

Rola autofagii w mammogenezie gruczołu mlekowego krów na modelu mammosfer^{*)}

AGNIESZKA SOBOLEWSKA, MAŁGORZATA GAJEWSKA, TOMASZ MOTYL

Katedra Nauk Fizjologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

Sobolewska A., Gajewska M., Motyl T.

Role of autophagy in the mammogenesis of bovine mammary glands on the model of mammospheres

Summary

Progress in studies concerning the process of mammogenesis have been stimulated by the development of the three-dimensional (3D) culture systems, which enable mammary epithelial cells to form structures mimicking the alveoli of mammary gland in vivo. Mammary epithelial cells (MECs) supported on a laminin-rich extracellular matrix (ECM) form 3D acinar structures – mammospheres – which mature to form polarized and functional monolayers surrounding a lumen and have the ability to produce milk proteins. These structures develop an axis of apico-basal polarity, subsequently become unresponsive to proliferative signals, and finally a bona fide lumen is formed by cavitation, involving the removal of centrally localized cells via multiple cell death processes. Lumen formation is associated with the selective apoptosis of centrally located cells. Autophagy, which is a process responsible for maintaining cell homeostasis, also seems to be crucial in mammary gland development and remodeling. This review describes the role of autophagy in the formation of acinar structures by mammary epithelial cells. Studies on MECs from different species (human, mouse, cow) cultured on Matrigel™ have shown the protective role of autophagy in centrally located cells of differentiating mammospheres. Autophagy seems to be the cells' first response to the lack of contact with ECM, which in consequence leads to apoptotic cell death, anoikis, and lumen formation in developing alveoli.

Keywords: autophagy, apoptosis, mammary gland, three-dimensional cell culture

Autofagia jest niezbędna dla przeżycia komórek. Jest ewolucyjnie konserwatywnym, bardzo starym procesem komórkowym, umożliwiającym degradację białek z naruszoną strukturą, o długim okresie półtrwania, oraz usuwanie organelli z udziałem lizosomów (21). W komórkach eukariotycznych wyróżniono trzy główne formy autofagii: makroautofagię, mikroautofagię oraz autofagię zależną od białek opiekuńczych, tzw. chaperonów, jednakże makroautofagia jest główną ścieżką, odpowiedzialną za nieselektywne przeniesienie materiału cytoplazmatycznego do lizosomów podczas głodu komórkowego. W procesie tym składniki cytoplazmy, które mają ulec degradacji, zostają otoczone początkowo pojedynczą, a następnie podwójną błoną izolującą, tworząc autofagosomy, które z kolei ulegają fuzji z wczesnymi i późnymi lizosomami. Prowadzi to do powstania autofagolizosomów, w których zachodzi ostateczny proces degradacji ich zawartości przy użyciu hydrolaz lizosomalnych (34). Zaburzenie autofagii prowadzi do zmian zwyrodnieniowych.

Białka zaangażowane w regulację autofagii

Główne białka zaangażowane w regulację procesu autofagii w komórkach wszystkich organizmów począwszy od drożdży aż po ssaki należą do produktów genów z rodziny *ATG* (AuTophagy-related) (22, 26). Odkrycie tych białek pozwoliło na zidentyfikowanie ścieżek sygnałowych związanych z aktywacją i regulacją tego procesu. Za główne markery biochemiczne autofagii uważa się dwa białka: LC3 (Atg8) oraz beclin1 (Atg6), jak również ATG7. Białko LC3 występuje w komórce w dwóch formach: w formie nieaktywnej (LC3-I) – rozproszone w cytoplazmie komórki oraz w formie aktywnej (LC3-II) – zlokalizowane w błonach izolujących i błonach autofagosomów. LC3-II łączy się z fosfatydyloetanolaminą i przyłączane jest do błon autofagosomów. Ilość białka LC3-II w komórce jest ściśle skorelowana z ilością autofagosomów, w związku z tym LC3 jest obecnie uważane za jedyny wiarygodny molekularny marker procesu autofagii (17). Stworzenie konstruktów LC3 z GFP (białko zielonej fluorescencji) umożliwia precyzyjną lokalizację białka LC3-II zlokalizowanego na

^{*)} Badania finansowane ze środków projektu badawczego MNiSW nr N308306733.

