

ARKADIUSZ ORZECZOWSKI

*Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa  
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN  
Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa  
E-mail: orzechowski\_arkadiusz@wp.pl*

## AUTOFAGIA, CZYLI WIELKIE SPRZĄTANIE

### HISTORIA

Rok 2016 okazał się łaskawy dla badaczy autofagii, Szwedzki Komitet Noblowski przyznał bowiem Nagrodę Nobla z Fizjologii lub Medycyny japońskiemu uczonemu Yoshinori Ohsumi za zidentyfikowanie genów odpowiedzialnych za molekularny mechanizm tego procesu. Autorem określenia „autofagia”, użytym po raz pierwszy (Ciba Foundation Symposium on Lysosomes, 12-14.02.1963 r.) do opisanie procesu degradacji różnych składników własnych komórki z udziałem lizosomów, był Christian de Duve. Przeciwstawił on termin autofagia (ang. eating self; zjadanie siebie), terminowi heterofagia (ang. eating others; zjadanie obcych). Obecnie, autofagia o jakiej myślał wtedy de Duve, znana jest jako makroautofagia, a zapoczątkowana zostaje uformowaniem się autofagosomów jako organelli przejściowych, otaczających przeznaczony do wtórnego wykorzystania materiał. Ten uczyony pochodzący z Belgii (Uniwersytet Katolicki w Leuven) sporą część swojej aktywności badawczej poświęcił lizosomom i to on jako pierwszy zidentyfikował lizosomy (zwane wtedy „ciałkami gęstymi” ze względu na ich wysoką gęstość elektronową w obrazach z TEM) jako organelle docelowe dla autofagosomów. *Nota bene*, autofagosomy (wakuole autofagiczne otoczone podwójną błoną, AV) były początkowo określane mianem „cytolizosomów”, a autorem tego określenia był Alex Novikoff, który wysledził obecność mitochondriów, błon siateczki, rybosomów i innych składników komórkowych w obrębie struktur re-

agujących pozytywnie na obecność kwaśnej fosfatazy, markera lizosomów (cytochemiczna metoda barwienia wg Gomori). W tym czasie główny spór uczonych dotyczył genezy wakuoli autofagicznych, ich ewolucji i dalszych losów. Wcześniej, w latach 50. ubiegłego wieku, proces stopniowej dekompozycji i utraty prawidłowej struktury składników komórkowych, takich jak siateczka śródplazmatyczna, rybosomy czy mitochondria (roli i definicji wielu pozostałych organelli jeszcze wówczas nie znano), de Duve nazywał „fizjologiczną autolizą” dopuszczając, że lizosomy mogą w pewnych okolicznościach zabić komórkę (ang. suicide bag), w szczególności jeśli błona lizosomalna zostanie przerwana. Było to wówczas, kiedy de Duve nie wiedział jeszcze jaką dokładnie funkcję w autofagii pełni lizosom. Pomimo wielu „poszlak” wskazujących na lizosom jako potencjalnego „winowajcę” eliminacji organelli komórkowych (organella destrukcyjna), nikt wcześniej nie dostarczył przekonującego opisu autofagii. Pomysł na wyjaśnienie roli lizosomów w autofagii podsunęła Christianowi de Duve praca Keitha Portera (ASHFORD i PORTER 1962), amerykańskiego badacza pochodzącego z Kanady, pioniera mikroskopii elektronowej transmisyjnej. Zainteresowanie tą pracą wynikało z faktu, że jej autorzy wykonali porównawcze badania elektronomikroskopowe bioptatów szczurzych wątrób perfundowanych płynem zawierającym (lub nie) trzustkowy hormon glukagon. Christian de Duve ujawnił wcześniej, że pierwsze preparaty insuliny nie były wystarczająco dobrze oczyszczone z domieszki glukagonu, co powodowa-

ło w organizmie wystąpienie skutków ubocznych. Już po 15 minutach perfuzji z udziałem glukagonu, Ashford i Porter zauważyli w hepatocytach wyraźny wzrost liczby „ciałek gęstych” oraz ich destrukcyjny wpływ na organelle komórkowe. Dodatkowo, stwierdzili inną wewnątrzkomórkową lokalizację lizosomów (rejon okołojądrowy) w stosunku do warunków kontrolnych (rejon okołokanalikowy). Mikrografie z TEM zamieszczone w pracy są prawdopodobnie pierwszym, tak wyraźnym obrazem wakuol autofagicznych i autolizosomów. Interpretując obrazy, badacze zasugerowali jednak, że pod wpływem glukagonu lizosomy powstają *de novo* w cytoplazmie, otaczając błoną fragmenty komórki przeznaczone do destrukcji. Dzisiaj wiemy, że jest inaczej, a materiał przeznaczony do usunięcia jest dostarczany lizosomom na różne sposoby, w zależności od tego czy jest to mikro-(MiA), makro-(MaA) czy autofagia zależna od białek opiekuńczych (ang. chaperone mediated autophagy, CMA). Tak czy inaczej, okazało się, że glukagon należy do fizjologicznych stymulatorów autofagii, zmuszając hepatocyty do pozyskania tą drogą substratów niezbędnych do syntezy glukozy (glukagon w przeciwieństwie do insuliny należy do grupy hormonów glikogenolitycznych i glukoneogennych co oznacza, że jego wydzielanie wzrasta w przypadkach hipoglikemii). Wreszcie w referacie *The lysosome concept* Christian de Duve mógł przedstawić swoją hipotezę na temat znaczenia lizosomów, ich właściwości biochemicznych, funkcji fizjologicznych i następstw dla patologii chorób. Badania nad rodzajami i fizjologiczną rolą poszczególnych organelli komórkowych przyniosły Christianowi de Duve, Georgowi Palade i Albertowi Claude Nagrodę Nobla z Fizjologii lub Medycyny w 1974 r. Obszerny materiał na ten temat można znaleźć w wywiadzie, jaki przeprowadził Daniel J. Klionsky z autorem koncepcji lizosomalnej (KLIONSKY 2008).

Ubiegłoroczny (2016 r.) laureat Nagrody Nobla z Fizjologii lub Medycyny, Yoshinori Ohsumi, zasłynął z kolei z prac wykonanych na modelu komórkowym drożdży piekarskich (*Saccharomyces cerevisiae*), ukazujących geny autofagii i wyjaśniających rolę każdego z nich w kolejnych etapach tego procesu. Zrobił tym samym ogromny krok naprzód w stosunku do obserwacji mikroskopowych, wykazał bowiem istnienie związków przyczynowo-skutkowych pomiędzy białkami, produktami genów autofagii, w reakcjach poszczególnych faz autofagii. Ohsumi posłużył się w tym celu techniką przeszukiwania genomu (ang. mutational screening), dzięki czemu odkrył, które geny i na jakim etapie autofagii ratowały komórki przed śmiercią

wywołaną np. głodem azotowym (deficyt związków azotowych w pożywce wzrostowej). Zespół kierowany przez laureata opisał w ten sposób rolę niemal każdego z białek i struktur autofagicznych (TAKESHIGE i współaut. 1992, TSUKADA i OHSUMI 1993, BABA i współaut. 1994, MIZUSHIMA i współaut. 1998, OHSUMI i współaut. 2001, YAMAMOTO i współaut. 2016). Prace Ohsumi i jego współpracowników pozwoliły na zweryfikowanie obserwacji uzyskanych na drożdżach, w organizmach roślin i zwierząt.

Okazało się, że autofagia jest ewolucyjnie wysoce konserwatywnym i filogenetycznie starym procesem, wspólnym dla królestw roślin, grzybów i zwierząt, co nie powinno dziwić, biorąc pod uwagę jej podstawową rolę w przeżyciu komórek. W pewnych sytuacjach autofagia może jednak przyczynić się do śmierci komórek (programowana śmierć komórki typu 2), kiedy ma gwałtowny, ekstensywny i nieselektywny charakter, a organelle poddane dekompozycji są niezbędne do życia (np. mitochondria). Autofagia wykonuje swoje zadania automatycznie w odpowiedzi na sygnały, podobnie jak sprzątaczką, która bez wahania wykonuje polecenia. Komórka może umrzeć także wówczas, kiedy autofagia jest upośledzona w stopniu uniemożliwiającym usunięcie uszkodzonych organelli. Powodują one nieporządek i blokują powstanie funkcjonalnie sprawnych struktur komórkowych. Śmierć komórki następuje wówczas na drodze apoptozy (programowana śmierć komórki typu 1), jako altruistyczne wyeliminowanie się nieprawidłowej komórki dla dobra tkanki. W tym drugim przypadku autofagię można porównać z leniwą lub niesprawną sprzątaczką, która odmawia lub nie może wykonać poleceń, co prowadzi w końcu do nagromadzenia się śmieci w stopniu uniemożliwiającym wykorzystanie i działanie obiektu, jakim jest komórka.

