

AUTOFAGIA- ADAPTACYJNE MECHANIZMY MOLEKULARNE W WARUNKACH GŁODU

Małgorzata Tomasiak, Beata Cichacz, Agnieszka Pedrycz

Zakład Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

STRESZCZENIE

Autofagia jest bardzo starym procesem, podczas którego przy pomocy lizosomów usuwane są białka o długim okresie półtrwania oraz organella komórkowe. Autofagia może być wywołana przez mechanizmy stresowe dla komórki. Badania dowodzą, że autofagia odgrywa kluczową rolę w pozyskiwaniu składników odżywczych oraz w adaptacji do warunków głodu. Dzięki temu bierze udział w zachowaniu homeostazy w cytoplazmie i jądrze komórki. Osiągnięcie tego celu możliwe jest kilkoma drogami. W zależności od tego w jaki sposób substrat zostaje połączony z lizosomem mówimy o: makroautofagii oraz mikroautofagii. Dodatkowo część autorów wyróżnia również autofagię zależną od chaperonów. W niniejszym artykule opisano mechanizmy molekularne poszczególnych rodzajów autofagii ze szczególną uwagą poświęconą makroautofagii- jako najlepiej poznanemu typowi autofagii. **Słowa kluczowe:** autofagia, głód komórkowy, lizosomy, śmierć komórki.

ARTICLE INFO

PolHypRes 2015 Vol. 52 Issue 3 pp. 71-75

ISSN: 1734-7009 eISSN: 2084-0535

DOI: 10.1515/phr-2015-0018

Pages: 5, figures: 0, tables: 0

page **www** of the periodical: www.phr.net.pl

Typ artykułu: przeglądowy

Termin nadesłania: 05.06.2015r.

Termin zatwierdzenia do druku: 20.07.2015r.

Publisher

Polish Hyperbaric Medicine and Technology Society

WSTĘP

Autofagia jest jednym z morfologicznych typów śmierci komórki. Termin autofagia został wprowadzony w latach sześćdziesiątych XX wieku przez Christiana De Duve. Pochodzi od greckiego słowa φαγείν (jeść) oraz przedrostka αὐτο- (sam, samo) i oznacza „samożądanie” [1]. Filogenetycznie jest to bardzo stary proces, który prawdopodobnie pojawił się przed miliardem lat u organizmów jednokomórkowych podczas ich adaptacji w warunkach braku pożywienia [2]. Autofagia może być wywoływana przez mechanizmy stresowe dla komórki, takie jak głodzenie, infekcja patogenem, niedotlenienie, czy obecność rodników tlenowych.

Cechą charakterystyczną omawianego procesu jest współdziałanie lizosomów w degradacji białek. Umożliwia ona usuwanie z komórki białek o długim okresie półtrwania. Poprzez autofagię degradowane są niepotrzebne lub uszkodzone organella. Produkty odzyskane za jej udziałem służą często ponownie jako materiał budulcowy i energetyczny. Dzięki tym właściwościom autofagia umożliwia adaptację organizmu w przypadku głodzenia. Pełni ona również inne poznane dotychczas funkcje: bierze udział w syntezie surfaktantu na powierzchni pneumocytów II, dojrzewaniu erytrocytów, oraz biosyntezie neuromelaniny w neuronach dopaminergicznych.

W literaturze wyszczególnia się kilka rodzajów autofagii. W zależności od tego w jaki sposób substrat zostaje połączony z lizosomem mówimy o: makro-autofagii oraz mikroautofagii. Dodatkowo część autorów wyróżnia również autofagię zależną od chaperonów.

Jako pierwsza u ssaków opisana została makroautofagia, jest ona głównym źródłem aminokwasów oraz innych podstawowych składników potrzebnych organizmowi w warunkach braku pożywienia. W przebiegu makroautofagii całe regiony cytoplazmy, zawierające różne organelle, zostają otoczone podwójną lub wielokrotną błoną wytwarzając zamknięte wakuole nazwane autofagosomami [3]. Błona fagosomu może pochodzić z aparatu Golgiego, retikulum endoplazmatycznego, błony komórkowej lub mitochondrium. Kolejnym krokiem jest fuzja tych wakuoli z lizosomami, w wyniku czego do autofagosomu zostają uwolnione enzymy hydrolityczne, a pH wnętrza obniża się sprzyjając degradacji zawartego w środku materiału. Struktura powstała w ten sposób nazywana jest autofagolizosomem.