błonach autofagosomów (29). Tanida i wsp. (41), wykorzystując taki konstrukt, wykazali punktową lokalizację świecenia GFP w komórce podczas głodu komórkowego, co wskazują, że jest to dobra i precyzyjna metoda identyfikacji autofagii w komórce. Z kolei drugi molekularny wskaźnik autofagii czyli beklina 1 jest niezbędna w transporcie wakuolarnym (23) oraz uczestniczy w formowaniu kompleksu z kinazą 3-fosfatydyloinozytolu klasy III (PI3K klasy III), biorąc udział w powstawaniu autofagosomów. Bierze również udział w sekwestracji materiału cytoplazmatycznego do wakuoli autofagicznych (15, 36). Zahamowanie aktywności PI3K klasy III przez 3-metyloadeninę (3-MA) prowadzi do zahamowania autofagii w komórce (2). Liang i wsp. (23) wykazali, że beklina 1 oddziałuje także z białkiem Bcl-2, co sugeruje jej rolę w kontrolowaniu procesu apoptozy. Kolejne białka z rodziny ATG (Atg3, Atg4, Atg5, Atg7, Atg8, Atg10, Atg12 i Atg16) odgrywają również istotną rolę w komórce, gdyż są odpowiedzialne za tworzenie autofagosomów oraz spełniają ważną rolę w rozwoju *Cenorabditis elegans* i *Dictyostelium discoideum* (27, 35).

Fizjologiczne znaczenie autofagii

Autofagia jest procesem, który umożliwia przeżycie komórek w organizmie wielokomórkowym poprzez regulowanie homeostazy komórkowej na drodze kilku mechanizmów, tj.: umożliwia utrzymanie metabolizmu komórkowego na stałym poziomie poprzez dostarczanie składników odżywczych i energii komórkom narażonym na stres oraz głód przez degradację białek komórkowych o długim okresie półtrwania; umożliwia degradację tzw. toksycznych białek; chroni komórki przed stresem oksydacyjnym poprzez usuwanie uszkodzonych mitochondriów, peroksysomów oraz regulację wielkości siateczki śródplazmatycznej (33); uczestniczy w przebudowie komórek na etapie różnicowania i rozwoju tkanek oraz narządów płodu; umożliwia utrzymanie wątrobowej homeostazy przez konstytutywną autofagię, tj. niezależną od głodzenia (26); umożliwia prezentowanie antygenów MHC klasy II w komórkowej obronie przeciw niektórym patogenom np. *Streptococcus* (36). Wymienione funkcje świadczą o istotnej roli autofagii w kontroli wielu procesów fizjologicznych komórki. Sama autofagia jest kontrolowana przez ścieżkę sygnałową pośredniczoną przez kinazę mTOR (mammalian target of rapamycin) (3, 30). Ścieżka ta, z udziałem PI3 kinazy/PKB/mTOR, jest niezbędna w proliferacji, przeżyciu i migracji komórek. Zablockowanie jej aktywności z wykorzystaniem farmakologicznego, specyficznego inhibitora mTOR, jakim jest rapamycyna, która zahamuje fosforylację mTOR, prowadzi do nasilenia procesu autofagii (38). Z kolei Debnath i wsp. (7) w badaniach *in vitro* nad morfogenezą pęcherzyków wydzielniczych gruczołu mlekowego wykazali, iż ciągła aktywacja PKB powoduje tworzenie dużych, bezkształtnych struktur w wyniku utrzymującej się akty-

wacji proliferacji komórek nabłonkowych. Zastosowanie rapamycyny powodowało tworzenie nieprawidłowych struktur pęcherzykowych, co świadczy o istotnej roli kinazy mTOR w odbieraniu sygnałów przekazywanych przez aktywną/fosforylowaną formę kinazy PKB. W warunkach fizjologicznych kinaza mTOR jest również wyłączana podczas głodu komórkowego, co prowadzi do nasilenia autofagii, natomiast jest ona aktywowana w komórkach dobrze odżywionych oraz pod wpływem czynników wzrostu IGF-I i EGF, co z kolei prowadzi do zahamowania procesu autofagii (22).

