genes Dev.* 2013;27:1447–61.
147. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007;129:1261–74.
148. Li Y, Wang L-X, Yang G, Hao F, Urba WJ, Hu H-M. Efficient cross-presentation depends on autophagy in tumor cells. *Cancer Res.* 2008;68:6889–95.

149. 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*. 2004;304:1500–2.
150. 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*. 2004;6:1221–8.
151. Daido S, Kanzawa T, Yamamoto A, Takeuchi H, Kondo Y, Kondo S. Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res*. 2004;64:4286–93.
152. Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, Kondo S, Germano I. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res*. 2003;63:2103–8.
153. Tallóczy Z, Jiang W, Virgin HW, Leib DA, Scheuner D, Kaufman RJ, et al. Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2 α kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:190–5.
154. Shimizu S, Konishi A, Nishida Y, Mizuta T, Nishina H, Yamamoto A, et al. Involvement of JNK in the regulation of autophagic cell death. *Oncogene*. 2010;29:2070–82.
155. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* (80-). 1956 Feb 24 [cited 2013 Sep 18];123(3191):309–14.
156. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1029–33.
157. Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011 Jan;27:441–64.
158. Strohecker AM, Guo JY, Karsli-Uzunbas G, Price SM, Chen GJ, Mathew R, et al. Autophagy sustains mitochondrial glutamine metabolism and growth of BrafV600E-driven lung tumors. *Cancer Discov*. 2013;3:1272–85.
159. Marciniak SJ, Lomas DA. Alpha1-Antitrypsin Deficiency and Autophagy. *N Engl J Med*. Massachusetts Medical Society; 2010 Nov 3;363(19):1863–4.
160. Hidvegi T, Mukherjee A, Ewing M, Kemp C, Perlmutter DH. The role of autophagy in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Methods Enzymol*. 2011;499:33–54.
161. Jain A, Lamark T, Sjøttem E, Bowitz Larsen K, Atesoh Awuh J, Øvervatn A, et al. p62/SQSTM1 Is a Target Gene for Transcription Factor NRF2 and

- Creates a Positive Feedback Loop by Inducing Antioxidant Response Element-driven Gene Transcription. *J Biol Chem*. 2010 Jul 16;285 (29):22576–91.
162. Maes H, Rubio N, Garg AD, Agostinis P. Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response. *Trends Mol Med*. 2013 Jul;19(7):428–46.
 163. Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, Diaz-Meco MT, et al. The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2008;13:343–54.
 164. Qadir MA, Kwok B, Dragowska WH, To KH, Le D, Bally MB, et al. Macroautophagy inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells and enhances mitochondrial depolarization. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;112:389–403.
 165. Samaddar JS, Gaddy VT, Duplantier J, Thandavan SP, Shah M, Smith MJ, et al. A role for macroautophagy in protection against 4-hydroxytamoxifen-induced cell death and the development of antiestrogen resistance. *Mol Cancer Ther*. 2008;7:2977–87.
 166. Wang K, Liu R, Li J, Mao J, Lei Y, Wu J, et al. Quercetin induces protective autophagy in gastric cancer cells: Involvement of Akt-mTOR- and hypoxia-induced factor 1 α -mediated signaling. *Autophagy*. 2011;7:966–78.
 167. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreros C, Menendez JA. Autophagy facilitates the development of breast cancer resistance to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab. *PLoS One*. 2009;4.
 168. Xiong H yan, Guo X ling, Bu X xin, Zhang S shan, Ma N nan, Song J rui, et al. Autophagic cell death induced by 5-FU in Bax or PUMA deficient human colon cancer cell. *Cancer Lett*. 2010;288:68–74.
 169. Guo W-J, Zhang Y-M, Zhang L, Huang B, Tao F-F, Chen W, et al. Novel monofunctional platinum (II) complex Mono-Pt induces apoptosis-independent autophagic cell death in human ovarian carcinoma cells, distinct from cisplatin. *Autophagy*. 2013;9:996–1008.
 170. Ren SX, Shen J, Cheng ASL, Lu L, Chan RLY, Li ZJ, et al. FK-16 Derived from the Anticancer Peptide LL-37 Induces Caspase-Independent Apoptosis and Autophagic Cell Death in Colon Cancer Cells. *PLoS One*. 2013;8.
 171. Tai W-T, Shiau C-W, Chen H-L, Liu C-Y, Lin C-S, Cheng A-L, et al. Mcl-1-dependent activation of Beclin 1 mediates autophagic cell death induced by sorafenib and SC-59 in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death Dis*. 2013;4:1–10.
 172. Leng S, Hao Y, Du D, Xie S, Hong L, Gu H, et al. Ursolic acid promotes cancer cell death by inducing Atg5-dependent autophagy. *Int J Cancer*. 2013;15:2781–90.

