



PREGLEDNI RAD / REVIEW

Molekularni mehanizmi i morfološka obilježja autofagije

Molecular mechanisms and morphological characteristics of autophagy

Teuta Murati*, Martina Drenški, Marina Miletić, Ivana Kmetič

Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Laboratorij za toksikologiju, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

*Corresponding author: teuta.murati@pbf.unizg.hr

Sažetak

Autofagija je evolucijski dobro očuvan katabolički proces koji se događa u svim eukariotskim stanicama, a u kojem stanica razgradnjom oštećenih makromolekula i organela, između ostalog, osigurava hranjive tvari i energiju za održavanje vitalnih funkcija. Radi održavanja homeostaze, autofagija se na bazalnoj razini odvija neprestano u gotovo svim stanicama. Različiti fiziološki podražaji (oštećenja organela, nakupljanja proteinskih agregata, hipoksija, oksidacijski stres, upala i dr.) induciraju proces autofagije. Ipak, dokazano je da su nedostatak nutrijenata i energetske stres najvažniji regulatori procesa autofagije. Pokretanjem autofagije stanice se „brane“ recikliranjem hranjivih sastojaka i/ili razgradnjom oštećenih organela. Uslijed prekomjerne eliminacije organela i citoplazmatskog sadržaja, prekomjerne mitofagije (selektivne razgradnje mitohondrija) i posljednog nedostatka energije, aktivacija autofagije može rezultirati i staničnom smrću (tzv. stanična smrt ovisna o autofagiji). Istraživanja su ukazala na važnost autofagije u očuvanju zdravlja kod bakterijskih i virusnih infekcija, karcinoma, neurodegenerativnih, metaboličkih i upalnih bolesti. Pojam autofagije najčešće se odnosi na najviše istražen oblik autofagije - makroautofagiju. Osim o tom obliku autofagije, u ovom preglednom radu dan je uvid u mehanizme i obilježja mikroautofagije i autofagije posredovane šaperonom (CMA).

Ključne riječi: autofagija, makroautofagija, mikroautofagija, autofagija posredovana šaperonom

Abstract

Autophagy is an evolutionarily well-preserved catabolic process that occurs in all eukaryotic cells, in which the cell degrades damaged macromolecules and organelles to provide, among other things, nutrients and energy to maintain vital functions. To maintain homeostasis, autophagy occurs continuously at the basal level in almost all cells. Various physiological stimuli (organelle damage, accumulation of protein aggregates, hypoxia, oxidative stress, inflammation, etc.) trigger the autophagy process. However, nutrient deficiency and energy stress have been shown to be the strongest regulators of the autophagy process. By starting autophagy, cells "defend" themselves by recycling nutrients and/or degrading damaged organelles. Due to excessive removal of organelles and cytoplasmic content, excessive mitophagy (selective degradation of mitochondria), and consequent lack of energy, activation of autophagy can also lead to cell death (autophagy-dependent cell death). Research has shown the importance of autophagy in a variety of diseases, from bacterial and viral infections to cancer, neurodegenerative, metabolic and inflammatory diseases. The term autophagy usually refers to the most studied form of autophagy - macroautophagy. In addition to this form of autophagy, this review provides insight into the mechanisms and characteristics of microautophagy and chaperone-mediated autophagy (CMA).

Keywords: autophagy, macroautophagy, microautophagy, chaperone-mediated autophagy

Uvod

Pojam autofagija obuhvaća sve procese koji rezultiraju razgradnjom staničnih komponenti unutar lizosoma/vakuole tijekom kojih se recikliraju makromolekule (Klionsky i sur., 2011). Evolucijski gledano, autofagija je dobro očuvan katabolički proces koji se događa u svim eukariotskim stanicama, u kojem stanica sama „probavlja“ svoje komponente. Razgradnjom oštećenih makromolekula (proteina, lipida, glikogena i dr.) i organela (ribosoma, mitohondrija, peroksisoma, endoplazmatskog retikuluma i dr.) stanica, između ostalog, osigurava hranjive tvari i energiju za održavanje vitalnih funkcija vraćanjem razgrađenih komponenti u citosol kako bi ih mogla ponovno koristiti (Mizushima i Levine, 2010).

Riječ autofagija grčkog je porijekla (grč. autóphagos; auto = sam + phagein = jesti). Znanstvenik Christian de Duve otkrio je postojanje lizosoma kao staničnih organela, za što je 1974. godine dobio Nobelovu nagradu (Slika 1). Također, opisao je autofagiju kao fenomen tijekom kojeg se u stanicama vezikule koje sadrže proteine stapaju s lizosomima, što u konačnici dovodi do razgradnje staničnih proteina (Ichimiya i sur., 2020). Japanski znanstvenik Yoshinori Ohsumi 2016. godine također je nagrađen Nobelovom nagradom za medicinu za dugogodišnji rad i doprinos u razjašnjenju mehanizma autofagije (Slika 1).

Autofagija može biti inducirana različitim stanjima u organizmu, poput gladovanja, smanjenja razine inzulina, smanjenja razine ATP-a i hipoksijom (Bialik i sur., 2018; Yu i sur., 2018; Ichimiya i sur., 2020), a kako bi se održalo funkcioniranje stanica i potaknulo njihovo preživljavanje (Chung i Chung, 2019). Uključena je u prevenciju određenih vrsta bolesti (poput karcinoma, mišićnih poremećaja, Huntingtonove, Alzheimerove i Parkinsonove bolesti) te djeluje kao stanični obrambeni mehanizam za sprječavanje infekcije određenim patogenim bakterijama i virusima (Yorimitsu i Klionsky, 2005). Ipak, dokazano je i da je autofagija uključena u programiranu smrt stanica tipa II te može doprinijeti patologiji nekih bolesti (programirana smrt stanica tipa I odnosi se na apoptozu, a tipa III na nekrozu) (Galluzzi i sur., 2018). Poremećaji u autofagiji mogu dovesti do smanjenja mitohondrijske funkcije, povećanja nestabilnosti genoma te nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta (engl. Reactive Oxygen Species, ROS), što u konačnici dovodi do narušavanja homeostaze stanice i doprinosi razvoju bolesti (poput neurodegenerativnih i kardiovaskularnih bolesti, karcinoma, metaboličkih

bolesti poput dijabetesa, pretilosti, infekcija i upalnih bolesti) (Parzych i Klionsky, 2014; Antunes i sur, 2018). Autofagija ima utjecaj i na starenje, odnosno životni vijek te je dokazano da funkcija autofagije opada sa životnom dobi (Parzych i Klionsky, 2014; Antunes i sur, 2018; Ichimiya i sur., 2020).

Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća znanstvenici intenzivno proučavaju vrlo složene signalne puteve povezane s autofagijom, spojeve koji utječu na indukciju ili inhibiciju autofagije, te konkretnu ulogu autofagije u stanici i sprječavanju razvoja bolesti. Razumijevanje molekularnih mehanizama povezanih s autofagijom omogućila je identifikacija ATG gena (engl. AuTophagy related genes) najprije u kvascima, a nakon čega je slijedila identifikacija homologa u višim eukariotima (Yang i Klionsky, 2010). Dok se o točnom broju ATG gena još uvijek raspravlja, otprilike 20 ih je konzervirano među eukariotima i kodiraju za proteine koji su neophodni za autofagiju. Veliki broj istraživanja pokazao je da Atg proteini osim u procesu autofagije sudjeluju u širokom rasponu bioloških procesa (Collier i sur., 2021).

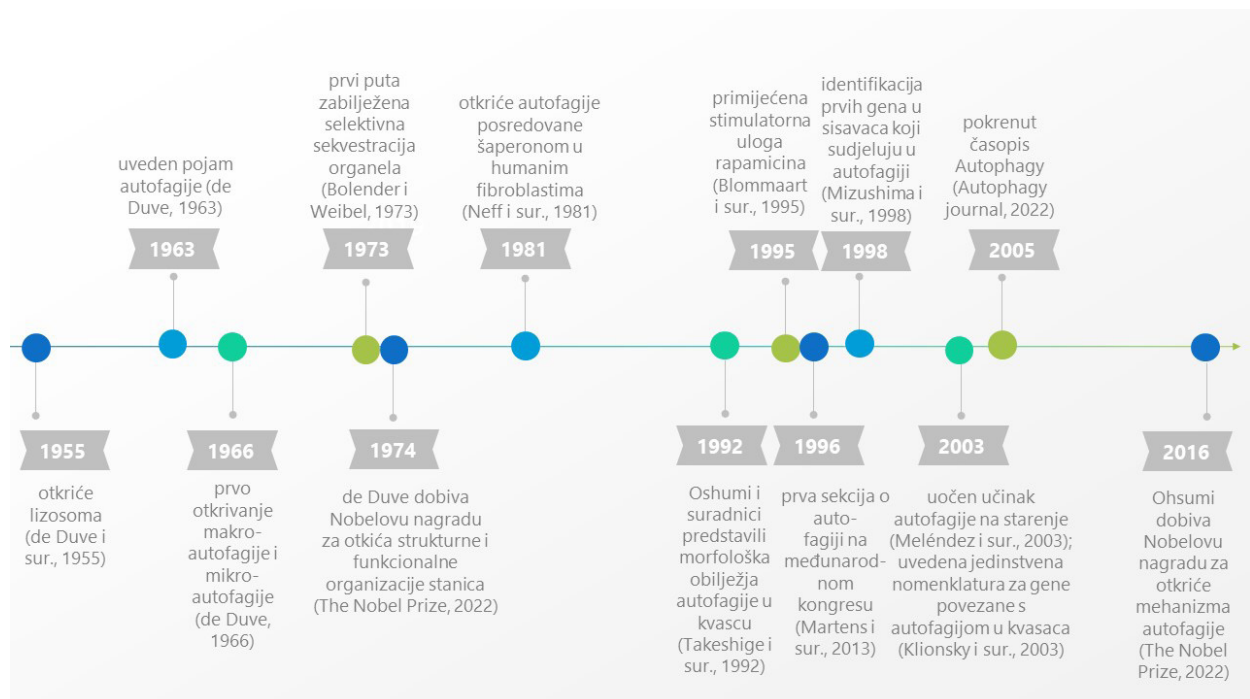
Autofagija je privukla značajnu pozornost kao potencijalna meta farmakoloških sredstava i dijetalnih intervencija. Odgovor organizma na nedostatak hranjivih tvari je minimiziranje anaboličkih procesa (sinteze, rasta) i poticanje autofagije kako bi se očuvala homeostaza i omogućilo stanicama da se prilagode stresu. Takav odgovor omogućuje „recikliranje“ oštećenih molekula i privremeno smanjuje sintezu proteina zbog uštede energije (Mattson i Arumugam, 2018; Chung i Chung, 2019; De Cabo i Mattson, 2019). Pretkliničke studije pokazuju da kalorijska restrikcija (engl. calorie restriction, CR) produljuje životni vijek i smanjuje razvoj bolesti povezanih sa starošću kao što su rak, infekcije, upalne bolesti (Chronova bolest), dijabetes, pretilost, neurodegenerativne i kardiovaskularne bolesti (Speakman i Mitchell, 2011; Marinković i sur., 2018).