Rola autofagii w przebudowie gruczołu mlekowego

Przebudowa gruczołu mlekowego jest procesem fizjologicznym, związanym z panującą tam dynamiczną równowagą pomiędzy dwoma jednocześnie zachodzącymi procesami mitozy i programowanej śmierci komórek nabłonka gruczołu mlekowego. Podczas rozwoju gruczołu, w okresie ciąży następuje wzmożona proliferacja komórek macierzystych nabłonka. Ponadto dochodzi do ich różnicowania, wydłużania, rozgałęziania przewodów mlekowych, wzrostu liczby pęcherzyków wydzielniczych oraz powstawania typowej zrazikowo-pęcherzykowej struktury narządu. Badania naszego zespołu jako pierwsze wykazały istotną rolę autofagii w fazie zasuszania gruczołu mlekowego u bydła. W okresie inwolucji tkanka gruczołowa wykazuje charakterystyczne cechy morfologiczne (obecność wakuoli autofagicznych w komórkach) i biochemiczne (wzrost poziomu LC3-II i bekliny 1) autofagii w komórkach nabłonka gruczołu sutkowego bydła (42). Nasze obserwacje uzyskane w doświadczeniach *ex vivo* zostały również potwierdzone w doświadczeniach *in vitro* na komórkach nabłonka gruczołu mlekowego bydła linii BME-UV1 (9, 32). Nasiloną autofagię podczas inwolucji jest mechanizmem obrony komórek gruczołu mlekowego w odpowiedzi na deficyt substancji odżywczych, bioaktywnych oraz ekspozycji na działanie czynników indukujących apoptozę, tj.: TGF- β 1, FIL, IGF-BPs (31). Dalsze badania wykazały również, iż czynniki wzrostu IGF-I, EGF oraz ich kombinacja znoszą efekt autofagiczny w komórkach nabłonka gruczołu mlekowego linii BME-UV1, hodowanych w warunkach głodu komórkowego. Hamujące działanie wymienionych czynników może zostać zniesione przy zastosowaniu rapamycyny. Wskazuje to na istotną rolę kinazy mTOR jako „molekularnego przełącznika” w ścieżkach sygnałowych zależnych od IGF-I i EGF. W naszych badaniach efekt głodu komórkowego został wywołany przez redukcję stężenia płodowej surowicy bydłowej w pożywce, ze standardowego 10% (niezbędnego do prawidłowego wzrostu) do 0,5%. Taki model doświadczalny nazwalibyśmy modelem inwolucji *in vitro*, ponieważ naśladował on ograniczenie podaży substancji odżywczych oraz biologicznie aktywnych w gruczole mlekowym podczas zasuszania. Aby jeszcze bardziej upodobnić ten mo-

del inwolucji *in vitro* do warunków fizjologicznych występujących w organizmie ciężarnej samicy, do pożywki hodowlanej, ubogiej w FBS, dodane zostały steroidy płciowe (17- β estradiol oraz progesteron). Uzasadnieniem tego doświadczenia był fakt, iż końcowy okres ciąży u krów pokrywa się z fazą zasuszania gruczołu mlekowego. Badania te wykazały, iż obydwie stosowane hormony steroidowe zwiększają poziom LC3-II w komórkach nabłonka gruczołu mlekowego krów linii BME-UV1, jednakże mechanizm tego oddziaływania na poziomie molekularnym pozostaje nieznanym (10, 31, 36).

Znaczenie autofagii w procesie mammogenezy

Rozwój gruczołu mlekowego krów i pełnienie przez niego funkcji wydzielniczych są regulowane przez interakcje komórek nabłonka gruczołu z macierzą zewnątrzkomórkową – ECM (extracellular matrix). Komórki nabłonka w warunkach *in vivo* tworzą sieć przewodów mlekonosnych i pęcherzyków wydzielniczych otoczonych macierzą zewnątrzkomórkową, bogatą w kolagen i lamininy. Dzięki kontaktowi z ECM komórki wytwarzają wyspecjalizowane połączenia z otaczającą je błoną podstawną, będącą również formą macierzy zewnątrzkomórkowej. Połączenie sygnałów pochodzących zarówno z oddziaływań komórek między sobą, jak i z macierzą zewnątrzkomórkową jest czynnikiem koniecznym w regulacji wielu ścieżek sygnałowych niezbędnych m.in. do proliferacji, różnicowania, adhezji, polarności i przeżycia (14, 24).

