

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 współudział 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 m TOR). 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 recyrkulacji 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