S obzirom na fiziološke funkcije i način prijenosa citoplazmatskog supstrata do lizosoma, do danas su u sisavaca identificirana najmanje tri oblika autofagije: makroautofagija (prijenos citosolnog sadržaja u lizosom autofagosomima), mikroautofagija (prijenos unutarnjom invaginacijom lizosomalne membrane) i autofagija posredovana šaperonom (engl. chaperone-mediated autophagy, CMA; prijenos izravnom translokacijom preko lizosomalne membrane) (Levine i Kroemer, 2007; Miletić i sur., 2021). Iako postoje razlike u načinu

odvijanja, sva tri oblika autofagije u konačnici dovode do isporuke staničnog sadržaja u lizosom u kojem se odvija razgradnja (Parzych i Klionsky, 2014), a razgrađene komponente vraćaju se u citosol kako bi ih stanica mogla ponovno koristiti. U ovom radu dan je uvid u različite oblike, obilježja i mehanizme tri najznačajnija oblika autofagije – makroautofagiju, mikroautofagiju i CMA.

Makroautofagija

Pojam autofagije najčešće se odnosi na najviše istražen oblik autofagije - makroautofagiju. Za razliku od mikroautofagije i CMA, proces makroautofagije zahtijeva nastanak vezikula koje se nazivaju autofagosomi. Autofagosom se od ostalih unutarstaničnih vezikula razlikuje po tome što se stvara de novo, a ne nastaje pupanjem već postojećih organela. Proces makroautofagije odvija se u nekoliko koraka (Parzych i Klionsky, 2014). Indukcija makroautofagije u stanicama sisavaca može započeti na više mjesta, npr. membrani endoplazmatskog retikuluma (ER) odnosno strukturama pridruženima membrani ER tzv. omegasomima, membrani Golgijevog aparata i mitohondrija. Tijekom indukcije membrana se počinje širiti te se u ovom stadiju naziva fagofora (Slika 2A). Kako se fagofora širi, membrana se savija i prilagođava veličini sadržaja namijenjenog razgradnji. Nakon što ga potpuno okruži nastaje dvomembranska vezikula – autofagosom, koji zatim svoj sadržaj predaje lizosomu (kod sisavaca), odnosno vakuoli (kod kvasaca i biljaka) unutar kojih dolazi do razgradnje (Levine i Kroemer, 2007; Mijaljica i sur., 2012). To se odvija stapanjem membrane autofagosoma s membranom lizosoma/vakuole pri čemu posreduje nekoliko proteinskih kompleksa, poput SNARE (engl. N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) proteina. Produkt spajanja autofagosoma i lizosoma je vezikula nazvana autolizosom, koja sadrži unutarnju membranu autofagosoma i sadržaj namijenjen razgradnji, te lizosomski kiseli medij i hidrolitičke enzime (Parzych i Klionsky, 2014). Prije fuzije s lizosomom, autofagosom se može spojiti i s endosomom pri čemu se stvara vezikula zvana amfisosom, koja se zatim spaja s lizosomom, te opet nastaje autolizosom. U konačnici autofagosomski sadržaj se razgrađuje i putem lizosomskih permeaza vraća u citoplazmu, a stanica produkte razgradnje (npr. nukleotide, aminokiseline, šećere, masne kiseline i dr.) koristi za različite biosintetske procese ili za energiju (Mijaljica i sur.,



Slika 1. Vremenski slijed važnih događaja vezanih uz autofagiju

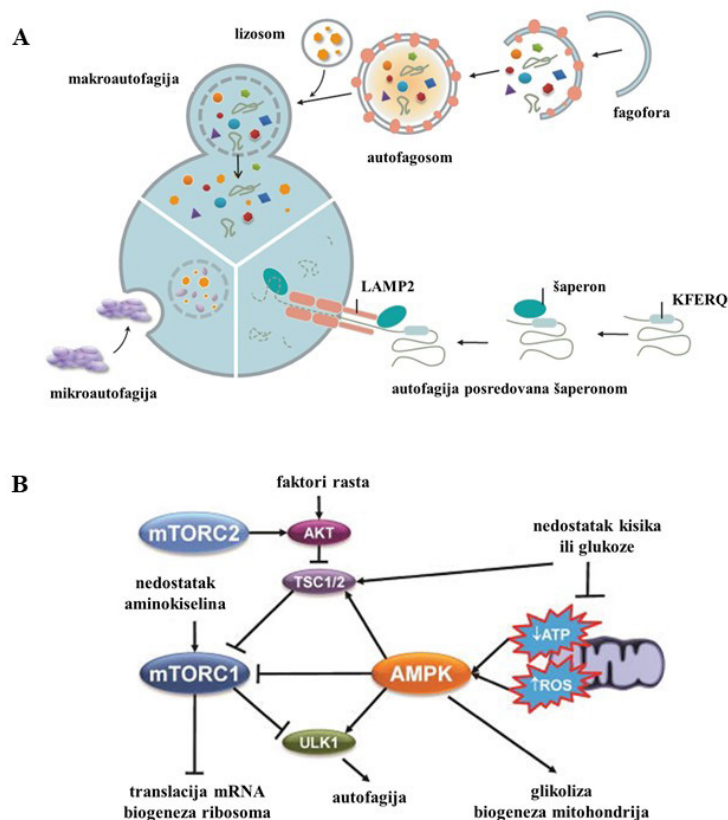
Figure 1. Autophagy – related timeline



2012).