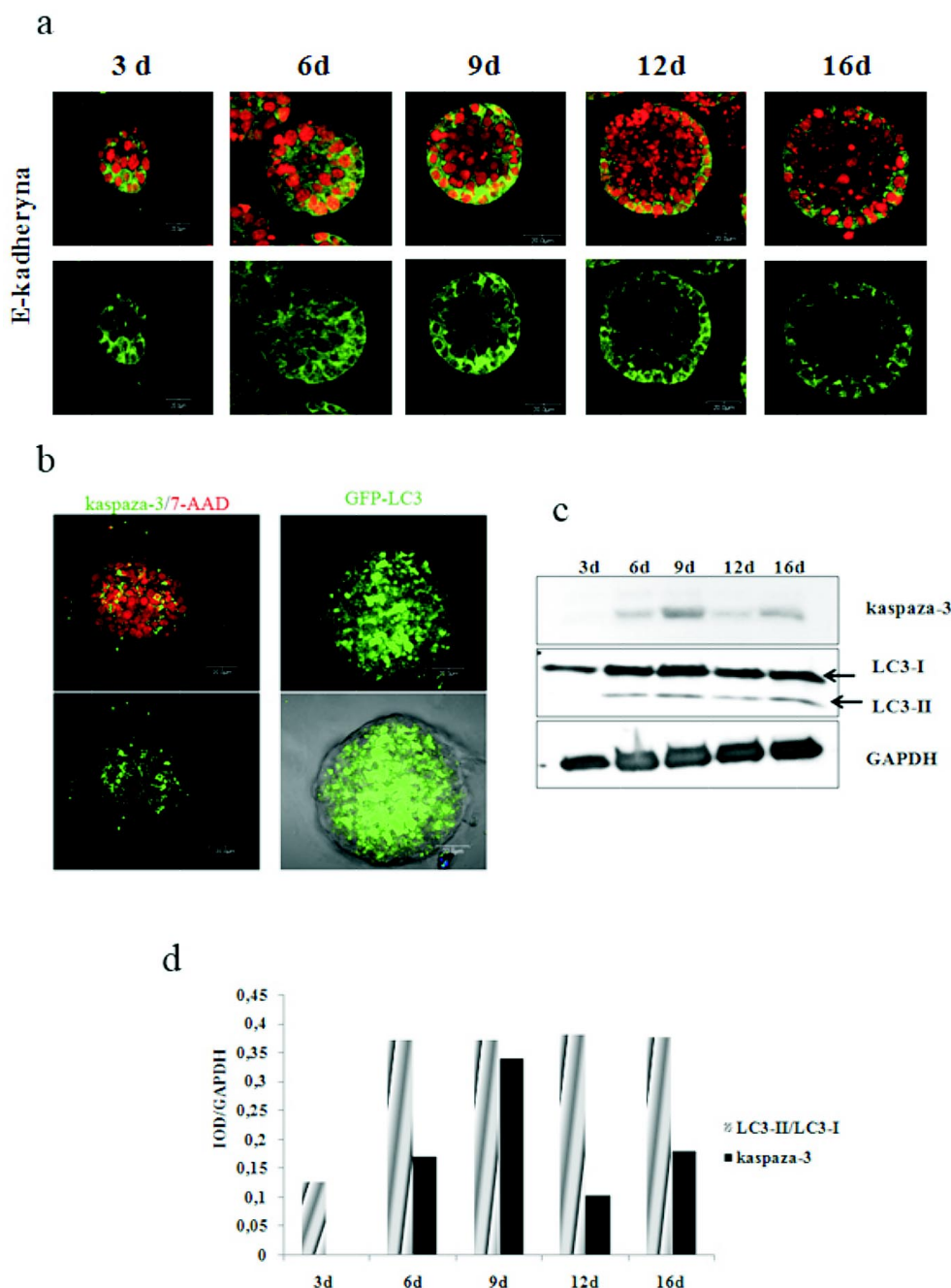
Komórki nabłonka gruczołu mlekowego hodowane w klasycznych hodowlach *in vitro* rosną w postaci jednej warstwy i nie wykazują typowej polaryzacji szczytowo-podstawnej. Jednakże po wysianiu na podłoże zawierające składniki ECM przechodzą one zmiany morfogenetyczne, co powoduje utworzenie biegunowo spolaryzowanych struktur pęcherzykowych nazwanych mammosferami, które są morfologicznie zbliżone do pęcherzyków mlekowych występujących w gruczole (6). Czynnikiem niezbędnym do utworzenia właściwych, spolaryzowanych i funkcjonalnych mammosfer w warunkach *in vitro* jest obecność składników błony podstawnej, takich jak: lamininy, kolagen typu IV czy entaktyna oraz obecność hormonów laktogennych. Tego typu podłoże dostępne jest komercyjnie pod nazwą Matrigel™ i zawiera białka macierzy zewnątrzkomórkowej wyizolowane z mysiego mięsaka Engelbretha–Holma–Swarma (EHS) (16). Komórki hodowane na Matrigelu tworzą połączenia z lamininą za pośrednictwem wytwarzanych przez siebie powierzchniowych receptorów integrynowych zlokalizowanych w części podstawnej błony komórkowej. Integryny działają jako komórkowe transbłonowe łączniki pośredniczące w interakcjach między cytoszkieletem i ECM, przez co regulują kształt, ruch i przekazują komórce sygnały niezbędne do przeżycia (1, 12, 19). Można również zauważyć, iż hodowle pierwotne komórek nabłonka gruczołu mlekowego na

składnikach ECM wykazują znaczną ekspresję cytokeratyn 18 i 14, będących, odpowiednio, markerami komórek nabłonka wydzielniczego (38) oraz komórek mięśniowo-nabłonkowych i wykazują ekspresję białek mleka: β -kazeiny, α -laktoalbuminy i β -laktoglobuliny w obecności hormonów laktogennych (37).

Komórki tworzące mammosfery początkowo ulegają podziałom, tworząc małe agregaty, przechodząc jednocześnie polaryzację szczytowo-podstawną. Proces polaryzacji komórek polega na inicjacji wydzielania przez część podstawną komórki składników błony podstawnej, lokalizacji aparatu Golgiego w części wierzchołkowej i wytworzeniu połączeń międzykomórkowych w części bocznej komórki (boczna lokalizacja desmosomów i boczno-szczytowa lokalizacja białek połączeń ścisłych, jak ZO-1 (zonula occludens), bądź boczna lokalizacja E-kadheryny) (6, 18).