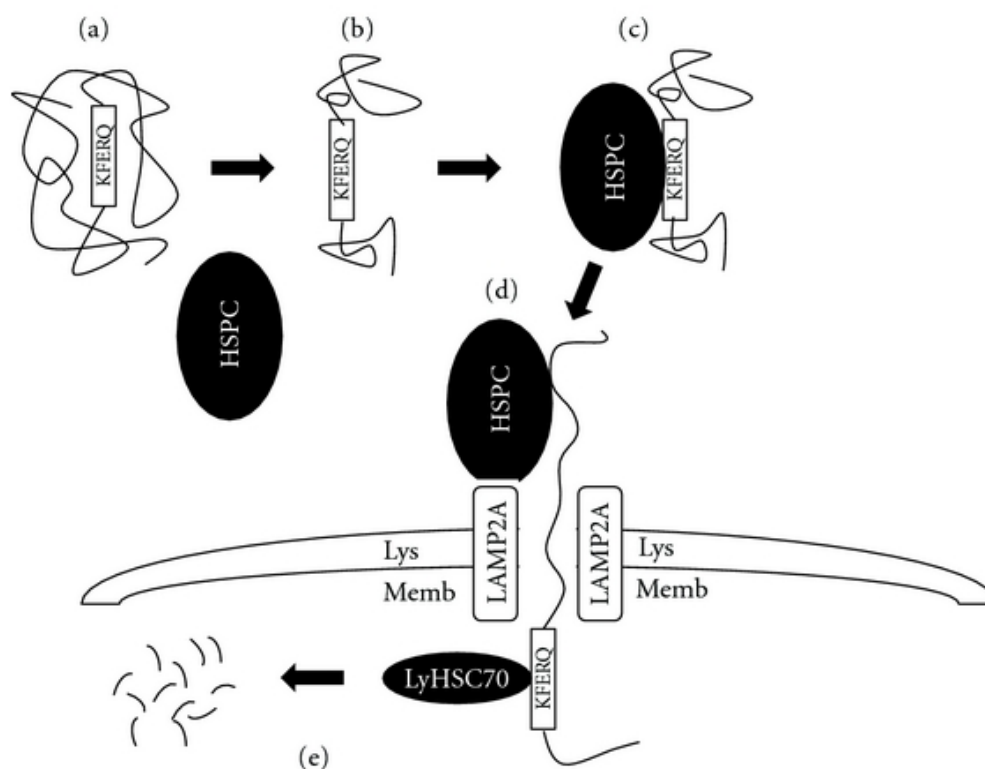
Przywrócenie uszkodzonej komórce prawidłowych funkcji wymaga więc od autofagii usunięcia dysfunkcyjnych składników, ich degradację i udostępnienie produktów degradacji aparatowi syntezy. Prawidłowo działającą autofagię można zatem przyrównać do pedantycznej sprzątaczką, która nie tylko utrzymuje porządek i właściwe relacje pomiędzy poszczególnymi kompartmentami komórki reprezentowanymi przez jej organelle (również ich składowe), ale równocześnie dba o ich możliwe pełne, wtórne zagospodarowanie. Zauważono, że autofagia w komórkach zachodzi ciągle w niewielkim, tj. podstawowym zakresie (autofagia konstytutywna), co można uważać za coś w rodzaju „przetarcia kurzu” przez sprzątaczkę. Ma ona wówczas charakter selektywny (wybiórczy) i dominuje jej forma zależna od białek

opiekuńczych (CMA), w mniejszym stopniu jest to makroautofagia. Selektywne makroautofagia i CMA polegają w pierwszym rzędzie na molekularnym rozpoznaniu materiału przeznaczonego do degradacji, wybrane składniki usuwane są więc z komórki celowo, a uzyskane dzięki temu „surowce” mogą być wykorzystywane powtórnie lub stanowić źródło energii. W okresach zagrożenia czynnikami uszkadzającymi, kiedy dochodzi do naruszenia prawidłowej struktury i budowy komórki, sytuacja wymaga szybkiego działania, tak więc przynajmniej na początku dominuje wówczas autofagia nieselektywna, głównie makroautofagia, która w miarę postępów uprzątkowania „nieporządku po burzy” przechodzi w autofagię selektywną, przede wszystkim CMA. Nieselektywną autofagię można również zaobserwować w sytuacji deficytu źródeł energii (głodzenie). Może być ona wówczas indukowana w hepatocytach wątroby na drodze hemokrynnej, np. przez

glukagon, jak zauważyli to zresztą ASHFORD i PORTER (1962).

#### SYSTEM UTYLIZACJI I RECYKLINGU ODPADÓW W KOMÓRCE NA PRZYKŁADZIE AUTOFAGII ZALEŻNEJ OD BIAŁEK OPIEKUŃCZYCH

O znaczeniu autofagii dla prawidłowego funkcjonowania komórek świadczą liczne dane literaturowe wskazujące, że w etiologii chorób neurodegeneracyjnych (chorobie Parkinsona, PD; Alzheimer, AD), miopatiach, cukrzycy typu II, otyłości, chorobach sercowo-naczyniowych czy nowotworach podstawowe znaczenie ma wadliwe działanie autofagii (JAEGER i współaut. 2010, ROSE i współaut. 2011, DERETIC 2009, LIU i współaut. 2011, ESSICK i SAM 2010, YANG i współaut. 2010, MORSELLI i współaut. 2010, GOLIGORSKY 2010). Jak już wcześniej wspomniano, znane są trzy uzupełniające się



Ryc. 1. Autofagia zależna od białek opiekuńczych (CMA).

W normalnie uformowanym białku sekwencja aminokwasowa KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) jest niedostępna dla Hsc70, dzięki czemu takie białko jest zabezpieczone przed przypadkową eliminacją przez kompleks HSPC (a). Brak fałdowania lub nieprawidłowe fałdowanie białka (b) powodują, że takie białko staje się substratem dla HSPC. Połączenie z HSPC (c) zapewnia transport oraz wprowadzenie substratu do lizosomu, gdzie następuje jego degradacja (d). Białko przeznaczone do degradacji przez CMA zostaje rozpoznane i wprowadzone do lizosomu przez kanał utworzony z LAMP-2A. Lizosomalne białko Hsc70 (Lys-Hsc70) przechwytuje ładunek wprowadzony do lizosomu i przeznaczonego do degradacji. LEANNE PEREIRA, JOHN PAUL GIRARDI, AND MARICA BAKOVIC, “Forms, Crosstalks, and the Role of Phospholipid Biosynthesis in Autophagy,” *International Journal of Cell Biology*, vol. 2012, Article ID 931956, 10 pages, 2012. doi:10.1155/2012/931956.

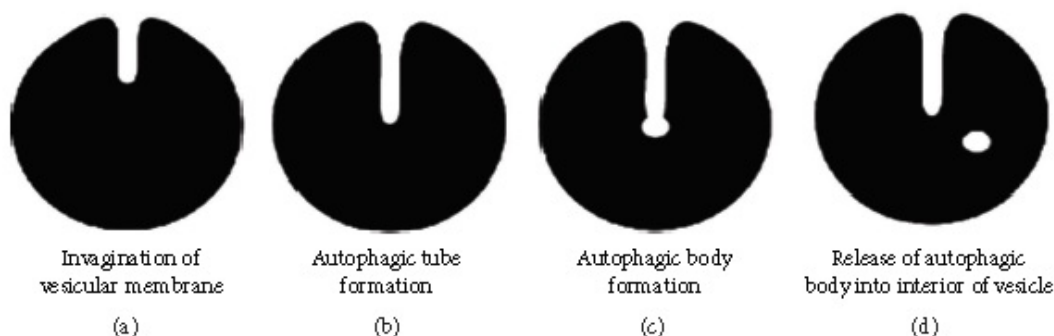
mechanizmy oczyszczania komórek ze „śmieci” (CMA, MiA i MaA), które w warunkach prawidłowych prowadzą do przeniesienia materiału zakwalifikowanego jako uszkodzony do wnętrza lizosomów. Lizosomy pełnią zatem rolę „przetwórci odpadów”, zapewniając użyteczne, drobnocząsteczkowe substraty do dalszych przemian. Cały ten z pozoru skomplikowany system jest częścią większej i rozbudowanej maszyny katabolicznej komórki.

CMA przypomina uniwersalny mechanizm transportu białek do mitochondrium lub siateczki śródplazmatycznej, albowiem wymaga sekwencji sygnałowej w cząsteczce substratu. W porównaniu z tym ostatnim, CMA przebiega jednak w dość wyrafinowany sposób (Ryc. 1). Białka, które w łańcuchu peptydowym posiadają sygnałową sekwencję aminokwasową KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln), stanowią 25-30% wszystkich białek, a wymieniony pentapeptyd w przypadku uformowania dojrzałych funkcjonalnie białek jest niedostępny. Niezależnie od przyczyny, w uszkodzonych białkach z sekwencją KFERQ ulega ona udostępnieniu do oddziaływań z białkami opiekuńczymi HSC (ang. heat shock cognate). Transport uszkodzonego białka wymaga dodatkowo obecności białkowych receptorów cytozolowych i lizosomalnych oraz energii uwalnianej z ATP pod wpływem zależnej od  $Mg^{2+}$  ATPazy. Najpierw HSC73 (m.c. 73 kDa) rozpoznaje motyw KFERQ w uszkodzonym białku, przy czym pełną aktywność uzyskuje po hydrolizie ATP i połączeniu z ADP (cecha wspólna białek opiekuńczych HSP/HSC). Teraz pozostałe składniki kompleksu transportowego (ang. heat shock protein complex, HSPC) mogą zacząć współpracować z HSC73 w celu skierowania substratu do lizosomu. W celu wprowadzenia do lizosomu ładunku, połączone HSPC-substrat muszą związać się z białkowym receptorem LAMP-2A (ang. lysosome-associated membrane protein 2A). Istnieją trzy izoformy LAMP-2A, wytwarzane na bazie różnych wariantów mRNA, uformowanego w oparciu o alternatywne składowanie sekwencji kodujących (egzonów) genu *LAMP2*. Mają one wspólne domeny transbłonowe i wewnątrzlizosomalne, ale różnią się domeną cytozolową. To właśnie domeny cytozolowe, elektrycznie naładowane dodatnio dzięki aminokwasom zasadowym, decydują o „rozpoznananiu” substratu (sekwencje aminokwasowe KRHH/KHHH, Lys-Arg-His-His/Lys-His-His-His) i wyprostowaniu łańcucha polipeptydowego substratu tak, by mógł on przedostać się przez kanał w błonie lizosomu. W świetle lizosomu działa natomiast lyso-HSC73, białko opiekuńcze, które przechwytuje „ładunek” oddzielony od HSPC i prze-