173. Evans-Storms RB, Cidlowski JA. Regulation of apoptosis by steroid hormones. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1995. p. 1–8.
174. Kim J, Kim TY, Cho KS, Kim HN, Koh JY. Autophagy activation and neuroprotection by progesterone in the G93A-SOD1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 2013;59:80–5.
175. Kim HN, Lee SJ, Koh JY. The neurosteroids, allopregnanolone and progesterone, induce autophagy in cultured astrocytes. *Neurochem Int*. 2012;60:125–33.
176. Clarke R, Shajahan AN, Riggins RB, Cho Y, Crawford A, Xuan J, et al. Gene network signaling in hormone responsiveness modifies apoptosis and autophagy in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009;114:8–20.
177. Shi Y, Han JJ, Tennakoon JB, Mehta FF, Merchant F a, Burns AR, et al. Androgens promote prostate cancer cell growth through induction of autophagy. *Mol Endocrinol*. 2013 Feb;27(2):280–95.
178. Chhipa RR, Wu Y, Ip C. AMPK-mediated autophagy is a survival mechanism in androgen-dependent prostate cancer cells subjected to androgen deprivation and hypoxia. *Cell Signal*. 2011;23:1466–72.
179. Li M, Jiang X, Liu D, Na Y, Gao GF, Xi Z. Autophagy protects LNCaP cells under androgen deprivation conditions. *Autophagy*. 2008;4:54–60.
180. Deng L, Broaddus RR, McCampbell A, Shipley GL, Loose DS, Stancel GM, et al. Identification of a novel estrogen-regulated gene, EIG121, induced by hormone replacement therapy and differentially expressed in type I and type II endometrial cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11:8258–64.
181. Deng L, Feng J, Broaddus RR. The novel estrogen-induced gene EIG121 regulates autophagy and promotes cell survival under stress. *Cell Death Dis*. 2010;1:e32.
182. Schoenlein P V, Periyasamy-Thandavan S, Samaddar JS, Jackson WH, Barrett JT. Autophagy facilitates the progression of ERalpha-positive breast cancer cells to antiestrogen resistance. *Autophagy*. 2009;5:400–3.
183. Nkandeu DS, Mqoco T V, Visagie MH, Stander B a, Wolmarans E, Cronje MJ, et al. In vitro changes in mitochondrial potential, aggresome formation and caspase activity by a novel 17- β -estradiol analogue in breast adenocarcinoma cells. *Cell Biochem Funct*. 2013;31:566–74.
184. Guido C, Panza S, Santoro M, Avena P, Panno ML, Perrotta I, et al. Estrogen receptor beta (ER β) produces autophagy and necroptosis in human seminoma cell line through the binding of the Sp1 on the phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN) promoter gene. *cc. Landes Bioscience Inc.*; 2012 Aug 1;11(15):2911–21.

185. Ohshiro K, Rayala SK, Kondo S, Gaur A, Vadlamudi RK, El-Naggar AK, et al. Identifying the estrogen receptor coactivator PELP1 in autophagosomes. *Cancer Res.* 2007;67:8164–71.
186. Pipari AW, Tan L, Boitano AE, Sorenson DR, Aurora A, Liu JR. Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2004;64:696–703.
187. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:503–33.
188. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001;22:153–83.
189. Stenmark H, Olkkonen VM. The Rab GTPase family. *Genome Biol.* 2001;2:REVIEWS3007.
190. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008 Jan [cited 2013 Sep 16];7(1):11–20.
191. Israël A. The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:a000158.
192. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature.* 2001;412:346–51.