Za genetyczną regulację autofagii u człowieka, jako wieloetapowego procesu odpowiadają geny AUT i ATG.

W procesie autofagii bierze udział 27-30 białek Atg1-Atg30 [4,5]. Białka te można podzielić na cztery grupy.

- Białkowe kinazy serynowo-treoninowe Atg/UKL1/2 regulowane aktywnością kinazy mTOR (mammalian Target of Rapamycin). Sygnały hormonalne oraz deficyt aminokwasów indukuje autofagię która jest kontrolowana przez ścieżkę sygnałową zależną od mTOR). Do zahamowania dochodzi podczas połączenia cząsteczki GTP z trimerem białka Gi3, natomiast połączenie z GDP stymuluje sekwestrację składników cytoplazmy [6].
- Lipidowe kinazy PI3K/Vps34 kompleks ten pośredniczy w nukleacji pęcherzyków czyli tworzeniu błony pęcherzyka autofagosomu. Bierze też udział w wewnątrzkomórkowym przemieszczaniu elementów cytoszkieletu oraz sekwestracji substratów do wakuoli autofagalnych.
- Ubikwitynopodobny system koniugacyjny Atg12-Atg5.
- Ubikwitynopodobny system koniugacyjny Atg8-PE.

Kompleksy ubikwitynopodobne pośredniczą we wzroście pęcherzyków. Dwa przezbłonowe białka mAtg9 oraz VMP1, biorą udział w recykulacji białek Atg [7].

Kinaza serynowo-treoninowa (mTOR) przy pomocy aminokwasów i czynników wzrostu, wpływa na regulację wzrostu komórek, transkrypcję, translację, powstawanie rRNA i rybosomów, oraz na proliferację i ruch komórki.

Brak składników odżywczych prowadzi do zahamowania aktywności TOR, wzbudzając różnorodne odpowiedzi komórkowe np. zatrzymanie rozwoju komórki w fazie G1, zatrzymanie syntezy białek, zmiany w transkrypcji białek oraz aktywację białkowej kinazy UKL1.

Autofagia jest regulowana przez przeciwstawne działanie kinaz mTOR i UKL1. Hamowanie mTOR za pomocą rifamycyny zwiększa aktywność kinazy UKL1 podczas gdy aktywacja mTOR przez białko RHEB silnie tłumi aktywację UKL1 [8]. UKL1 oraz PI3K wpływają na inicjację procesu autofagii jako składnik większego kompleksu białkowego [8]. Kinazy te wpływają na aktywację dodatkowych białek ATG znajdujących się na błonie fagoforów powodując ich dojrzewanie.

Podczas indukcji Atg1 tworzy kompleks z Atg13 oraz ATG101 w błonie fagoforu odpowiadający za jej wydłużanie. To właśnie ten kompleks białek jest ujemnie regulowany przez TOR [9]. Atg1 odpowiada również za fosforylację Atg9. Aktywowane białko Atg9 jest niezbędne przy skutecznej rekrutacji Atg 8 oraz Atg18 do tworzenia autofagosomu [10].

Za inicjację procesu odpowiada również Beklina 1 kodowana przez gen BECN1. Jest proteiną zaangażowaną wraz z kinazą tri fosforanu-fosfatydyloinozytolu (PI3K) w transport substratów do wakuoli autofagalnych. Kompleks ten można odnaleźć w części trans aparatu Golgiego co wskazuje że funkcją kompleksu jest kontrola autofagii przez dostarczenie tri fosforanu fosfatydyloinozytolu z aparatu Golgiego do błon izolujących (Lamparska-Przybysz 2005). Aktywność Bekliny 1, może zostać hamowana udziałem antyapoptotycznych białek Bcl-2 i Bcl-X_L. Podczas formowania się autofagosomu zostają wytworzone dwa skoniugowane systemy. Pierwszy angażuje cztery białka Atg 5,7,10,12, drugi jest połączeniem fosfatydyloetanoloaminy z kompleksem Atg8-Aut7 [11].