znaczony do degradacji przez hydrolazy lizosomalne. Rozważając fizjologiczne znaczenie CMA w organizmie należy podkreślić, że ta ścieżka katabolizmu białek występuje tylko w niektórych tkankach (wątroba, serce) podczas długotrwałego głodzenia, nie zachodzi natomiast w mięśniach szkieletowych (WING i współaut. 1991, CUERVO i współaut. 1995). Ponadto, białka zawierające peptyd KFERQ charakteryzuje długi okres półtrwania (około 48 godz.), a CMA odpowiada za usuwanie z komórki w warunkach prawidłowych od 5-10% białek, zaś w przypadku głodzenia do 30-40% (MIZUSHIMA i współaut. 2001). CMA podlega także regulacji, przy czym niektóre czynniki wzrostu (ang. epidermal growth factor, EGF) hamują ten proces, dodatkowo aktywność CMA maleje wraz z wiekiem (CUERVO i DICE 2000). Głównym elementem podlegającym kontroli jest LAMP-2A i nie dotyczy to genu *LAMP2*, lecz jego produktu. LAMP-2A jest w pierwszym rzędzie eliminowany przez lizosom, po odłączeniu od błony lizosomalnej. Wyższy poziom ekspresji LAMP-2A, widoczny w okresach głodzenia komórki, jest podtrzymywany przez HSC90, a ulega obniżeniu pod wpływem HSC73 (BANDYOPADHYAY i współaut. 2008). W przeciwieństwie do cytozolowego HSC73, lizosomalny HSC73 (ly-HSC73) pobudza CMA (CUERVO i współaut. 1997). Pomimo że CMA odpowiada tylko częściowo za eliminację uszkodzonych białek, albowiem jej aktywność dotyczy wyłącznie składników cytoplazmy, to i tak zapewnia „segregację śmieci” kontrolowaną przez dostępność sekwencji sygnałowej KFERQ. Bardziej szczegółowy opis autofagii zależnej od białek opiekuńczych może czytelnik znaleźć w pracach przeglądowych (TERLECKY 1994, CUERVO i DICE 1998).

#### MIKROAUTOFAGIA, CZYLI SPRZĄTANIE ZDROWYCH ROSNĄCYCH KOMÓREK

Lizosomy i endosomy, a u grzybów i roślin wakuole, mogą samodzielnie zidentyfikować i pochłoniąć materiał komórkowy uznany za śmieć. W procesie zwanym mikroautofagią (MiA), błona wymienionych organelli ulega wpukleniu, do którego wpada część cytoplazmy zawierająca „nieczystości”. Utworzona studzienka pogłębia się w kierunku wnętrza organelli tworząc cewę autofagiczną, wewnątrz której znajduje się pochłaniany materiał, pozostając w ciągłości z resztą cytoplazmy. Gdy cewa autofagiczna sięgnie centralnej części organelli, ulega rozszerzeniu w buławkowaty twór określany mianem ciała autofagicznego. Brzeży błony u podstawy rozszerzenia łączą się, a utworzony w ten sposób pęcherzyk wraz z zawartością odłącza się, pozostając we wnętrzu organelli



Ryc. 2. Mikroautofagia (MiA).

Bezpośrednie wgłobienie (inwaginacja) błony wakuoli autofagowej (lizosomu i/lub endosomu) pozwala pobrać fragment cytoplazmy (a). Inwaginacja pogłębia się i powstaje cewa, która się wydłuża w kierunku światła wakuoli (b). Utworzona cewa nazywa się cewą autofagiczną i stanowi jedność z cytoplazmą. Składniki cytoplazmy, które są obecne w cewie ulegają zamknięciu w pęcherzyku tworzącym się na jej końcu i ulegają degradacji pod warunkiem, że wakuola jest lizosomem lub, że wakuola (endosom) połączy się z lizosomem i uwolni swoją zawartość. Kiedy cewa dotrze do środka wakuoli na jej ślepy koniec tworzy się pęcherzyk zwany ciałem autofagicznym (c). Ciało autofagiczne ma większą średnicę niż cewa a w kolejnym etapie ściany cewy i pęcherzyka stopniowo się zbliżają do siebie by ulec fuzji. Fuzjowanie błon jest warunkiem oddzielenia się ciała autofagicznego od cewy i uwolnienia ciała do światła lizosomu lub endosomu (d). Zawartość ciała autofagicznego jest następnie trawiona w lizosomie lub stanowi jeden z pęcherzyków endosomalnego ciała wielopęcherzykowego (MVB). Jeśli endosom ulegnie fuzji z autofagosomem (amfisol) lub od razu zespoli się z lizosomem (autolizosom) zawartość endosomu ulegnie strawieniu. LEANNE PEREIRA, JOHN PAUL GIRARDI, AND MARICA BAKOVIC, "Forms, Crosstalks, and the Role of Phospholipid Biosynthesis in Autophagy," *International Journal of Cell Biology*, vol. 2012, Article ID 931956, 10 pages, 2012. doi:10.1155/2012/931956.

(Ryc. 2). Takich pęcherzyków może się utworzyć więcej niż jeden, mogą nawet wypełnić niemal całą organelę formując twór określany w terminologii elektronomikroskopowej ciałem wielopęcherzykowym (ang. multivesicular body, MVB). Proces odłączania ciała autofagicznego od cewy kontrolowany jest przez wakuolarny transporter koczaperonowy (ang. vacuolar transporter cochaperone, VTC), kompleks białkowy obecny na błonach siateczki śródplazmatycznej i wodniczek (wspólna nazwa dla lizosomów, endosomów i wakuol). Zjawisko wpuklenia się błony jest pobudzane przez kalmodulinę, białko aktywowane pod wpływem podwyższenia stężenia kationów  $Ca^{2+}$  w cytoplazmie. W tym przypadku jednak, kalmodulina łączy się i pobudza działanie VTC bez aktywacji wapniowej (UTTENWEILER i współaut. 2005). W MiA odnoszącej się do endosomów można wyodrębnić formy selektywną i nieselektywną. W postaci selektywnej identyfikacja „śmięci” jest identyczna, jak w przypadku CMA, to znaczy białka zawierające dostępny pentapeptyd KFERQ zostają przeznaczone do eliminacji przez HSC73. W błonie późnych endosomów (LE) brakuje białkowego receptora LAMP-2A, zatem inne składniki błony odpowiadają za wprowadzenie do wnętrza transportowanego ładunku. Wiele wskazuje na kwaśne fosfolipidy (fosfatydyloseryna, fosfatydyloinozytol i fosfatydyloglicerol) jako ak-

ceptory ładunku. Wydaje się, że podstawową rolę pełni tu fosfatydyloseryna (PS), obecna w listku wewnętrznym błony, która w pewnych okolicznościach przemieszcza się do listka zewnętrznego (symetryzacja błony). PS ma wysokie powinowactwo do białek, może więc zlokalizować HSC73 z ładunkiem na powierzchni LE. Kolejnym etapem jest tworzenie cewy autofagicznej, a następnie uformowanie ciała autofagicznego z udziałem kompleksu białek ESCRT 1 i 3 (ang. endosomal sorting complex required for transport 1, 3).

U drożdży *S. cerevisiae* zaobserwowano szczególny rodzaj mikroautofagii. Polega ona na oddzieleniu części jądra komórkowego w procesie wymagającym przejściowego połączenia z wakuolą. Tak zwana mikroautofagia fragmentaryczna (ang. piecemeal microautophagy) rozpoczyna się, analogicznie do tradycyjnej MiA, od wpuklenia błony wakuoli i uformowania się cewy autofagicznej, do której wpada fragment jądra wraz z błoną jądrową otaczającą część macierzy jądrowej. Do fuzji potrzebne są białka błony jądrowej (ang. nucleus vacuole junction 1 protein, NVJ1P) i białko w błonie wakuoli (ang. vacuolar 8 protein, Vac8P). Po zespoleniu wymienionych białek dochodzi do wpuklenia, a po dalszym pogłębieniu na końcu cewy tworzy się ciało autofagiczne. Odłączenie ciała autofagicznego oznacza zakończenie procesu