Najwięcej danych dotyczących wzrostu komórek nabłonka gruczołu mlekowego na Matrigelu pochodzi z doświadczeń prowadzonych na komórkach mysich oraz ludzkich. Nasz zespół wprowadził model trójwymiarowych (3D) hodowli *in vitro* do badań nad procesem mammogenezy u bydła. Wykazano, iż tworzenie prawidłowo spolaryzowanych struktur pęcherzykowych przez komórki nabłonka gruczołu mlekowego linii BME-UV1, które osiągnęły pełne zróżnicowanie, rozpoczyna się od 6. dnia hodowli komórek na Matrigelu (17, 18). W pierwszych sześciu dniach zaobserwowano wzrost tworzących się struktur oraz podziały komórkowe. W tym czasie wszystkie komórki nabłonkowe tworzące mammosfery posiadały połączenia międzykomórkowe, o czym świadczy lokalizacja markerów polaryzacji komórkowej: E-kadheryny i ZO-1. W kolejnych dniach hodowli zaobserwowano różnicowanie się komórek, ich stopniową polaryzację oraz postępującą eliminację komórek znajdujących się w świetle pęcherzyka. W 16. dniu hodowli barwienie przeciwko E-kadherynie wykazywało jedynie pojedynczą warstwę komórek okalających światło pęcherzyka, a ZO-1 zlokalizowane było w szczytowej części komórek tworzących mammosfery, co w pełni potwierdza prawidłowość rozwijających się struktur (ryc. 1a) (17). Inni badacze uzyskali podobne tempo tworzenia struktur pęcherzykowych *in vitro*. Komórki ludzkiej linii MCF-10A do pełnej polaryzacji i zróżnicowania potrzebują około 2 tygodni (5), zaś mysia linia HC11 tworzyła w pełni spolaryzowane mammosfery w ciągu 10 dni (42).

Po pierwszym okresie tworzenia struktur pęcherzykowych przez komórki nabłonka gruczołu dochodzi do wyjścia komórek z cyklu komórkowego i oczyszczenia się światła utworzonej mammosfery poprzez szczególny rodzaj apoptozy (anoikis) komórek, które nie mają bezpośredniego kontaktu z podłożem. Badania wykazały, że anoikis silnie wzbudza autofagię (5, 39). W tym okresie w komórkach zlokalizowanych centralnie w mammosferach wzrasta ekspresja aktywnej formy kaspazy-3 (ryc. 1b, d), co potwierdza rolę



Ryc. 1. Rola apoptozy i autofagii podczas tworzenia się światła mammosfer linii BME-UV1 w 16. dniu hodowli. (a) boczna lokalizacja E-kadheryny w komórkach, świadcząca o prawidłowym tworzeniu się mammosfer; (b) apoptoza – zielone barwienie dotyczy aktywnej formy kaspazy-3 jako markera apoptozy, zlokalizowanej w centrum mammosfer; jądra wybarwiono 7-aktynomocyną D (7-AAD); autofagia – GFP-LC3 – zielone barwienie zlokalizowane w centrum mammosfer jako marker autofagii; (c i d) analiza Western-blot dla aktywnej formy kaspazy-3 oraz LC3 w mammosferach hodowanych przez 16 dni. Wykres prezentuje intensywność obu procesów w tworzących się mammosferach w przeliczeniu na białko referencyjne, jakim jest GAPDH

apoptozy w tworzeniu się światła mammosfer (5, 11), jednakże zablokowanie apoptozy (z wykorzystaniem białka antyapoptotycznego bcl-2 czy bcl-x_L) opóźnia jedynie o kilka dni tworzenie się światła powstałej mammosfery. Sugeruje to, iż komórki położone centralnie w tworzących się strukturach, wykazujące nadekspresję białka bcl-2 mogą być eliminowane na drodze alternatywnej do apoptozy śmierci autofagicznej (4). Wykazano również, iż TRIAL (tumor necrosis