Autofagija se na bazalnoj razini, radi održavanja homeostaze, odvija neprestano u gotovo svim stanicama. Različiti fiziološki podražaji, poput oštećenja organela, nakupljanja proteinskih agregata, temperature, hipoksije i upale, induciraju proces autofagije. Ipak, nedostatak nutrijenata i energetske stres najmoćniji su regulatori procesa autofagije (Levine i Kroemer, 2007; Chung i Chung, 2019). Stoga je autofagija uglavnom regulirana signalnim putevima ovisnim o nutrijentima, poput puta posredovanog cAMP ovisnom protein kinazom A (engl. cAMP-dependent protein kinase A, PKA) koji je ovisan o izvoru ugljika; i signalizacije putem TOR-a (engl. target of rapamycin - ciljna molekula rapamicina) koja je ovisna o izvorima dušika (Parzych i Klionsky, 2014). PKA je serin/treonin kinaza koja negativno regulira makroautofagiju putem izravne fosforilacije LC3 (engl. microtubule-associated protein 1 light chain 3), a kao esencijalni enzim je uključena u glavne biološke procese (ekspresiju gena, metabolizam, rast i proliferaciju stanica). mTOR (engl. mammalian target of rapamycin complex 1; ciljna molekula rapamicina u sisavaca) je protein kinaza koja je kod eukariota prisutna u dva kompleksa, mTORC1 i mTORC2 (Klionsky i sur., 2011). mTOR ima ulogu u razvoju, metabolizmu, pamćenju i starenju, dok na staničnoj razini reagira na (ne)prisutnost hranjivih tvari te sudjeluje

u staničnom rastu i proliferaciji, transkripciji gena, sintezi proteina, indukciji autofagije, biogenezi ribosoma, sintezi lipida, reorganizaciji aktinskog citoskeleta, biogenezi lizosoma (Jacinto, 2010; Li i sur., 2012; Acevo-Rodríguez i sur., 2020). Povećani omjer AMP/ATP koji se javlja u uvjetima nedostatka nutrijenata aktivira AMPK (engl. AMP-activated protein kinase - protein kinaza aktivirana AMP-om) koja izravno inducira autofagiju tako da fosforilira i aktivira TSC1/2 kompleks (engl. tuberous sclerosis complex 1/2) koji indirektno inhibira aktivnost mTORC1 (Slika 2B) čime se omogućava pokretanje makroautofagije (Parzych i Klionsky, 2014). Stvaranje ULK1 i ULK2 kompleksa (engl. Unc51-like autophagy activating kinase) najraniji je događaj u formiranju autofagosoma. U uvjetima bez stresa, mTORC1 fosforilira ULK1/2 čime inaktivira kompleks i ne dolazi do indukcije makroautofagije. Suprotno tome, u uvjetima kada su nutrijenti ograničeni, mTORC1 je suprimiran, tako da ULK1/2 kompleks posljedično ostaje defosforiliran, odnosno aktiviran (Yang i Klionsky, 2010). Jednom aktiviran, ULK kompleks prelazi u fagofor gdje aktivira PI3K kompleks (engl. phosphatidylinositol 3-kinase) što dovodi do stvaranja autofagosoma te, nakon produženja i zatvaranja, nastanka zrelog autofagosoma (Marinković i sur., 2018). Posljednji korak je spajanje autofagosoma s lizosomom pri čemu sudjeluju, između ostalih, i tri SNARE proteina: sintaksin 17 (STX17),



Slika 2. A) Tri oblika autofagije – makroautofagija, mikroautofagija i autofagija posredovana šaperonom. LAMP2 (engl. lysosome-associated membrane protein 2A) B) Signalizacija putem mTOR i AMPK regulira stanično preživljavanje i metabolizam kao odgovor na različite podražaje kao što su dostupnost hranjivih tvari i kisika, indukcija oksidacijskog stresa te promjene u energiji. Strelice označavaju aktivaciju. Zaustavne linije označavaju inhibiciju. mTOR (engl. mammalian target of rapamycin complex 1; ciljna molekula rapamicina u sisavaca); AMPK (engl. AMP-activated protein kinase; protein kinaza aktivirana AMP-om); ATP (engl. adenosine triphosphate; adozin trifosfat); ROS (engl. reactive oxygen species; reaktivne kisikove vrste); TSC1/2 (engl. tuberous sclerosis complex 1/2); ULK1 (engl. Unc51-like autophagy activating kinase); AKT (serin-treonin kinaza) (prema Garza-Lombó i sur., 2018; Xu i sur., 2021)

Figure 2. A) Three forms of autophagy - macroautophagy, microautophagy and chaperone-mediated autophagy. LAMP2 (lysosome-associated membrane protein 2A) B) Signaling by mTOR and AMPK regulates cell survival and metabolism in response to various stimuli such as nutrient and oxygen availability, induction of oxidative stress, and changes in energy. Arrows indicate activation. Stop lines indicate inhibition. mTOR (mammalian target of rapamycin complex 1); AMPK (AMP-activated protein kinase); ATP (adenosine triphosphate); ROS (reactive oxygen species); TSC1/2 (tuberous sclerosis complex 1/2); ULK1 (Unc51-like autophagy activating kinase); AKT (serine-threonine kinase) (according to Garza-Lombó et al., 2018; Xu et al., 2021)

SNAP29 (engl. synaptosomal-associated protein 29) i VAMP8 (engl. vesicle-associated membrane protein 8).

Povećanje citosolne koncentracije Ca^{2+} iona, koja je posljedica stresa ER, uzrokuje aktivaciju AMPK putem CAMKK2/CaMKK β (engl. calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta). Drugi način na koji ER stres može inducirati makroautofagiju je kroz nakupljanje nesmotanih proteina u citoplazmi stanice. Do indukcije makroautofagije (inhibicijom mTORC1) također dovode hipoksija, upala, oštećenja organela i nedostatak faktora rasta (Parzych i Klionsky, 2014). Nasuprot tome, prisustvo proteina, aminokiselina, inzulina i IGF (engl. insulin-like growth factor, inzulinu sličan faktor rasta) induciraju aktivaciju mTOR puta i inhibiraju inicijaciju makroautofagije (Chung i Chung, 2019).