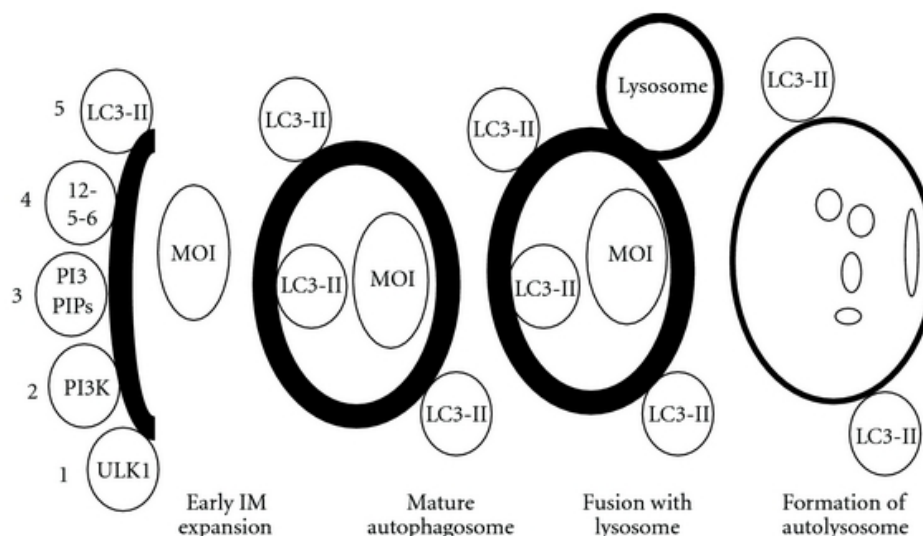
autofagii fragmentarycznej. Niejasne są zarówno znaczenie, jak i regulacja tej szczególnej formy MiA. Wiadomo jedynie, że nasila się ona w czasie głodzenia komórki lub po doświadczalnym zahamowaniu przez rapamycynę aktywności mTORC1 (sensor aminokwasów). Dodatkowo, fragmentaryczna MiA angażuje białka odpowiedzialne za przemiany lipidów (ang. temperature-sensitive suppressors of Csg2 mutants, TSC13; oxysterol-binding protein, OSH1) oraz niektóre białka charakterystyczne dla makroautofagii [ATG1, ATG3, ATG7, ATG12, ATG16 i VPS30 (ang. vacuolar protein sorting 30)]. Niewykluczone, że z uwagi na skąpy obecnie zasób informacji opisujących molekularny mechanizm MiA fragmentarycznej, w przyszłości poznamy również szczegóły tego przyciągającego uwagę zjawiska. Regulacja MiA jest jakościowo różna od CMA i MaA. Kluczową rolę w aktywności MiA ogrywa mTORC1 (ang. mammalian target of rapamycin complex 1, mechanistic target of rapamycin complex 1) składający się z kinazy mTOR, wrażliwego na rapamycynę białka RPTOR (ang. regulatory-associated protein of mTOR), białka MLST8 (ang. mammalian lethal with SEC13 protein 8) i białka PRAS40 (ang. proline-rich AKT1 substrate 1). W przeciwieństwie do CMA i MaA, mTORC1 jest pozytywnym regulatorem MiA dzięki swojej relacji z kompleksem białek EGO (ang. GTPase-containing complex for Gap1p sorting in the endosome). EGO u drożdży zawiera białka GTR1, GTR2, MEH1 i SLM4, zaś w królestwie zwierząt są to GTR1, GTR2, EGO1 i EGO2. mTORC1 i EGO łączą się z białkiem VAM6 (ang. hVam6p/Vps39-like protein) obecnym w błonie LE i odpowiadają za wpuklanie błony i odłączanie ciał autofagicznych. VAM6 pełni funkcję czynnika aktywującego (ang. guanine nucleotide exchange factor, GEF), wymieniającego GDP na GTP w GTR1 zespolonym z EGO. Teraz aktywne GTR1/EGO pobudza aktywność mTORC1, MiA i syntezę białka.

Z pozoru skomplikowany proces łączenia się wakuol autofagicznych (MaA) z wodniczkami i wypełniania się wodniczek pęcherzykami (MiA) prawdopodobnie zachodzą sekwencyjnie (wielkość wodniczki rośnie pod wpływem materiału i błon wakuol autofagicznych przyjętych podczas MaA, ale maleje w wyniku utraty błon i ich degradacji zachodzących podczas MiA). Rzeczywiście, aktywność MiA rośnie pod wpływem mTORC1. Funkcję, jaką pełni MiA w komórce, można porównać do automatycznego odkurzacza (robota sprzątającego) aktywnego w warunkach sprzyjających wzrostowi i aktywności fizjologicznej komórki. Poprzez recykling aminokwasów i innych prostych związków

uwolnionych dzięki degradacji materiału dostarczonego lizosomom, MiA zasila procesy syntezy. Rzecz się ma zupełnie inaczej w przypadku MaA i CMA.

### MAKROAUTOFAGIA, PRAWIE DOSKONAŁY SYSTEM UPRZĄTAJĄCY KOMÓRKI

Jak już wspomniano, aktywność MaA rośnie głównie w warunkach, kiedy w komórce brakuje aminokwasów lub niebezpiecznie kurczą się zapasy ATP (główny magazyn energii). Taka sytuacja zdarza się okresowo w warunkach fizjologicznych (wysiłek, różnicowanie się komórek), ale ma miejsce także w chorobie (stres oksydacyjny, stres siateczki śródplazmatycznej). Aktywność MaA i CMA, które uzupełniają się w działaniu i funkcjonują sekwencyjnie, wzrasta, gdy maleje aktywność mTORC1. W warunkach fizjologicznych utrata aktywności mTORC1 jest następstwem zmniejszenia dostępności aminokwasów niezbędnych dla ssaków, w tym szczególnie grupy aminokwasów rozgałęzionych (leucyna, izoleucyna, walina, BCAA – ang. branched chain amino acids). Aktywność mTORC1 ulega również zahamowaniu pod wpływem fosforylacji zależnej od AMPK (ang. AMP-dependent kinase). Aktywność AMPK jest z kolei pobudzana przez AMP (adenozynomonofosforan), którego przybywa w komórce narażonej na deficyt źródeł energii potrzebnych do syntezy ATP. W porównaniu z MiA i CMA, makroautofagia jest procesem złożonym, składającym się z trzech etapów: (1) formowania autofagosomu z fazami indukcji, nukleacji i elongacji, (2) fuzji autofagosomu z lizosomem (dojrzewanie) i wreszcie (3) degradacji materiału w lizosomie (Ryc. 3). W pełni uformowany autofagosom może także fuzjować z endosomem, dając formę przejściową zwaną amfisosmem i to ten ostatni fuzjuje później z lizosomem. mTORC1 pretenduje zatem do roli centralnego regulatora autofagii. Indukcja MaA zależy od mTORC1. Jako aktywna kinaza serynowo-treoninowa, oddziałuje ona na wiele elementów docelowych, m. in. hamuje aktywność ATG13 (ang. autophagy related gene 13), białka niezbędnego do zainicjowania MaA. Fosforylacja zależna od mTORC1 uniemożliwia białku ATG13 utworzenie kompleksu z FIP200-ULK1-ATG101, potrzebnego do zespolenia z błoną ER, i rekrutacji pozostałych białek i kinaz odpowiedzialnych w fazie indukcji za utworzenie fagoforu (błona izolująca). Pochodzenie fagoforu, jako struktury o podwójnej błonie i formie przypominającej misę, nie jest w pełni poznane. Większość obserwacji wskazuje jako źródło ER, lecz w miarę powiększania się fagoforu,



Ryc. 3. Makroautofagia.

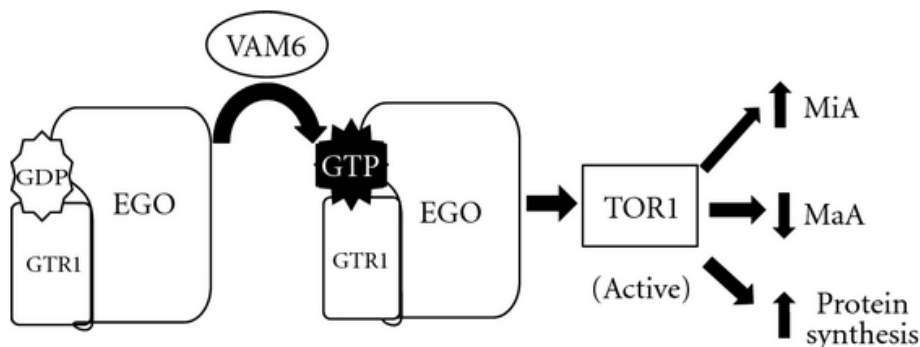
Rekrutacja dużego kompleksu ULK1 w kierunku omegasomu (1) powoduje migrację do tego miejsca PI3K klasy III (2). Białko współdziałające z PI3K (PI(3)PIP) (3) pomaga we właściwej lokalizacji ATG12-ATG5-ATG16L (4) i LC3-II (5) w błonie fagoforu. W pełni dojrzały autofagosom otacza MOI (ang. material of interest), fuzjuje w lizosomem w którego wnętrzu odpowiednie hydrolazy trawią MOI. MOI:material of interest; 12-5-6: ATG12-ATG5-ATG16L; PI3P1P: phosphatidylinositol triphosphate interacting protein; PSE: phospholipid synthesizing enzyme; LC3: microtubule-associated light chain 3; PI3K: phosphoinositide 3 kinase; ULK1: unc-51-like kinase 1; ER: endoplasmic reticulum; IM: isolation membrane. LEANNE PEREIRA, JOHN PAUL GIRARDI, AND MARICA BAKOVIC, "Forms, Crosstalks, and the Role of Phospholipid Biosynthesis in Autophagy," *International Journal of Cell Biology*, vol. 2012, Article ID 931956, 10 pages, 2012. doi:10.1155/2012/931956.

większego znaczenia nabiera synteza fosfolipidów, jako składników tworzących dwuwarstwę błon. Jak łatwo się domyślić, w warunkach prawidłowych w komórce nie ma zbyt wiele do sprzątania i MiA w zupełności sobie z tym radzi. Sytuacja ulega radykalnej zmianie, gdy komórki są narażone na działanie czynników uszkodzających (infekcja, promieniowanie jonizujące) lub gdy nagle zostaną pozbawione składników odżywczych, w tym źródeł energii (niedokrwienie). W krótkim czasie w komórce gromadzą się uszkodzone składniki, aktywność mTORC1 ulega zahamowaniu, przewagę uzyskują fosfatazy, a ATG13 po defosforylacji tworzy kompleks z FIP200 (ang. focal adhesion kinase interacting protein of 200 kD), ULK1 (ang. unc-51-like kinase 1) i ATG101 (ang. autophagy related gene 101), wbudowując się w błonę kanalikula siateczki. Obecność ATG13-FIP200-ULK1-ATG101 „zwabia” kolejny kompleks białkowy zbudowany u ssaków z Bekliny 1 (ang. Bax interacting protein 1), ATG14(L)/barkor (ang. autophagy related gene 14), VPS15 (ang. vacuolar protein sorting 15), VPS34 (ang. vacuolar protein sorting 34) i AMBRA1 (ang. activating molecule in Beclin1-regulated autophagy 1). Kompleks zawiera 3-kinazę fosfatidyloinozytoli klasy III