factor related apoptosis inducing ligand) indukuje autofagię w komórkach nabłonkowych rosnących w hodowlach 3D, jednak w kombinacji z Bcl-x_L powoduje zahamowanie rozwoju mammosfer, co sugeruje, że to apoptoza jest odpowiedzialna za oczyszczanie się światła mammosfer z komórek (27). W tym przypadku autofagię należy traktować raczej jako reakcję obronną komórki w warunkach braku kontaktu ze składnikami ECM. Debnath i Mills (5, 28), zaobserwowali pojawienie się w obrazie z mikroskopu elektronowego licznych autofagicznych wakuoli w centralnie położonych komórkach rozwijających się mammosfer. Również doświadczenia prowadzone na komórkach bydłczej linii BME-UV1 rosnących w hodowlach 3D wykazały obecność autofagii w komórkach zlokalizowanych w centralnej części tworzących się mammosfer (ryc. 1b) (badania własne). W celu precyzyjnej lokalizacji autofagii w mammosferach wykorzystaliśmy konstrukct LC3 z białkiem zielonej fluorescencji GFP (green fluorescence protein), dzięki któremu można zlokalizować komórki o aktywnym procesie autofagii na podstawie kumulacji punktowego świecenia GFP w strukturze pęcherzykowej (ryc. 1b). Dodatkowo o aktywacji autofagii podczas tworzenia mammosfer świadczy wzrost poziomu aktywnej formy białka LC3 (LC3II) od 6. dnia hodowli komórek BME-UV1 na podłożu Matrigel (ryc. 1c) (badania własne). Wynika z tego, że aktywacja procesu autofagii rozpoczyna się w momencie, gdy zewnętrzna warstwa komórek wykazuje prawidłową polaryzację szczytowo-podstawną, zaś komórki znajdujące się wewnątrz struktury pęcherzykowej powoli tracą kontakt z podłożem. Jednocześnie zaobserwowano wzrost ilości aktywnej formy kaspazy-3 w kolejnych dniach hodowli. Apoptoza podobnie jak autofagia zlokalizowana była w centralnie położonych komórkach mammosfer (ryc. 1b, d). Tak

aktywacja procesu autofagii rozpoczyna się w momencie, gdy zewnętrzna warstwa komórek wykazuje prawidłową polaryzację szczytowo-podstawną, zaś komórki znajdujące się wewnątrz struktury pęcherzykowej powoli tracą kontakt z podłożem. Jednocześnie zaobserwowano wzrost ilości aktywnej formy kaspazy-3 w kolejnych dniach hodowli. Apoptoza podobnie jak autofagia zlokalizowana była w centralnie położonych komórkach mammosfer (ryc. 1b, d). Tak

wytworzone mammosfery zdolne są do ekspresjonowania białek mleka.

Najnowsze badania Funga i wsp. (8) wskazują, iż obecność autofagicznych wakuoli w komórkach centralnie zlokalizowanych w mammosferach jest mechanizmem obronnym, nie zaś prowadzącym do śmierci komórek, ponieważ łagodzi stres wywołany brakiem kontaktu komórek z ECM. W celu potwierdzenia tej tezy badacze zastosowali 3-MA (3-metyloadeninę – inhibitor tworzenia autofagosomów, poprzez zahamowanie aktywności PI3K), co wzmogło intensywność apoptozy w tych komórkach. Dodatkowo znokautowanie genów *atg5* i *atg7* (kodują białka odpowiedzialne za tworzenie autofagosomów) spowodowało również wzrost intensywności apoptozy w komórkach linii MCF-10A. Wyniki tych badań wskazują zatem na rolę autofagii jako mechanizmu przetrwania komórek, a nie ich degradacji, jednak mechanizm tego procesu jest nadal słabo poznany. Wykorzystując model trójwymiarowy udowodniono również, iż transformowane mysie komórki nabłonkowe linii E1A, które nie posiadają jednego allelu dla genu kodującego beklinę 1, wykazywały szybsze tworzenie się światła mammosfer w porównaniu do kontrolnych komórek (13). Jest to kolejny dowód na ważną ochronną rolę autofagii w mammogenezie gruczołu sutkowego.

Jak wspomniano wcześniej, właściwy rozwój i przeżycie komórek w mammosferach zależne są od prawidłowego kontaktu komórek z ECM, co z kolei zależy od białek powierzchniowych, jakimi są integryny. Autofagia jest również procesem zależnym od tych receptorów. Zablockowanie funkcji jednej z podjednostek integrynowych – integryny $\beta 1$ jest wystarczające, by wzbudzić autofagię, o czym świadczy pojawienie się autofagosomów w komórkach mających kontakt z ECM (4). Lock i wsp. (25) sugerują, iż w wyniku utraty kontaktu komórek z ECM dochodzi do aktywacji autofagii jako procesu chroniącego komórki przed stresem. Wyróżniono trzy główne szlaki związane z aktywacją autofagii w komórkach nie mających kontaktu z macierzą zewnątrzkomórkową: ścieżkę zależną od dostępności składników pokarmowych i czynników wzrostu, ścieżkę zależną od dostępności energii w komórce oraz ścieżkę związaną z warunkami stresowymi, tzw. ISR (integrated stress response). W wyniku braku kontaktu centralnie położonych komórek z ECM dochodzi do zablokowania ścieżki związanej z aktywnością receptorów dla czynników wzrostu, np. EGFR, co powoduje zablokowanie ścieżek sygnałowych zależnych od nich, np. kinazy mTOR. Zablockowanie kinazy mTOR powoduje aktywację autofagii. Autofagia jest również regulowana w odpowiedzi na czynniki stresowe. Fosforylacja eukariotycznego czynnika eIF2 α w pozycji seryny 51 powoduje aktywację ścieżki IRS poprzez zablokowanie translacji białek. W tym momencie, jak i podczas stresu energetycznego w komórce, autofagia dostarcza prostych składników odżywczych powstających w wyni-