Mikroautofagija

Mikroautofagija je proces razgradnje kod kojeg citoplazmatski sadržaj u lizosom (u sisavaca) ili u vakuole (u gljiva i biljaka) ulazi invaginacijom ili deformacijom membrane lizosoma odnosno vakuole (Slika 2A). Proces mikroautofagije je koordinirani proces koji se nadopunjuje makroautofagijom i CMA, no najslabije je istražen proces u odnosu na ostale oblike autofagije te se još uvijek malo zna o njegovoj regulaciji i ulogama u ljudskom zdravlju i bolestima (Li i sur., 2012). Pojam su prvi predložili de Duve i Wattiaux 60-tih godina XX. stoljeća za pretpostavljeni proces tijekom kojeg sitni dijelovi citoplazme mogu biti izravno izdvojeni u lizosome (Mijaljić i sur., 2011). Istraživanjima provedenim u posljednjih nekoliko godina otkrivena je mikroautofagija peroksisoma, citosola, mitohondrija, dijelova jezgri, kapljica lipida, ER, citosolnih enzima, membranskih proteina vakuola, čak i nakupina pigmenta i kloroplasta u biljkama, što implicira da ima mikroautofagija ima različite funkcije (Schuck, 2020). Mikroautofagija je opisana s 5 uzastopnih faza, a započinje invaginacijom (uvlačenjem) membrane (koje je inicirano gladovanjem) na područjima lizosoma/vakuole s niskim sadržajem transmembranskih proteina (bočnim razdvajanjem lipida i eliminacijom velikih transmembranskih proteina) te stvaranjem tzv. autofagnih cjevčica (engl. autophagic tubes). Na samom „vratu“ cjevčice stvara se suženje, što razlikuje autofagnu cjevčicu od obične invaginacije, a sam proces stvaranja cjevčice je aktivan proces ovisan o ATP-u (Li i sur., 2012). Slijedi faza formiranja vezikula (s visokom gustoćom lipida u membrani, a bez proteina; s enzimima koji sudjeluju u stvaranju vezikula, njihovom odvajanju i cijepanju, vezanima za unutrašnjost novonastale sferne strukture) na krajevima autofagnih cjevčica i njihovog širenja pomoću enzima, te naposljetku dolazi i do faze odvajanja vezikula od cjevčica. Vezikula u mikroautofagiji funkcijski je jednaka autofagosomu u makroautofagiji (Li i sur., 2012). Slijedi razgradnja vezikula pomoću enzima te recikliranje energije i hranjivih tvari djelovanjem permeaza.

Pojedini znanstvenici predlažu kategorizaciju mikroautofagije (s obzirom na promjene membrane i molekularne mehanizme) u tri tipa: mikroautofagija s lizosomskom/vakuolnom protruzijom (izbočenje/ispupčenost); mikroautofagija s lizosomskom/vakuolnom invaginacijom; mikroautofagija s endosomskom invaginacijom (Oku i Sakai, 2018).

Smatra se da do indukcije mikroautofagije dolazi signalnom kaskadom prilikom nedostatka dušika ili rapamicinom. Glavne funkcije mikroautofagije su preživljavanje stanice u uvjetima nedostatka dušika, održavanje homeostaze membrane i integriteta staničnih organela (Li i sur., 2012).

Autofagija posredovana šaperonom

CMA je visoko specifičan, selektivan proces autofagije koji citosolne proteine predviđene za razgradnju izravno isporučuje u lizosom, a do sada je opisan samo kod sisavaca. Supstrati za razgradnju dospijevaju u lumen lizosoma kroz protein-translokacijski kompleks koji se nalazi na membrani lizosoma, pa prema tome ne dolazi do membranskih invaginacija te nije potrebno nastajanje vezikula. Supstrati CMA

su topljivi proteini koji nose pentapeptidni motiv KFERQ - slijed aminokiselina: (1) jedan ili dva pozitivno nabijena ostatka: lizin, arginin; (2) jedan ili dva hidrofobna ostatka: izoleucin, leucin, valin, fenilalanin; (3) jedan od negativno nabijenih ostataka: asparaginska kiselina, glutaminska kiselina; i (4) jedan glutamin s obje strane pentapeptida (Galluzzi i sur., 2017; Kirchner i sur., 2019). Procjenjuje se da približno 30 % citosolnih proteina sadrži takav slijed. CMA razgrađuje širok raspon proteina, uključujući određene glikolitičke enzime, transkripcijske faktore i njihove inhibitore, proteine koji vežu kalcij i lipide i dr. (Parzych i Klionsky, 2014). Za prepoznavanje KFERQ sekvence odgovorni su šaperon proteini - skupina proteina, poznatih i kao molekularni pratitelji, koji pomažu u smatanju proteina u stabilnu konformaciju, a ekspresija im je pojačana u stresnim uvjetima te su ključan faktor u održavanju zdravlja stanica i dugovječnosti organizma (Saibil, 2013). HSC70 (engl. heat shock cognate chaperone of 70 kDa) se veže za KFERQ sekvencu i usmjerava protein koji je predviđen za razgradnju prema lizosomu (Slika 2A). Preko KFERQ sekvence protein se veže na LAMP-2A (engl. lysosome-associated membrane protein 2A) receptor na membrani lizosoma, dolazi do multimerizacije LAMP-2A i translokacije supstrata u lumen lizosoma (Parzych i Klionsky, 2014). Djelovanjem enzima prisutnih u lizosomskom lumenu (proteaza, lipaza, glikozidaza i nukleaza) dolazi do razgradnje sadržaja (Orenstein i Cuervo, 2010). CMA je inducirana u situacijama poput blagog oksidacijskog stresa, prisutnošću toksina koji oštećuju proteine i tijekom duljih razdoblja nedostatka hranjivih tvari (Parzych i Klionsky, 2014). Razgradnja proteina putem CMA tijekom perioda nedostatka hranjivih tvari osigurava stanicama potrebne aminokiseline za održavanje sinteze proteina u tim uvjetima. Također, selektivno uklanjanje oštećenih proteina putem CMA ima važnu regulatornu ulogu u metaboličkim putevima kao što su metabolizam glukoze i lipida, putevima popravka DNA i staničnom ciklusu, te u kontroli stanične energetske ravnoteže. Ukoliko postoji disfunkcionalnost u tom procesu, do čega češće dolazi u starijoj životnoj dobi, postoji mogućnost pojave različitih metaboličkih poremećaja, neurodegenerativnih bolesti, tumora, imunodeficijencije i dr. (Juste i Cuervo, 2019).