(VPS34), która po aktywacji przez ULK1 przekształca fosfatidyloinozytol błony fagoforu w 3-fosforan fosfatidyloinozytoli (PI(3)P). Obecność PI(3)P działa jak przynęta i pozwala przyłączyć się do błony fagoforu białkom WIPI2 (ang. WD-repeat protein interacting with phosphoinositide-2) i DFCP1 (ang. double FYVE-containing protein), które za pośrednictwem kompleksu ATG5-ATG12-ATG16L (ang. autophagy related genes 5, 12, 16L) pomagają w lipidacji MAP LC3-I (ang. microtubule-associated protein light chain 3) w MAP LC3-II (faza nukleacji). Lipidacja MAP LC3-I polega przede wszystkim na koniugacji z fosfatydyletanolaminą (LC3-II). Dzięki opisanemu szeregowi kolejnych reakcji powstaje tzw. omegasom, czyli błona izolująca, która zaczyna przypominać otwarty pęcherzyk, a na przekroju przybiera kształt greckiej litery omega ( $\Omega$ ). W procesie tworzenia załączka autofagosomu szczególna rola przypada Beklinie 1. Beklina 1, w warunkach niewymagających intensywnego uprzątnięcia komórki, tworzy kompleks z antyapoptotycznym białkiem BCL-2 zakotwiczonym w błonie ER. W warunkach oddziaływania na komórki promieniowania UV, szoków termicznego lub osmotycznego, aktywacji ulega kinaza JNK1 (ang. c-jun N-terminal

kinase 1), która fosforyluje BCL-2. Fosforylacja BCL-2 uwalnia Beklinę 1 z kompleksu i pozwala na uformowanie omegasomu, a w tym samym czasie BCL-2 blokuje programowaną śmierć komórki (apoptoza). Ten mechanizm tłumaczy wzajemne wykluczanie się apoptozy i makroautofagii. MaA ma zatem działanie cytoprotekcyjne, podczas gdy apoptoza powoduje śmierć komórki. Istnieje jeszcze jeden ważny mechanizm regulacyjny, który tłumaczy, dlaczego ochronne działanie MaA prowadzi niekiedy do nieuchronnej śmierci komórki (programowana śmierć typu 2). W warunkach szkodliwych dla komórki w pierwszej kolejności uaktywnia się MaA (pierwsze godziny), przy czym ma ona wtedy charakter nieselektywny. Jeśli stres przedłuża się, aktywacji ulega CMA, a znaczenie MaA stopniowo ulega zmniejszeniu. Ten zabieg umożliwia komórce usunięcie wyłącznie dysfunkcyjnych białek, oszczędzając prawidłowe. Taka kolejność uprzątnięcia skutków bałaganu wywołanego przez stres komórkowy zawodzi w przypadkach poważnych i rozległych uszkodzeń. Rozmiar MaA w tym przypadku narasta w stopniu doprowadzającym komórki do śmierci z powodu eliminacji ważnych dla życia białek i organelli komórkowych. Aby zminimalizować ryzyko „wylania dziecka z kąpielą” w różnych formach autofagii utrwały się ewolucyjnie mechanizmy molekularne selektywnego usuwania uszkodzonych składników komórki (Ryc. 4). W przypadku MaA jest to możliwe dzięki białkom pozwalającym na cumowanie w błonie fagoforu elementów komórkowych, rozpoznanych jako uszkodzone (MaA selektywna). W królestwie zwierząt do zakotwiczonego w błonie izolującej, dzięki lipidacji, białka

LC3-II, przyłącza się białko p62 (homolog białka ATG8 u drożdży), znane również pod nazwą sekwestosomu 1/SQSTM1 (ang. sequestosome). Białko p62 jest wszechobecne (bierze udział w ścieżkach przekazywania sygnałów), ale posiada również właściwość, która pozwala mu „wyławić” z wnętrza komórki wszystkie składniki przeznaczone do utylizacji i recyklingu. Dzieje się tak dzięki obecności w cząsteczce p62 domeny ubikwitynowej (ang. ubiquitin-associated domain, UBA), która rozpoznaje białko ubikwitynowe, wykorzystywane z kolei na drodze ligacji (ligazy ubikwitynowe) do „naznaczenia” komórkowych nieczystości. Ze względu na obfitość uważa się, że p62 jest głównym receptorem MaA, służącym do eliminacji ubikwitynowanego materiału, takiego jak agregaty białkowe, uszkodzone mitochondria (mitofagia), peroksyosomy (peksyfagia) lub siateczka śródplazmatyczna szorstka (retikulofagia), niesprawne pierścienie skurczowe, drobnoustroje (ksenofagia). Inne białka o podobnej do p62 funkcji to: NDP52 (ang. nuclear dot protein 52 kDa) i optyneuryna (OPTN), służące ksenofagii. Głównym zadaniem receptorów MaA, takich jak p62, NDP52 czy OPTN, jest więc „kontrola jakości” składników komórki i wybiórcze eliminowanie wszystkiego, co zostało uznane za zbędne lub szkodliwe. W przypadkach upośledzenia MaA w chorobach takich jak: choroba Alzheimera, Parkinsona, stwardnienie zanikowe boczne (ALS), alkoholowe zapalenie lub stłuszczenie wątroby, a także w raku wątroby (ang. hepatocellular carcinoma) i mózgu (glejak wielopostaciowy), w obrazie ultrastruktury chorych komórek dostrzec można obecność ciał wtretowych (ang. inclusion bodies, IB). Do-



Ryc. 4. Regulacja autofagii.

Aktywacja kinazy mTOR1 w mikroautofagii. Vam6 aktywuje Gtr1 w kompleksie EGO prowadząc tą drogą do aktywacji mTOR1. Przez aktywację mTORC1 dochodzi do nasilenia mikroautofagii, wzrasta natężenie syntezy białek a komórka powraca do fazy wzrostu. Przeciwnie, MaA i CMA nasilają się w warunkach niedoboru składników odżywczych. LEANNE PEREIRA, JOHN PAUL GIRARDI, AND MARICA BAKOVIC, “Forms, Crosstalks, and the Role of Phospholipid Biosynthesis in Autophagy,” *International Journal of Cell Biology*, vol. 2012, Article ID 931956, 10 pages, 2012. doi:10.1155/2012/931956.



kładniejsza analiza składu tych ciał wykazała, że są zbudowane z agregatów p62 i ubikwityny, co sugeruje, że w normalnych komórkach sprzątanie (autofagia) zachodzi ciągle (konstytutywnie) i ma charakter selektywny. Doświadczalny nokaut genu *ATG7* (jeden z genów inicjujących MaA) powoduje, że w komórkach pojawiają się ciała wtrętowe, natomiast pozbawienie komórek genu *p62* powoduje zaniknięcie IB (INAMI i współaut. 2011, KOMATSU i współaut. 2007). Jak widać, zbudowanie inteligentnej „szufelki” do sprzątania jest dla komórki zadaniem złożonym i nie pozbawionym ryzyka utworzenia narzędzia niesprawnego lub tylko częściowo sprawnego. Poznanie autofagii, jej form i aktywności w zależności od typu komórki, stanu czynnościowego tkanki, zarówno w zdrowiu, jak i chorobie, pozwoliło opisać rolę autofagii w patogenezie wielu chorób. Niniejsze opracowanie nie pozwala na obszerne i szczegółowe ich scharakteryzowanie, autor ograniczy się zatem do kilku spektakularnych przykładów wykazujących fundamentalną rolę sprzątania i recyklingu w zapobieganiu niektórym chorobom.

#### PRZYKŁADY CHORÓB LUDZI I ZWIERZĄT, W KTÓRYCH ZNACZĄCA ROLA ODGRYWA UPOŚLEDZENIE AUTOFAGII

Wspólną cechą chorób przebiegających z utratą autofagii jest gromadzenie się uszkodzonych organelli i dysfunkcyjnych białek, które stanowią bezużyteczny materiał hamujący prawidłowe działanie komórek. Często w transmisyjnym mikroskopie elektronowym dostrzec można w komórkach jednocześnie kilka różnych struktur typowych dla hamowania autofagii, takich jak ciała wielopęcherzykowe (MVB), ciała wtrętowe (IB) czy wakuole autofagiczne (AV). Obecność trzech wymienionych jednocześnie wskazuje na zahamowanie co najmniej jednego z ostatnich etapów autofagii czyli fuzji i/lub degradacji. Jeśli w komórce gromadzi się tylko jedna ze struktur, np. MVB, upośledzona jest MiA, jeśli IB, to CMA, natomiast liczne AV sugerują zahamowanie MaA.