ku degradacji składników komórkowych. Powstałe składniki są wykorzystywane do produkcji nowych białek i umożliwiają wytwarzanie ATP w komórce. W odpowiedzi komórki na czynnik stresowy autofagia powoduje wyrównanie poziomu ATP w komórce (24). W związku z tym w mammosferach autofagia jest traktowana jako proces chroniący komórki przez apoptozą i jest procesem poprzedzającym apoptozę. Debnath i wsp. (4) wykazali, iż zahamowanie autofagii z wykorzystaniem związków chemicznych, np. 3-MA, powoduje wcześniejsze pojawienie się apoptozy. Na tej podstawie można postawić hipotezę, iż autofagia jest procesem umożliwiającym obronę komórek przed anoikis. Podobny efekt uzyskano także w mysich komórkach nabłonkowych rosnących w hodowli 3D, nie posiadających jednego allelu dla bekliny 1 o genotypie *beklina*^{+/-}. W komórkach tych dochodziło do szybszego tworzenia się światła mammosfer w porównaniu z komórkami dzikimi (4).

Podsumowując, należy wnioskować o współzależnościach autofagii i apoptozy w tworzeniu światła pęcherzyków wydzielniczych w gruczole sutkowym. Autofagia pojawia się jako pierwsza w centralnie położonych komórkach, chroni je przed stresem wywołanym brakiem kontaktu komórek z ECM i poprzedza apoptozę. Brak kontaktu z ECM kreuje stan, w którym komórki nie otrzymują odpowiednich sygnałów życiowych, co powoduje indukcję autofagii jako mechanizmu mobilizującego rezerwy aminokwasowe i energetyczne, szczególnie w obliczu nasilenia wpływu czynników stresowych o działaniu apoptotycznym. Dopiero w kolejnym etapie rozwoju struktur pęcherzykowych pojawia się apoptoza, powodując śmierć komórek, w celu oczyszczenia światła struktur. Tak więc w tworzeniu pęcherzyków wydzielniczych w gruczole mlekowym istotną rolę ogrywa zarówno apoptoza, jak i autofagia.

Piśmiennictwo

1. Boudreau N., Sympton C. J., Werb Z., Bissell M. J.: Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 1995, 267, 891-893.
2. Bursch W.: The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 2001, 8, 569-581.
3. Cuervo A. M.: Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.* 2004, 14, 70-77.
4. Debnath J.: Detachment-induced autophagy during anoikis and lumen formation in epithelial acini. *Autophagy* 2008, 4, 352-35.
5. Debnath J., Mills K. R., Collins N. L., Reginato M. J., Muthuswamy S. K., Brugge J. S.: The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene expressing mammary acini. *Cell* 2002, 111, 29-40.
6. Debnath J., Muthuswamy S. K., Brugge J. S.: Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* 2003, 30, 256-268.
7. Debnath J., Walker S. J., Brugge J. S.: Akt activation disrupts mammary acinar architecture and enhances proliferation in an mTOR-dependent manner. *J. Cell Biol.* 2003, 163, 315-326.
8. Fung Ch., Lock R., Gao S., Salsa E., Debnath J.: Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol. Biol. Cell.* 2008, 19, 797-806.
9. Gajewska M., Gajkowska B., Motyl T.: Apoptosis and autophagy induced by TGF- $\beta 1$ in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells. *J. Physiol. Pharmacol.* 2005, 56, 143-157.