Putem CMA ne mogu se razgraditi organele. Poput makroautofagije, CMA se maksimalno aktivira u uvjetima stresa kao što je nedostatak hranjivih tvari i oksidacijski stres, koji dovodi do oštećenja proteina. Vrlo često te dvije vrste autofagije djeluju na sinkroniziran ili sekvencijalan način. Na primjer, tijekom gladovanja prvo se aktivira makroautofagija, a zatim, kako to stanje bez izvora hranjivih tvari traje, stanice se prebacuju na CMA, koja selektivno „bira“ neesencijalne proteine za razgradnju kako bi se dobile aminokiseline potrebne za sintezu esencijalnih proteina (Orenstein i Cuervo, 2010).

Selektivna i neselektivna autofagija

Procesi mikroautofagije i makroautofagije mogu se kategorizirati kao selektivni i neselektivni. U slučaju nedostatka hranjivih tvari, autofagijom se neselektivno kataboliziraju citoplazmatske komponente zatvarajući ih i razgrađujući unutar autofagosoma. Neselektivna autofagija prvenstveno je odgovor na nedostatak hranjivih tvari, dok stanice selektivnu autofagiju koriste u različite svrhe - kako bi se prilagodile promjenjivim uvjetima okoliša i kako bi eliminirale oštećene organele (Jin i sur., 2013). Prilikom neselektivne autofagije nasumično se razgrađuju citoplazmatske komponente, za razliku od selektivne autofagije koja specifično prepoznaje i razgrađuje određene supstrate (egzogenog ili endogenog podrijetla) namijenjene za razgradnju (proteinske agregate, oštećene organele ili patogene) (Jin i sur., 2013; Feng i sur., 2014). Postojanje autofagije koja selektivno prepoznaje organel kao supstrat predloženo je prvi puta 1973. godine za ER i nazvano ER-fagija/retikulofagija (Saito i Sadoshima, 2015). Od tada su identificirani brojni molekularni mehanizmi koji sudjeluju u autofagiji koja kao supstrate specifično prepoznaje organele te se oni identificiraju jedinstvenim nazivom prema supstratu kojeg razgrađuju. Tako se npr. izraz mitofagija koristi se za selektivnu razgradnju mitohondrija,



peksfagija za peroksisome, ribofagija za ribosome, feritinofagija za feritin, ksenofagija za mikrobe itd. (Saito i Sadoshima, 2015; Galluzzi i sur., 2017; Ichimiya i sur., 2020; Miletić i sur., 2021).

Neselektivna mikroautofagija (obično se naziva mikroautofagija) zahvaća topljive unutarstanične supstrate tubularnim invaginacijama, dok selektivna mikroautofagija (mikropeksfagija, djelomična mikroautofagija jezgre, mikromitofagija) izdvaja specifične organele izbočinama nalik krakovima (protruzijama). Neselektivna mikroautofagija karakteristična je za stanice sisavaca, dok su tri oblika selektivne mikroautofagije često inducirana u kvascima (Li i sur., 2012). CMA, kao visoko selektivna vrsta autofagije, razgrađuje samo citosolne proteine koji sadrže motiv KFERQ, ali ne i organele ili druge makromolekule poput lipida, nukleinskih kiselina ili membranskih proteina. Pokazalo se da CMA može djelovati na oko 30 % citosolnih proteina te ima važnu u regulaciji metabolizma, očuvanju integriteta genoma, starenju i onkogenezi (Galluzzi i sur., 2017).

Stanična smrt ovisna o autofagiji

Autofagija je neophodna za preživljavanje stanica i održavanje i/ili obnavljanje homeostaze te se na bazalnoj razini odvija u svakoj stanici eliminacijom proteina i oštećenih organela, ali i kao odgovor na stanični stres tijekom kojeg se razgradnjom i recikliranjem staničnih komponenti, osigurava kontinuirani izvor energije i građivnih elemenata (Levine i Kroemer, 2007). Opis autofagije kao jednog od oblika stanične smrti (tipa II) unosi nejasnoću jer prisutnost autofagosoma u stanicama ne znači nužno da će stanica odumrijeti, već prije opisuje napore stanice u sprječavanju takvog ishoda. Rješenje ove dileme proizlazi iz preporuka Odbora za nomenklaturu stanične smrti (engl. The Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD) koji definira staničnu smrt ovisnu o autofagiji (engl. autophagy-dependent cell death, ADCD) kao reguliranu staničnu smrt koja ovisi o mehanizmu autofagije, bez uključivanja alternativnih puteva stanične smrti (Galluzzi i sur., 2017; Galluzzi i sur., 2018). Smatra se da ADCD može nastupiti kao posljedica prekomjerne eliminacije organela i citoplazmatskog sadržaja putem masivne indukcije autofagosoma i autolizosoma (engl. excessive autophagy); prekomjerne mitofagije i posljedičnog nedostatka energije (engl. excessive mitophagy) te zbog aktivacije Na⁺/K⁺-ATP-azne pumpe, promjenama u membranskoj osmolarnosti i ionskom transportu - autozi (engl. autosis) (Bialik i sur., 2018). Autoza je novootkriven oblik stanične smrti ovisne o autofagiji koji nastupa kao posljedica tretmana peptidima koji induciraju autofagiju, gladovanja ili in vivo tijekom određenih tipova ishemije, a karakterizira ju povećanje perinuklearnog prostora (koji je prazan) i nestanak staničnih organela kao što je ER (Liu i Levine, 2015).