Wśród chorób neurodegeneracyjnych największą uwagę skupiają PD i AD. Wnikliwe badania wykonane w ostatnich latach pozwoliły sformułować przyczynę choroby Parkinsona, wskazując na utratę zdolności do mitofagii w chorych neuronach. Molekularny mechanizm mitofagii wymaga współpracy pomiędzy mitochondrialną serynowo-treoninową kinazą PINK1 (ang. PTEN-induced putative kinase 1) i parkina, ligazą ubikwitynową E3. Prawidłowe mitochondria wciąż importują PINK1 z cytozolu i degradują częściowo w

macierzy. Resztki PINK1 są eksportowane do dalszej degradacji w proteasomie. Kiedy mitochondrium jest uszkodzone, traci potencjał błonowy niezbędny do prawidłowej wymiany składników. PINK1 w takiej sytuacji więźnie w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (ang. outer mitochondrial membrane, OMM), ulega stabilizacji i zaczyna fosforylować dostępne białka. Parkina jako ligaza, przyłącza ubikwitynę do różnych białek zakotwiczonych w OMM, oznaczając w ten sposób organelę jako bezużyteczną/szkodliwą, przeznaczoną do eliminacji i recyklingu. PINK1 dodatkowo fosforyluje ubikwitynę, aktywuje parkinę i zapewnia silny sygnał dla fagoforu, by otoczył mitochondrium. Z niepoznanych do końca powodów, w sporadycznej formie PD opisany mechanizm sprężenia zwrotnego dodatniego nie zostaje uruchomiony, uszkodzone mitochondria zaczynają się gromadzić, generują wolne rodniki tlenowe, które powodują postępujące zwyrodnienie, aż w końcu śmierć neuronów (PICKRELL i YOULE 2015).

Niejasna jest etiologia sporadycznej formy AD, chociaż i tutaj wiele wskazuje na znaczący udział nieskutecznej autofagii. Neuron dotknięty zmianami zwyrodnieniowymi gromadzi znaczne ilości AV, co sugeruje upośledzenie MaA. Skupiska AV gromadzą się głównie w wypustkach neuronów, co utrudnia lub wręcz uniemożliwia prawidłowy transport pęcherzyków do zakończeń nerwowych i z powrotem. W AD, podobnie jak w PD, mitochondria generują wolne rodniki tlenowe, pogłębiając uszkodzenia, i prowadząc do śmierci neuronów przez apoptozę. W zdrowych neuronach liczba autofagosomów nie zmienia się nawet w warunkach głodzenia, chociaż w niektórych rejonach mózgu (kora mózgowa, podwzgórze) można dostrzec wówczas indukcję tzw. lipofagii (autofagia ziarnistości lipidowych). Trzeba podkreślić, że zadania „sprzątaczk” w neuronach, jako komórkach permanentnych, są szczególne, albowiem sprzątanie komórek nieposiadających zdolności regeneracji wymaga od autofagii ciągłego i kompletnego usuwania „nieczystości”. W przeciwnym razie szybko dojdzie do ustania prawidłowych czynności komórek nerwowych z powodu zahamowania się mechanizmów komunikacji międzykomórkowej (zwyrodnienie i postępująca atrofia zakończeń nerwowych). Z wiekiem, nawet u zdrowych osobników można zauważyć zmniejszenie aktywności „ekipy sprzątajacej”, co przekłada się na obecność ciał wtrętowych i nieskonsumowanych AV. W warunkach upośledzonej autofagii szczególnie dobrze widoczne są konsekwencje obecności nieprawidłowo uformowanych białek. W PD jest to  $\alpha$ -synukleina, w AD spletki neurofibryllarne (tauopatia – hiperfosforyla-

cja unieczynnijająca białko tau stabilizujące mikrotubule), a w chorobie Huntigtona (HD) białka zawierające poliglutaminę (ang. polyQ-containing proteins). Nie mogą one zostać zutyilizowane, albowiem nie poddają się rozwinięciu koniecznemu do wprowadzenia ich do proteasomu. Alternatywą jest autofagia, lecz tylko wówczas, jeśli ulegnie ona nasileniu, co w chorych neuronach nie ma miejsca. Farmakologiczne pobudzanie autofagii mogłoby zatem spowolnić postęp takich chorób neurodegeneracyjnych jak PD, AD czy HD.

Narzędem szczególnie wrażliwym na niedostatek autofagii i związane z tym „zaśmieszenie” komórek mięszu i wynikająca stąd niewydolność jest wątroba. Obraz hepatocytów w stanach zapalnych lub we wrodzonym niedoborze  $\alpha_1$ -antytrypsyny (białko hamujące aktywność proteaz wydzielanych przez neutrofile w reakcjach zapalnych) jest zmieniony w kierunku gromadzenia uszkodzonych organelli i agregatów białek (IB). Wątroba ulega powiększeniu (hepatomegalia), a mięsz wykazuje cechy zapalenia (ang. hepatitis), które stopniowo prowadzi do zwłóknienia narządu (ang. fibrosis). Podejrzewa się, że upośledzenie autofagii prowadzi do nagromadzenia w hepatocytach receptora autofagii p62, a spowolniony turnover tego białka powoduje stałą aktywację NRF2, czynnika transkrypcyjnego podwyższającego aktywność genu *P62* (błędne koło). W mysim modelu autofagii, upośledzonej z powodu utraty genu *ATG7*, uszkodzeniu hepatocytów zapobiegło równoczesne zablokowanie aktywności genów *P62* i *NRF2*. Ciekawe, że karbamazepina, farmakologiczny aktywator autofagii, hamowała zwłóknienie wątroby u myszy z niedoborem  $\alpha_1$ -antytrypsyny (HIDVEGI i współaut. 2010).

Serce, narząd podtrzymujący podstawowe funkcje życiowe organizmu, może również stać się ofiarą niedbałego „sprzątnia”. Po urodzeniu, u myszy z wrodzonym brakiem autofagii konstytutywnej stopniowo i nieuchronnie dochodziło do kardiomiopatii i śmierci zwierząt po osiągnięciu wieku około 6 miesięcy. W kardiomiocytach serc z aktywnością genu *ATG5*, hamowaną pod wpływem tamoksifenu (antagonista receptora estrogenowego, lek przeciwnowotworowy), gromadziły się uszkodzone mitochondria i ubikwitynowane białka, prowadząc z czasem do nieuporządkowania sarkomerów i zmniejszenia kurczliwości włókien mięśniowych (NAKAI i współaut. 2007). Rola autofagii w sercu nie jest zupełnie jasna. Istnieją doniesienia o jej znaczącym udziale w adaptacji do obciążenia serca (u myszy z nokautem genu *ATG5* nie zauważono adaptacji serca do wzmożonego wysiłku, rozwijała się u

nich niewydolność serca typu kardiomiopatii rozstrzeniowej), ale z kolei częściowe zmniejszenie ekspresji genu *BECN1* również hamujące autofagię poprawiało funkcję serca poddanego obciążeniu. Wydaje się, że zupełne zahamowanie autofagii jest szkodliwe, zaś częściowe jest korzystne dla adaptacji serca do wysiłku.

W mięśniach szkieletowych myszy narażonych na upośledzenie autofagii (nokaut *ATG5*) obraz mikroskopowy włókien mięśniowych jest podobny do kardiomiocytów. Sprzątnanie komórek mięśniowych odgrywa więc ważną funkcję w zachowaniu ich homeostazy. Obecność we włóknach mięśniowych struktur świadczących o niedostatecznym „uprzątniu nieczystości” (MVB, IB, AV) często obserwowano w chorobach nerwowo-mięśniowych jakich jak: choroba Danona, miopatia miotubularna sprzężona z chromosomem X i nadmierną autofagią, (ang. X-linked myopathy with excess autophagy, XMEA), czy chorobach lizosomalnych. W etiologii choroby Danona rozpoznano mutację z utratą funkcji w sekwencji kodującej genu *LAMP2*, co jak się łatwo domyślić powoduje dysfunkcję lizosomów i uniemożliwia fuzję autofagosomów z lizosomami. Z kolei w chorobie Pompego, lizosomy kardiomiocytów i włókien mięśniowych spichrzają glikogen, którego nie są w stanie skutecznie trawić z powodu niedoboru alfa-glikozydazy. Należy pamiętać, że dostarczanie glikogenu lizosomom jest zadaniem autofagii, można więc przypuszczać, że w chorobie Pompego hamowanie autofagii mogłoby pomóc w leczeniu objawowym.

Wśród chorób autoimmunizacyjnych na pierwsze miejsce pod względem dokuczliwości i pogorszenia komfortu życia wysuwają się choroby przewodu pokarmowego. W chorobie Leśniewskiego-Crohna, której towarzyszy wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG) stwierdzono zamianę jednego nukleotydu w genie *ATG16L1*, skutkiem czego w odpowiednim białku ATG16L treonina w pozycji 300 zostaje zamieniona na alaninę (T300A). Ta niewielka zmiana (ang. single-nucleotide polymorphism, SNP) prowadzi do upośledzenia ksenofagii, a konkretnie wewnątrzkomórkowej sekwestracji bakterii patogennych, w celu ich eliminacji w lizosomach. Ważną rolę pełnią tu komórki Panetha, zlokalizowane w kryptach jelitowych, które biorą udział w reakcjach obronnych jelit. W ich ziarnistościach kwasochłonnych znajdują się: lizozym, immunoglobuliny IgA, TNF- $\alpha$  i defensyny. Komórki Panetha uczestniczą w fagocytozie drobnoustrojów, ale u pacjentów homozygotycznych z genem *ATG16L1* (T300A) komórki Panetha mają zaburzoną morfologię, w szczególności w od-

niesieniu do lizosomów i ziarnistości kwasochłonnych, przez co ksenofagia jest upośledzona (CADWELL i współaut. 2008). Jak widać, sprzątanie dotyczy również „zanieczyszczeń biologicznych”, potencjalnie groźnych czynników mogących naruszyć jelitową barierę odporności nieswoistej.