10. Gajewska M., Gajkowska B., Sobolewska A., Motyl T.: Autofagia w przebudowie gruczołu mlekowego bydła. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 1412-1416.
11. Gajewska M., Sobolewska A., Kozłowski M., Motyl T.: Role of autophagy in mammary gland development. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008, 59, 237-249.
12. Gilmore A. P., Metcalfe A. D., Romer L. H., Struli C. H.: Integrin mediated survival signals regulates the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *J. Cell. Biol.* 2000, 149, 431-446.
13. Karantza-Wadsworth V., Patel S., Kravchuk O., Chen G., Mathew R., Jin S., White E.: Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev.* 2007, 21, 1621-1635.
14. Katz E., Streuli C. H.: The extracellular matrix as an adhesion checkpoint for mammary epithelial function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007, 39, 715-726.
15. Kihara A., Kabeya Y., Ohsumi Y., Yoshimori T.: Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep.* 2001, 2, 330-335.
16. Kleinman H. K., Martin G. R.: Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin. Cancer Biol.* 2005, 15, 378-386.
17. Kozłowski M., Gajewska M., Majewska A., Jank M., Motyl T.: Differences in growth and transcriptomic profile of bovine mammary epithelial monolayer and three-dimensional cell cultures. *J. Physiol. Pharmacol.* 2009, 1, 5-14.
18. Kozłowski M., Motyl T.: Zastosowanie technik hodowli przestrzennych (3D) w badaniach biologii gruczołu mlekowego bydła. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 1417-1420.
19. Kuma A., Matsui M., Mizushima N.: LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. *Autophagy* 2007, 3, 323-328.
20. Larsen M., Artym V. V., Green A., Yamada K. M.: The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2006, 18, 463-471.
21. Lemasters J. J., Qian T., He L., Kim J. S., Elmore S. P., Cascio W. E., Brenner D. A.: Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis and autophagy. *Antioxid. Redox. Signal.* 2002, 4, 769-781.
22. Levine B., Klionsky D. J.: Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Develop. Cell* 2004, 6, 463-477.
23. Liang X. H., Kleeman L. K., Jiang H. H., Gordon G., Goldman J. E., Berry G., Herman B., Levine B.: Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J. Virol.* 1998, 72, 8586-8596.
24. Lin C. Q., Bissell M. J.: Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J.* 1993, 7, 737-743.
25. Lock R., Debnath J.: Extracellular matrix regulation of autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2008, 20, 583-588.
26. Meijer A., Codogno P.: Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004, 36, 2445-2462.
27. Melendez A., Talloczy Z., Seaman M., Eskelinen E.-L., Hall D. H., Levine B.: Autophagy genes are essential for dauer development and lifespan extension in *C. elegans*. *Science* 2003, 301, 1387-1391.
28. Mills K. R., Reginato M., Debnath J., Queenan B., Brugge J. S.: Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. *PNAS* 2004, 101, 3438-3443.
29. Mizushima N.: Methods for monitoring autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004, 36, 2491-2502.
30. Moore M. N., Allen J. I., Somerfield P. J.: Autophagy: role in surviving environmental stress. *Mar. Environ. Res.* 2006, 62, 420-425.
31. Motyl T., Gajewska M., Zarzyńska J., Sobolewska A., Gajkowska B.: Regulation of autophagy in bovine mammary epithelial cells. *Autophagy* 2007, 3, 484-486.
32. Motyl T., Gajkowska B., Zarzyńska J., Gajewska M., Lamparska-Przybysz M.: Apoptosis and autophagy in mammary gland remodeling and breast cancer chemotherapy. *J. Physiol. Pharmacol.* 2006a, 57, 17-32.
33. Ogier-Denis E., Codogno P.: Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochimica and Biophysica Acta.* 2003, 1603, 113-128.
34. Ohsumi Y.: Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001, 2, 211-216.
35. Otto G. P., Wu M. Y., Kazgan N., Anderson O. R., Kessin R. H.: Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 17636-17645.
36. Patingre S., Espert L., Biard-Piechaczyk M., Codogno P.: Regulation of macroautophagy by mTOR and beclin 1 complex. *Biochimie* 2008, 90, 313-323.
37. Rocha V., Hwang S., Ortiz C. L.: Casein secretion by mammary gland epithelia from collagen gel cultures and lactating glands. *J. Cell. Physiol.* 2005, 12, 343-348.
38. Schweizer J., Bowden P. E., Coulombe P. A., Langbein L., Lane E. B., Magin T. M., Maltais L., Omary M. B., Parry D. A., Rogers M. A.: New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J. Cell Biol.* 2006, 174, 169-174.
39. Shaw K. R., Wrobel C. N., Brugge J. S.: Use of three-dimensional basement membrane cultures to model oncogene-induced changes in mammary epithelial morphogenesis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2004, 9, 297-310.
40. Sobolewska A., Gajewska M., Zarzyńska M., 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, 117-130.
41. Tanida I., Ueno T., Kominami E.: LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004, 36, 2503-2518.
42. Xian W., Schwertfeger K. L., Vargo-Gogola T., Rosen J. M.: Pleiotropic effects of FGFR1 on cell proliferation, survival, and migration in a 3D mammary epithelial cell model. *J. Cell Biol.* 2005, 171, 663-673.
43. Zarzyńska J., Gajkowska B., Wojewódzka U., Dymnicki E., Motyl T.: Apoptosis and autophagy in involuting bovine mammary gland is accompanied by up-regulation of TGF- β 1 and suppression of somatotrophic pathway. *Polish J. Vet. Sci.* 2007, 10, 1-9.

Adres autora: mgr Agnieszka Sobolewska, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: sobolewskaa@interia.pl