Za razliku od toga, u nekim slučajevima autofagija nije direktan uzrok stanične smrti, već je važna za aktivaciju drugih oblika stanične smrti. Autofagija se može preusmjeriti prema apoptozi ili nekrozi ukoliko ne dođe do stvaranja autolizosoma ili do razgradnje njegovog sadržaja (engl. stalled autophagy). Također može aktivirati alternativne puteve stanične smrti putem selektivnog ciljanja proteina koji su ograničavajući i neophodni za funkcioniranje stanica preko za njih specifičnih receptora (engl. selective autophagic degradation). Također, membrane fagofora i/ili autofagosoma mogu djelovati kao potpora za sastavljanje kompleksa koji induciraju staničnu smrt, na primjer, dovodeći do aktivacije apoptoze ili nekroptoze (engl. scaffolding function) (Bialik i sur., 2018).

Zaključci

Kao odgovor na stres stanice aktiviraju puteve koji poboljšavaju intrinzičnu obranu od oksidacijskog i metaboličkog stresa te one koji uklanjaju ili popravljaju oštećene molekule. U uvjetima nedostatka hranjivih sastojaka u brojnim tkivima i organima u značajnoj mjeri se inducira proces autofagije kako bi se održala homeostaza. U stanicama sisavaca razlikuju se tri primarna oblika autofagije: makroautofagija, mikroautofagija i autofagija posredovana šaperonom. Brojna istraživanja govore u prilog da autofagija ima utjecaj na starenje te da disfunkcija autofagije može dovesti do nepravilne stanične funkcije i posljedično razvoja različitih bolesti (poput infekcija i upalnih bolesti, neurodegenerativnih, metaboličkih i kardiovaskularnih bolesti te pretilosti). Također, modulacija procesa autofagije identificirana je kao potencijalna terapija u liječenju karcinoma. Mnogi aktivatori autofagije su u pretkliničkim studijama ili kliničkim ispitivanjima, a nekoliko ih je već, u kombinaciji s drugim konvencionalnim terapijama, odobreno za kliničku upotrebu. Također, s obzirom da CR pokazuje brojne dobrobiti na zdravlje organizma i u prevenciji bolesti, predmetom istraživanja postaju razni nutraceutici i potencijalni lijekovi koji oponašaju biokemijske i funkcionalne učinke CR (dovode do aktivacije AMPK i inhibicije mTOR-a čime se inducira autofagija), ali bez potrebe za smanjivanjem unosa hrane. Takvi spojevi nazivaju se mimetici kalorijske restrikcije (engl. CRM - calorie restriction mimetics), a neki poput rapamicina i metformina istraženi su kroz kliničku primjenu kod ljudi. Zbog složenosti procesa autofagije i interakcije s drugim staničnim procesima, potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se bolje razumjeli post i CR kao dovoljno učinkoviti i sigurni induktori autofagije te razmotrila njihova terapijska primjena u prevenciji i/ili liječenju različitih bolesti. Pažnju bi u budućim ispitivanjima bilo dobro usmjeriti i na druge endogene molekule čije razine opadaju tijekom starenja (poput spermidina), kao i CR mimetika koji su sastavni dio prehrane (poput polifenola i drugih fitokemikalija) te su iz sigurnosnih aspekata zasigurno povoljniji.

Zahvala

Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom "Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija" (IP-2020-02-9162) i Sveučilište u Zagrebu.