Wewnątrzwydzielnicza aktywność trzustki jest w dużym stopniu uzależniona od autofagii, albowiem zahamowanie tej ostatniej powoduje gromadzenie się IB i zdeformowanych organelli, co przekłada się na dysfunkcję komórek beta wysepek Langerhansa i zmniejszenie wydzielania insuliny. Z kolei czynność zewnątrzwydzielnicza nie wymaga autofagii, tak jakby produkcja soku trzustkowego związana była z różnym w natężeniu eliminowaniem „nieczystości” na drodze egzokrynii. Potwierdzają to badania na myszach z nokautem *ATG5*, u których czynność tego narządu w zakresie kontroli trawienia pozostawała nienaruszona. Równocześnie, myszy *ATG5*<sup>-/-</sup> były odporne na indukcję zapalenia trzustki z użyciem ceruleiny (analog cholecystokininy, CCK), co oznacza, że autofagia jest niezbędna do nieprawidłowej aktywacji trypsyny w komórkach pęcherzyków zanim zostanie ona wydzielona w nieczynnej postaci, jako trypsynogen. Hipotetycznie, aktywacja trypsyny może zajść w lizosomach pod wpływem katepsyny B, ale trypsyna może być również całkowicie unieczynniona (zdegradowana) przez katepsynę L. Wydaje się zatem, że w zapaleniach trzustki mamy do czynienia z przewagą aktywności katepsyny B nad L, co oznacza, że modulacja autofagii w odpowiednim kierunku może stanowić dodatkowy oręż w leczeniu śmiertelnej choroby - krwotoczno-martwiczego zapalenia trzustki.

W nerkach najistotniejszą rolę w filtracji kłębkowej odgrywają podocyty stanowiące aktywną barierę filtracyjną. Aktywność autofagiczna w tych komórkach determinuje ich funkcję, albowiem nokaut *ATG5* prowadzi do glomerulosklerozy i utraty zdolności kłębków nerkowych do filtrowania osocza krwi. Podobnie jak podocyty, wrażliwe na niedostatek autofagii są komórki nabłonka kanalików krętych bliższych, o których wiadomo, że należą do najaktywniejszych metabolicznie komórek zaangażowanych w resorpcję i wydzielanie. Ta wysoka aktywność manifestuje się m. in. dużą liczbą mitochondriów i wrażliwością na niedotlenienie. Doświadczalne zablokowanie autofagii prowadzi u myszy *ATG5*<sup>-/-</sup> do podwyższenia wrażliwości tych komórek na skutki doświadczalnego niedokrwienia/reperfuzji. Wszystko to oznacza, że stałe i nasilone w okresach zagrożenia stresem niedokrwinnym oczyszczanie podocytów i nabłonka kanalików bliższych krętych

nefronu z nieprawidłowych składników warunkuje prawidłową homeostazę nerek.

O znaczeniu autofagii dla prawidłowej funkcji płuc, jako narządu oddechowego, najlepiej świadczą obserwacje zebrane od chorych na mukowiscydozę (zwłóknienie torbielowate). Mukowiscydoza, jako choroba genetyczna, polega na utracie jednego nukleotydu w sekwencji genu kodującego transbłonowy regulator przewodności (*CTFR*) kanału chlorkowego, z następczą delecją aminokwasu w odpowiednim białku ( $\Delta F508$ -*CTFR*). Skutkiem tego, produkt genu nie uzyskuje fizjologicznej aktywności, agreguje i jest przedwcześnie degradowany. Aktywność kanału chlorkowego odpowiada za prawidłową aktywność wydzielniczą w płucach i trzustce zewnątrzwydzielniczej. W mukowiscydozie w komórkach gruczołowych płuc i trzustki autofagia jest upośledzona, a przyczyną takiego stanu jest ubytek Bekliny 1 tworzącej bezużyteczne wewnątrzkomórkowe agregaty. Przywrócenie aktywnej Bekliny 1 do prawidłowego poziomu znosi objawy zwłóknienia torbielowatego, przynajmniej w mysim modelu choroby. Jeszcze raz okazuje się, że „dobra sprzątaczką” może zapewnić zdrowie, jeśli z uwagą i konsekwencją zajmie się oczyszczaniem komórek ze „śmieci”.

Nie ma chyba tkanki i narządu, w którym autofagia nie odgrywałaby jakiejś roli. W chorobie Pageta kości stwierdzono mutację białka p62, najczęściej w domenie UBA, co powoduje indukcję toru sygnałowego TRAF6-NF- $\kappa$ B i nasiloną osteoklastogenezę. Choroba Pageta kości powoduje w pierwszym rzędzie nieprawidłowy proces kościotwórczy (zwiększony turnover kości), niekiedy towarzyszyć jej jednak może miopatia wtęretowa połączona z demencjączołowo-skroniową (ang. inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia, IBMPFD). W tej rzadkiej chorobie, we włóknach mięśniowych obserwuje się obecność obrzeżonych wakuoli i cytoplazmatycznych wtęretów. Przyczyną choroby jest mutacja białka VCP/p97 (ang. valosin-containing protein/p97), odpowiedzialnego za dojrzewanie autofagosomów, co oznaczać może, że obrzeżone wakuole są niczym innym, jak tylko niedojrzałymi AV, a cytoplazmatyczne wtęrety to IB.

O roli autofagii w nowotworzeniu, jak też ewentualnych korzyściach wynikających z modulacji tego procesu w zależności od typu i stopnia zaawansowania guza znaleźć można coraz większą liczbę doniesień (CHOI 2012, KANIA i współaut. 2015). Wydaje się, że w odniesieniu do nowotworów, autofagia ma dwoistą naturę. Z jednej strony chroni przed guzami, z drugiej, chroni istniejące guzy przed eliminacją. Ochronne działanie

autofagii najlepiej opisano w hepatocytach, które po delecji *ATG5* i/lub *ATG7* ulegały spontanicznej transformacji nowotworowej u myszy. Taki scenariusz wydaje się oczywisty, skoro autofagia usuwa z komórek uszkodzone białka i organelle, przy czym mitofagia ma tu znaczenie fundamentalne, gdyż zapobiega stresowi oksydacyjnemu, który odpowiada za kumulowanie się uszkodzeń genomu, w tym, mutacji powodujących przyrost aktywności onkogenów, a utratę aktywności genów supresji nowotworowej. Podobnie u heterozygotycznych myszy ze zredukowaną ilością Bekliny 1 i w konsekwencji obniżoną aktywnością autofagiczną rozwijały się spontanicznie guzy m. in. rak wątroby. Hepatocyty myszy z *BECN1*<sup>-/+</sup> częściej ulegały ponadto transformacji nowotworowej pod wpływem wirusów onkogennych (wirus zakaźnego zapalenia wątroby typu B). Wiadomo powszechnie, że komórki nowotworowe mają wysokie potrzeby metaboliczne na źródła energii i składniki budulcowe. Przez ciągle podziały komórkowe i występowanie w guzach stref intensywnego wzrostu są one narażone na niedokrwienie (hipoksja). W tych warunkach przeżycie komórek nowotworowych niemal zupełnie zależy od „personelu sprzątaczego”, który zapewni i pokryje zwiększone zapotrzebowanie na składniki odżywcze. W ocenie znaczenia autofagii dla nowotworzenia należy jednak uwzględnić natężenie autofagii. Normalna, konstytutywna autofagia wspomaga nowotwory, albowiem zastosowanie jej farmakologicznych inhibitorów, np. chlorochiny lub hydroksychlorochiny, hamuje wzrost guzów. Nadmierna aktywność autofagiczna może być jednak dla guzów równie zabójcza jak jej hamowanie, indukując śmierć programowaną typu 2 (KIMURA i współaut. 2013). Przeciwnowotworowe działanie chlorochiny i hydroksychlorochiny (alkalizujące czynniki lizosomotropowe) upodabnia je do przeciwnowotworowego działania bortezomibu, swoistego inhibitora proteasomu, użytecznego w leczeniu szpiczaka (SANCHEZ-SERRANO 2006).

#### PODZIĘKOWANIA

Autor niniejszego opracowania pragnie gorąco podziękować swoim wieloletnim współpracownikom dr hab. Beacie Pająk z Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii im. Generała Karola Kaczkowskiego i dr Elżbiecie Kani przebywającej obecnie na stypendium podoktorskim na Uniwersytecie Katolickim w Leuven, Belgia za ich pełne pasji zaangażowanie w badania nad autofagią i codzienne ożywianie tematu podsuwaniem oryginalnych projektów naukowych. Pani prof. dr hab. Krystynie Skwarło-Soncie z Redakcji „Kosmosu” dziękuję natomiast za

piękne w słowach stymulowanie do napisania artykułu.

#### Streszczenie

Autofagia jest procesem fizjologicznym zachodzącym u eukariontów (rośliny, grzyby i zwierzęta), polegającym na degradacji różnych składników komórki rozpoznanych jako uszkodzone lub zbędne. W zasadzie, każdy proces prowadzący do przekazania materiału komórkowego lizosomom należy uważać za autofagię. W zjawisku kontrolowanej autodestrukcji lizosomy pełnią rolę komórkowego „zakładu oczyszczania i utylizacji odpadów”. W pewnym uproszczeniu można uznać, że autofagia jest dla komórki „sprzątaczką” z umiejętnością recyklingu. Pomimo że o autofagii wiedziano już w latach 60. ubiegłego wieku, rodzaje autofagii (mikro-, makro- i autofagia zależna od białek opiekuńczych) oraz przebieg i mechanizmy sprawcze zostały poznane i szczegółowo opisane dopiero po wprowadzeniu nowych technik biologii molekularnej w czym szczególnie zasłużył się Yoshinori Ohsumi, uhonorowany w roku 2016 Nagrodą Nobla z Fizjologii lub Medycyny. Obecnie wiadomo, że autofagia nadzoruje ważne fizjologiczne funkcje, ale nabiera szczególnego znaczenia w warunkach stresu komórkowego, kiedy dochodzi do uszkodzenia komórki. Taka sytuacja ma miejsce w stanach chorobowych, przy czym wiele obserwacji zebranych od chorych i dane doświadczalne wskazują nieprawidłowo działającą autofagię jako przyczynę choroby.

