

Autofagia – w doli i niedoli, czyli jak dobrze posprzątać i przeżyć

Zoia Cherep

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii

E-mail: zoiche@st.amu.edu.pl

tutor: dr hab. Sławomir Borek, profesor UAM

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii,

Instytut Biologii Eksperymentalnej, Zakład Fizjologii Roślin

Słowa kluczowe: autofagosom, autolizosom, ciało autofagowe, choroby, makroautofagia, homeostaza, odzysk metabolitów, programowana śmierć komórki, stres, wakuolarny enzym procesujący

Wstęp

Jednym z procesów odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy organizmu jest autofagia. Jest to proces, który zachodzi w każdej żywej komórce eukariotycznej przez cały okres ontogenezy i polega na tym, iż uszkodzone lub niepotrzebne organelle oraz kompleksy białkowe są degradowane wewnątrz wakuoli (grzyby i rośliny) lub w autolizosomie (zwierzęta). W trakcie tego procesu wielkocząsteczkowe substancje są degradowane do ich podstawowych składników (aminokwasów, kwasów tłuszczowych, cukrów prostych), a po przetransportowaniu ich do cytoplazmy są ponownie używane zarówno w procesach biosyntezy nowych komponentów komórki, jak i jako substraty oddechowe. W warunkach normalnego wzrostu i rozwoju

organizmu autofagia zachodzi na poziomie bazowym, ale może ona ulegać nasileniu pod wpływem biotycznych i abiotycznych czynników stresowych. Przykładem czynnika stresowego, który nasila autofagię jest głód węglowy lub azotowy, czyli brak dostarczania do komórki wystarczającej ilości cukrów albo aminokwasów (Borek i in., 2015; Morishita i Mizushima, 2019). Po raz pierwszy określenie 'autofagia' użył Christian de Duve do opisanie procesu degradacji różnych składników własnych komórki z udziałem lizosomów. Przeciwwstawił on termin 'autofagia' (ang. *eating self*; zjadanie siebie), terminowi 'heterofagia' (ang. *eating others*; zjadanie obcych). Do głębszego zrozumienia mechanizmów autofagii przyczynił się japoński uczoney – profesor Yoshinori Ōsumi, któremu w roku 2016 przyznano Nagrodę Nobla z Fizjologii lub Medycyny za wyjaśnienie mechanizmów autofagii u drożdży i zidentyfikowanie podstawowych genów uczestniczących w tym procesie.

Początkowo uważano, że autofagiczna degradacja komponentów komórki zachodzi przypadkowo – losowo, a dopiero później stwierdzono, że jest to proces selektywny – podlegający precyzyjnej kontroli i regulacji. Dla selektywnych rodzajów autofagii utworzono osobne nazwy, na przykład, podczas mitofagii (ang. *mitophagy*) degradacji ulegają mitochondria, peksofagii (ang. *pexophagy*) – peroksysonomy, nukleofagii (ang. *nukleophagy*) – całe lub fragmenty jądra komórkowego, rybofagii (ang. *ribophagy*) – rybosomy, lipofagii (ang. *lipophagy*) – ciała tłuszczowe (Li i in., 2021).

Niniejsza praca poświęcona jest roli autofagii zarówno w warunkach normalnego wzrostu i rozwoju organizmu, jak również w warunkach oddziaływania różnego rodzaju czynników stresowych, zarówno abiotycznych jak i biotycznych. W artykule główny nacisk położony zostanie na przebieg i rolę makroautofagii, ponieważ ten rodzaj autofagii jest najlepiej zbadany.

Typy autofagii

Wyróżnić można dwa główne typy autofagii: makroautofagię i mikroautofagię. Te dwa typy autofagii różnią się sposobem dostarczania ładunku do wakuoli i lizosomu, a także mechanizmami ich regulacji. Podczas makroautofagii, przeznaczony do degradacji ładunek jest transportowany wewnątrz wyspecjalizowanego pęcherzyka, zwanego autofagosomem, który łączy się z wakuolą (grzyby i rośliny) lub lizosomem (zwierzęta). Natomiast, mikroautofagia polega na dostarczeniu części cytoplazmy do wakuoli bez wytwarzania autofagosomu, ale poprzez powiększającą się inwaginację tonoplastu – błony wakuoli (Stefaniak i in., 2020; Li i in., 2021). Znany jest też trzeci typ autofagii, zwany megaautofagią. To zjawisko powoduje spustoszenie w komórce. Podczas megaautofagii tonoplast jest osłabiony lub jego ciągłość zostaje przerwana, co powo-

duje uwolnienie enzymów litycznych, które całkowicie degradują zawartość komórki. Występowanie megaautofagii na razie potwierdzono tylko w komórkach roślinnych i odgrywa ona kluczową rolę w programowanej śmierci komórek (Borek i in., 2015).