Ludzkim homologiem Atg-8 jest białko LC-3 (MAP1LC3 - microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3). Wyróżniamy dwie postaci tego białka: LC3-I występujące w cytoplazmie, ich liczba jest zmienna w różnych typach komórek oraz LC3-II jest związane z powierzchnią autofagosomu, korelując z ich liczbą [12]. Proteaza Atg 4 prowadzi podczas modyfikacji potranslacyjnej do odcięcia 22-aminokwasowego fragmentu na C-końcu na łańcuchu lekkim białka LC-3 ekspozując w ten sposób resztę glicyny. Atg 7 oraz Atg 3 katalizują reakcje z udziałem kompleksu Atg12-Atg5-Atg16L prowadzące do koniugacji LC3-I z fosfatydyloetanoloaminą (PE) za pośrednictwem wyeksponowanej reszty glicyny. Powstała LC3II zdolna jest do połączenia z wewnętrzną i zewnętrzną błoną autofagosomu. Proces przekształcania LC3I w formę LC3II ulega wzmocnieniu po indukcji autofagii. LC3II obecne już na błonie fagoforu łączy się z białkiem p62/SQTM1 które bierze udział w załadunku autofagosomu oraz jest połączone ze składnikami przeznaczonymi do degradacji [13].

Dochodzi do przemieszczenia substratu wraz z LC3 do wnętrza autofagosomu. Produkty trawienia odbywającego się w autolizosomie zostają uwolnione z powrotem do cytoplazmy. Po procesie autofagi poziom LC3II i p62/SQTM1 wewnątrz autolizosomu maleje. LC3II w cytozolu zostaje uwolnione przez Atg4B i ponownie przekształca się w LC3 I. LC-3II jest wiarygodnym wskaźnikiem molekularnym autofagii. [6]. LC3 znakowane fluorescencyjnie można obserwować w postaci małych punkcików które są tworzącymi się autofagosomami.

Mikroautofagią nazywamy zjawisko pochłaniania na zasadzie endocytozy cytozolu przez lizosomy. Degradacja zawartych w nim makrocząsteczek zachodzi za pomocą małych wypukleń błony lizosomalnej. Nie jest wymagane tworzenie autofagosomów. Ten rodzaj autofagii odgrywa znacznie większą rolę w selektywnej degradacji organelli. Peksofagia ma miejsce w peroksysomach i może zachodzić na drodze mikro- lub makroautofagii.

Autofagia zależna od chaperonów wymaga obecności na błonie lizosomów odpowiednich receptorów. Aby doszło do wiązania białka przeznaczonego do degradacji z receptorem konieczny jest udział cytozolowych chaperonów, to właśnie kompleks chaperon-substrat wiąże się z receptorem obecnym na błonie lizosomu. Kolejny chaperon odpowiada za przemieszczenie substratu do wnętrza lizosomu. Każde białko będące substratem zawiera w swojej sekwencji aminokwasowej kierujący do lizosomu fragment KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln). Motyw ten jest rozpoznawany przez cytozolowy chaperon- białko szoku termicznego hsc73. Następnie utworzony kompleks substrat- hsc73 łączy się z receptorem Lamp2q umieszczonym na błonie lizosomu. Również chaperon, tym razem zlokalizowany wewnątrz lizosomu przyczynia się do translokacji białka z powierzchni błony do wnętrza gdzie następnie substrat poddawany jest hydrolizie.

Autofagia jest procesem nieselektywnym, dotyczącym wszystkich makrocząsteczek cytoplazma-tycznych w jednakowym stopniu. Rozkładane są również mitochondria, peroksysomy i fragmenty aparatu Golgiego. Autofagia umożliwia utrzymanie hemostazy w cytoplazmie i jądrze komórki, uznawana jest również za strategię przetrwania komórki, kiedy zostaje ograniczony dostęp do substancji pokarmowych. Większość rozkładanych w autofagolizosomie komponentów jest źródłem składników odżywczych, umożliwiających komórce przeżycie przy możliwie najniższym zużyciu energii.