#### LITERATURA

- ASHFORD T. P., PORTER K. R., 1962. *Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes*. Brief Notes 1, 198-202.
- BABA M., TAKESHIGE K., BABA N., OHSUMI Y., 1994. Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J. Cell Biol.* 124, 903-313.
- BANDYOPADHYAY U., KAUSHIK S., VARTICOWSKI L., CUERVO A. M., 2008. *The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane*. *Mol. Cell. Biol.* 28, 5747-5763.
- CADWELL K., LIU J. Y., BROWN S. L., MIYOSHI H., LOH J., LENNERZ J. K., KISHI C., KC W., CARRERO J. A., HUNT S., STONE C. D., BRUNT E. M., XAVIER R. J., SLECKMAN B. P., LI E., MIZUSHIMA N., STAPPENBECK T. S., VIRGIN H. W. 4TH, 2008. *A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16L1 in mouse and human intestinal Paneth cells*. *Nature* 456, 259-263.
- CHOI K. S., 2012. *Autophagy and cancer*. *Exp. Mol. Med.* 44, 109-120.
- CUERVO A. M., DICE J. F., 1998. *Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones and proteases*. *J. Mol. Med.* 76, 6-12.
- CUERVO A. M., DICE J. F., 2000. *Age-related decline in chaperone-mediated autophagy*. *J. Biol. Chem.* 275, 31505-31513.
- CUERVO A. M., KNECHT E., TERLECKY S. R., DICE J. F., 1995. *Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation*. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 269, C1200-C1208.
- CUERVO A. M., DICE J. F., KNECHT E., 1997. *A population of rat liver lysosomes responsible for the selective uptake and degradation of cytosolic proteins*. *J. Biol. Chem.* 272, 5606-5615.

- DERETIC V., 2009. *Links between autophagy, innate immunity, inflammation and Crohn's disease*. Digest. Diseases 27, 246-251.
- ESSICK E. E., SAM F., 2010. *Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, aging and cancer*. Oxid. Med. Cell. Longev. 3, 168-177.
- GOLIGORSKY M. S., 2010. *SIRTing out the link between autophagy and ageing*. Nephrol. Dialysis Transplant. 25, 2434-2436.
- HIDVEGI T., EWING M., HALE P., DIPPOLD C., BECKETT C., KEMP C., MAURICE N., MUKHERJEE A., GOLDBACH C., WATKINS S., MICHALOPOULOS G., PERLMUTTER D. H., 2010. *An autophagy-enhancing drug promotes degradation of mutant alpha1-antitrypsin Z and reduces hepatic fibrosis*. Science 329, 229-232.
- INAMI Y., WAGURI S., SAKAMOTO A., KOUNO T., NAKADA K., HINO O., WATANABE S., ANDO J., IWADATE M., YAMAMOTO M., LEE M. S., TANAKA K., KOMATSU M., 2011. *Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells*. J. Biol. Chem. 193, 275-284.
- JAEGER P. A., PICKFORD F., SUN C. H., LUCIN K. M., MASLIAH E., WYSS-CORAY T., 2010. *Regulation of amyloid precursor protein processing by the beclin 1 complex*. PLoS ONE 5, e11102.
- KANIA E., PAJAK B., ORZECZOWSKI A., 2015. *Calcium homeostasis and ER stress in control of autophagy in cancer cells*. BioMed Res. Internat. 2015, DOI: 10.1155/2015/352794.
- KIMURA T., TAKABATAKE Y., TAKAHASHI A., ISAKA Y., 2013. *Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy*. Cancer Res. 73, 3-7.
- KLIONSKY D. J., 2008. *Autophagy revisited. A conversation with Christian de Duve*. Autophagy 4, 740-743.
- KOMATSU M., WAGURI S., KOLKE M., SOU Y. S., UENO T., HARA T., MIZUSHIMA N., IWATA J. I., EZAKI J., MURATA S., HAMAZAKI J., NISHITO Y., IEMURA S., NATSUME T., YANAGAWA T., UWAYAMA J., WARABI E., YOSHIDA H., ISHII T., KOBAYASHI A., YAMAMOTO M., YUE Z., UCHIYAMA Y., KOMINAMI E., TANAKA K., 2007. *Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice*. Cell 131, 1149-1163.
- LIU L., YANG M., KANG R., WANG Z., ZHAO Y., YU Y., XIE M., YIN X., LIVESSEY K. M., LOZE M. T., TANG D., CAO L., 2011. *DAMP-mediated autophagy contributes to drug resistance*. Autophagy 7, 112-114.
- MIZUSHIMA N., NODA T., YOSHIMORI T., TANAKA Y., ISHII T., GEORGE M. D., KLIONSKY D. J., OHSUMI M., OHSUMI Y., 1998. *A protein conjugation system essential for autophagy*. Nature 395, 395-398.
- MIZUSHIMA N., YAMAMOTO A., HATANO M., KOBAYASHI Y., KABEYA Y., SUZUKI K., TOKUHISA T., OHSUMI Y., YOSHIMORI T., 2001. *Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells*. J. Cell Biol. 152, 657-667.
- MORSELLI E., MAIURI M. C., MARKARI M., MEGALOU E., PASPARAKI A., PALIKARAS K., CRIOLLO A., GALLUZZI L., MALIK S. H., VITALE I., MICHAUD M., MADEO F., TAVERNARAKIS N., KROEMER G., 2010. *The life span-prolonging effect of sirtuin-1 is mediated by autophagy*. Autophagy 6, 186-188.
- NAKAI A., YAMAGUCHI O., TAKEDA T., HIGUCHI Y., HIKOSO S., TANIKE M., OMIYA S., MIZOTE I., MATSUMURA Y., ASAHI M., NISHIDA K., HORI M., MIZUSHIMA N., OTSU K., 2007. *The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress*. Nat. Med. 13, 619-624.
- OHSUMI Y., 2001. *Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2, 211-216.
- PICKRELL A. M., YOULE R. J., 2015. *The roles of PINK1, Parkin and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease*. Neuron 85, 257-273.
- ROSE J. M., NOVOSELOV S. S., ROBINSON P. A., CHEETHAM M. E., 2011. *Molecular chaperone-mediated rescue of mitophagy by a parkin RING1 domain mutant*. Hum. Mol. Genet. 20, 16-27.
- SANCHEZ-SERRANO I., 2006. *Success in translational research: lessons from the development of bortezomib*. Nat. Rev. Drug Discov. 5, 107-114.
- TAKESHIGE K., BABA M., TSUBOI S., NODA T., OHSUMI Y., 1992. *Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction*. J. Cell Biol. 119, 301-311.
- TERLECKY S. R., 1994. *Hsp70s and lysosomal proteolysis*. Experientia 50, 1021-1025.
- TSUKADA M., OHSUMI Y., 1993. *Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 333, 169-174.
- UTTENWEILER A., SCHWARZ H., MAYER A., 2005. *Microautophagic vacuole invagination requires calmodulin in a Ca<sup>2+</sup>-independent function*. J. Biol. Chem. 280, 33289-33297.
- WING S. S., CHIANG H.-L., GOLDBERG A. L., DICE J. F., 1991. *Proteins containing peptide sequences related to Lys-Phe-Glu-Arg-Gln are selectively depleted in liver and heart, but not skeletal muscle, of fasted rats*. Bioch. J. 275, 165-169.
- YAMAMOTO H., FUJIOKA Y., SUZUKI S. W., NOSHIRO D., SUZUKI H., KONDO-KAKUTA C., KIMURA Y., HIRANO H., ANDO T., NODA N. N., OHSUMI Y., 2016. *The intrinsically disordered protein Atg13 mediates supramolecular assembly of autophagy initiation complexes*. Develop. Cell 38, 86-99.
- YANG L., LI P., FU S., CALAY E. S., HOTAMISLIGIL G. S., 2010. *Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance*. Cell Metab. 11, 467-478.

**KOSMOS Vol. 66, 2, 153–166, 2017**

ARKADIUSZ ORZECOWSKI

*Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 166, 02-787 Warsaw, Mossakowski Medical Research Centre PAS,  
Pawińskiego 5, 02-106 Warsaw, E-mail: orzechowski\_arkadiusz@wp.pl*

#### AUTOPHAGY, A BIG CLEANING

##### Summary

Autophagy is a physiological process found in eukariotes (plants, fungi, and animals) in which different cellular constituents identified as damaged or obsolete are degraded. In principle, every process of trafficking cell components into the lysosomes should be regarded as autophagy. In the progressive and controlled autodestruction the lysosomes represent waste disposal and recycling centre. Truthfully, autophagy could be considered a “housekeeper” with recycling capability. Although autophagy is known from early sixties of the last century, individual forms of autophagy (micro-, makro-, and chaperone-mediated autophagy, CMA) as well as precise course was not described in details unless molecular biology techniques were applied, for which Yoshinori Ohsumi was honoured with Nobel Prize in Physiology or Medicine in 2016. Nowadays, it is widely accepted that autophagy controls important physiological functions where cellular components need to be degraded and recycled, and it is even more important in stress conditions, when cells undergo damage. Such situations come up in diseases, moreover a great deal of observations obtained from sick individuals as well as experimental data confirm abnormal autophagy as a cause of disease.

Key words: autophagy, degradation, disease, Nobel Prize 2016, recycling