Literatura

- Acevo-Rodríguez P. S., Maldonado G., Castro-Obregón S., Hernández G. (2020) Autophagy regulation by the translation machinery and its implications in cancer. *Frontiers in Oncology*, 10 322.
- Antunes F., Erustes A. G., Costa A. J., Nascimento A. C., Bincoletto C., Ureshino R. P., Pereira G., Smaili S. S. (2018) Autophagy and intermittent fasting: the connection for cancer therapy? *Clinics*, 73 (1) e814s.
- Autophagy journal (2022) Journal homepage. <https://www.tandfonline.com/journals/kaup20>
- Pristupljeno 19. srpnja 2022.
- Bialik S., Dasari S. K., Kimchi A. (2018) Autophagy-dependent cell death - where, how and why a cell eats itself to death. *Journal of Cell Science*, 131 (18) jcs215152.
- Blommaert E. F., Luiken J. J., Blommaert P. J., van Woerkom G. M., Meijer, A. J. (1995) Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 270 2320–2326.
- Bolender R. P., Weibel E. R. (1973) A morphometric study of the removal of phenobarbital-induced membranes from hepatocytes after cessation of treatment. *Journal of Cell Biology*, 56 746–761.
- Chung K. W., Chung H. Y. (2019) The effects of calorie restriction on autophagy: role on aging intervention. *Nutrients*, 11 (12) 2923.
- Collier J.J., Suomi F., Oláhová M., McWilliams T.G., Taylor R.W. (2021) Emerging roles of ATG7 in human health and disease. *EMBO Mol Med*, 13 (12) e14824.
- De Cabo R., Mattson M. P. (2019) Effects of intermittent fasting on health, aging, and disease. *The New England Journal of Medicine*, 381 (26) 2541–2551.
- deDuve C., Pressman B. C., Gianetto R., Wattiaux R., Appelmans, F. (1955) Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochemical Journal*, 60 (4) 604–617.
- de Duve C. (1963) The lysosome. *Scientific American*, 208 64–72.
- de Duve C., Wattiaux R. (1966) Functions of lysosomes. *Annual Review of Physiology*, 28 435–492.
- Feng Y., He D., Yao Z., Klionsky D. J. (2014) The machinery of macroautophagy. *Cell Research*, 24 (1) 24–41.
- Galluzzi L., Baehrecke E. H., Ballabio A., Boya P., Bravo-San Pedro J. M., Cecconi F., ... Kroemer G. (2017) Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal*, 36 (13) 1811–1836.
- Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S. A., Abrams J. M., Adam D., Agostinis P., ... Kroemer G. (2018) Molecular mechanisms of cell death - recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25 486–541.
- Garza-Lombó C, Schroder A, Reyes-Reyes EM, Franco R. (2018) mTOR/AMPK signaling in the brain: Cell metabolism, proteostasis and survival. *Current Opinion in Toxicology*, 8 102–110.
- Ichimiya T., Yamakawa T., Hirano T., Yokoyama Y., Hayashi Y., Hirayama D., Wagatsuma K., Itoi T., Nakase H. (2020) Autophagy and autophagy-related diseases: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (23) 8974.
- Jacinto E. (2010) 7 - AGC kinases in mTOR signaling. U: *The Enzymes* (Hall M. N., Tamanoi F.), 27 101–128.
- Jin M., Liu X., Klionsky D. J. (2013) SnapShot: Selective Autophagy. *Cell*, 152 (0) 368–368.e2.
- Juste Y. R., Cuervo A. M. (2019) Analysis of chaperone-mediated autophagy. *Methods in Molecular Biology*, 1880 703–727.
- Kirchner P., Bourdenx M., Madrigal-Matute J., Tian S., Diaz A., Bartholdy B. A., Will B., Cuervo A. M. (2019) Proteome-wide analysis of chaperone-mediated autophagy targeting motifs. *PLoS Biology*, 17 (5) e3000301.
- Klionsky D. J., Cregg J., Dunn Jr W. A., Emr S. D., Sakai Y., Sandoval I. V., Sibirny A., Subramani S., Thumm M., Veenhuis M., Ohsumi Y. (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental Cell*, 5 (4) 539–545.
- Klionsky D. J., Baehrecke E. H., Brumell J. H., Chu C. T., Codogno P., Cuervo A. M., Debnath J., Deretic V., Elazar Z., Eskelinen E.-L., Finkbeiner S., Fueyo-Margareto J., Gewirtz D. A., Jäättelä M., Kroemer G., Levine B., Melia T. J., Mizushima N., Rubinsztein D. C., Simonsen A., Thorburn A., Thumm M., Tooze S. A. (2011) A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition). *Autophagy*, 7 (11) 1273–1294.
- Levine B., Kroemer G. (2007) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132 (1) 27–42.
- Li W. W., Li J., Bao J. K. (2012) Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69 (7) 1125–1136.
- Liu Y., Levine B. (2015) Autophagy and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death & Differentiation*, 22 367–376.
- Marinković M., Šprung M., Buljubašić M., Novak I. (2018) Autophagy modulation in cancer: current knowledge on action and therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018 8023821.
- Martens S., Rusten T. E., Kraft C. (2013) Autophagy at sea. *Autophagy*, 9 (9) 1286–1291.
- Mattson M. P., Arumugam T. V. (2018) Hallmarks of brain aging: adaptive and pathological modification by metabolic states. *Cell Metabolism*, 27 (6) 1176–1199.
- Mijaljica D., Prescott M., Devenish R. J. (2011) Microautophagy in mammalian cells. Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, 7 (7) 673–682.
- Mijaljica D., Prescott M., Devenish R. J. (2012) The intriguing life of autophagosomes. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (3) 3618–3635.
- Miletić M., Murati T., Slavica A., Kmetič I. (2021) Opstati ili umrijeti – regulacija stanične smrti. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 16 (1-2) 11–19.
- Mizushima N., Sugita H., Yoshimori T., Ohsumi Y. (1998) A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 273 33889–33892.
- Mizushima N., Levine B. (2010) Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature Cell Biology*, 12 (9) 823–830.
- Neff N. T., Bourret L., Miao P., Dice J. F. (1981) Degradation of proteins microinjected into IMR-90 human diploid fibroblasts. *Journal of Cell Biology*, 91 184–194.
- Oku M., Sakai Y. (2018) Three distinct types of microautophagy based on membrane dynamics and molecular machineries. *BioEssays*, 40 (6) 1800008.
- Orenstein S. J., Cuervo, A. M. (2010) Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21 (7) 719–726.
- Parzych K. R., Klionsky D. J. (2014) An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20 (3) 460–473.



- Saibil H. (2013) Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14 (10) 630-642.
- Saito T., Sadoshima J. (2015) Molecular mechanisms of mitochondrial autophagy/mitophagy in the heart. *Circulation Research*, 116 (8) 1477-1490.
- Schuck S. (2020) Microautophagy – distinct molecular mechanisms handle cargoes of many sizes. *Journal of Cell Science*, 133 (17) jcs246322.
- Speakman J. R., Mitchell S. E. (2011) Caloric restriction. *Molecular Aspects of Medicine*, 32 (3) 159–221.
- Takehige K., Baba M., Tsuboi S., Noda T., Ohsumi Y. (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *Journal of Cell Biology*, 119 301–311.
- The Nobel Prize (2022) Nobel Prizes and Laureates. Dostupno na <https://www.nobelprize.org/prizes/> Pristupljeno 19. srpnja 2022.
- Xu W., Ocak U., Gao L., Tu S., Lenahan C. J., Zhang J, Shao A. (2021) Selective autophagy as a therapeutic target for neurological diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78 1369–1392.
- Yang Z., Klionsky D. J. (2010) Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 22 (2) 124–131.
- Yorimitsu T., Klionsky D. J. (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death and Differentiation*, 12 (2) 1542–1552.
- Yu L., Chen Y., Tooze S. A. (2018) Autophagy pathway: cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*, 14 (2) 207–215.