Klasycznym przykładem jest komórka wątroby, w której autofagia rozpoczyna się w sytuacji głodu w celu produkcji aminokwasów, które są przekształcane do glukozy i dostarczane do organów najbardziej potrzebujących takich jak mózg oraz do erytrocyty [14]. Zaburzenia autofagii prowadzą do wielu stanów patologicznych takich jak neurodegeneracja spowodowana przez akumulację agregatów białkowych; uszkodzenie mięśni do którego dochodzi przy akumulacji autofagosomów osłabiających działanie komórki; nowotwory [15].

BIBLIOGRAFIA

1. Klionsky DJ. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy* 2008; 4(6): 740-43 DOI 10.4161/auto.6398.
2. Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagy in the Eukaryotic Cell. *Eucaryotic Cell* 2002; 1(1):11-21, DOI 10.1128/EC.01.1.11-21.2002.
3. Ostrowski K; *Histologia*. Wyd. 2 Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL ; 1995: 667-669 Polish [Histology. 2nd edition] ISBN 83-200-1869-2.
4. Klionsky D, Gregg J, Dunn W, Emr S, Sakai Y, Sandoval I, et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell*. 2003; 5: 539-545 DOI 10.1016/S1534-5807(03)00296-X.
5. Luneman JD, Munz C: Autophagy in CD4+ T-cell immunity and tolerance. *Cell Death Differ*. 2009; 16: 79-85, DOI 10.1038/cdd.2008.113.
6. Lamparska-Przybylska M, Motyl T. Autofagia narzędzie przeżycia czy śmierci komórki nowotworowej. *Post Biol Kom*. 2005; 32: 13-22 Polish [Autophagy in cancer cell as a toll providing cell to death or life].
7. Polewska J. Autofagia- mechanizm molekularny, apoptoza i nowotwory. *Post Hig Med Dosw* 2012; 66: 921-36, DOI 10.5604/17322693.1021109 Polish [Autophagy- molecular mechanism, apoptosis and cancer].
8. Dunlop EA, Tee AR. mTOR and autophagy: A dynamic relationship governed by nutrients and energy. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 36: 121-129, DOI 10.1016/j.semicdb.2014.08.006.
9. Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Negano K, Oshumi M, Oshumi Y. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol*. 2000; 150(6): 1507-1513, DOI: 10.1083/jcb.15.6.1507.
10. Papinski D, Schuschling M, Reiter W, Wilhelm L, Barnes CA, Maiolica A, et al. Early steps in autophagy depend on direct phosphorylation of Atg9 by the Atg1 kinase. *Mol Cell* 2014; 53: 471-483, DOI 10.1016/j.molcel.2013.12.0011.
11. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2001; 2(3):211-216, DOI 10.1038/35056522.
12. Ketteler R, Seed B. Quantitation of autophagy by luciferase release assay. *Autophagy* 2008; 4: 801-806, DOI 10.4161/auto.6401.
13. Clausen TH, Lamark T, Isakson P, Finley K, Larsen KB, Brech A, et al. p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. *Autophagy* 2010, 6(3): 330-344, DOI 10.4161/auto.6.3.11226.
14. Rudnicka KW, Szczęśna E, Miszczyk E, Mikołajczyk-Chmiela M. Apoptoza i Autofagia mechanizmy i metody detekcji. *Post Biol Komórki* 2006; 38: 247-265 Polish [Apoptosis and Autophagy- mechanisms and method of detection].
15. Świderek E, Strządała L. Autofagia i białko BNIP3 w nowotworach. *Postepy Hig Med Dosw* 2013; 67: 363-370 Polish [Autophagy and BNIP3 protein in tumorigenesis].

prof. dr hab. n. med. Agnieszka Pedrycz

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii z Pracownią Cytologii Doświadczalnej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.
ul. Radziwiłłowska 11 20-080, Lublin
e-mail: apw4@wp.pl