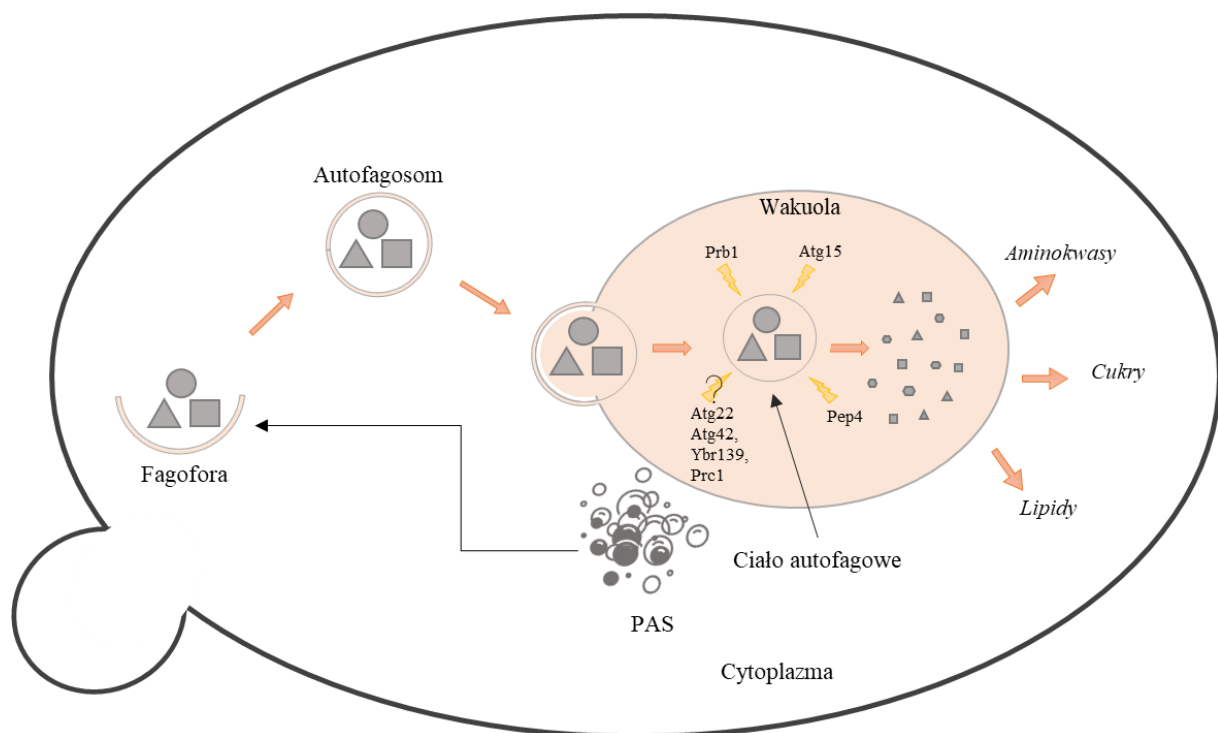
Wyspecjalizowane białka uczestniczące w procesie autofagii są nazywane białkami Atg (ang. *Autophagy-related*). Do tej pory zidentyfikowano 42 białka Atg. Spośród nich wyróżnia się 17 białek Atg, które uczestniczą we wszystkich rodzajach autofagii i nazywane są białkami rdzeniowymi (Mizushima, 2018; Morishita i Mizushima, 2019). Geny *Atg* w większości mają charakter konserwatywny, tzn. wykazują wysokie podobieństwo u drożdży, zwierząt i roślin. Do genów konserwatywnych, zaliczyć można geny *Atg1-Atg10*, *Atg12*, *Atg14*, *Atg16*, oraz *Atg18*. W niektórych rodzajach autofagii, włączając nieselektywną makroautofagię, oraz niektóre rodzaje autofagii selektywnej, uczestniczy około 16-18 ortologicznych genów *Atg*. Są to geny kodujące białka zaangażowane w początkowe etapy autofagii, a zwłaszcza w formowanie autofagosomu i dlatego określane są jako rdzeniowe dla autofagii. Białko *Atg8* jest często wykorzystywane w wielu badaniach jako marker autofagii, ponieważ może ono reprezentować 25% wszystkich białek zaangażowanych w autofagię (Xie i Klionsky, 2007; Mizushima, 2018).

Przebieg makroautofagii u drożdży

Charakterystyczną cechą makroautofagii w komórkach drożdży (Ryc. 1) jest występowanie miejsca powstawania fagofory (PAS; ang. *Phagophore Assembly Site*). Jest to miejsce nagromadzenia białek Atg i niewielkich rozmiarów pęcherzyków i zazwyczaj lokalizowane jest w bezpośrednim sąsiedztwie wakuoli. W tym miejscu rozpoczyna się wytwarzanie wyspecjalizo-

wanego pęcherzyka zwanego fagoforą. Fagofora następnie powiększa się i otacza przeznaczony do degradacji ładunek. Po połączeniu się błon fagofory powstaje pęcherzyk zbudowany z podwójnej błony zwany autofagosomem (Borek i in., 2015; Stefaniak i in., 2020). Dojrzały autofagosom łączy się z tonoplastem (błoną wakuoli) i przenosi ładunek do wnętrza wakuoli. Ładunek przetransportowany do wnętrza wakuoli tworzy pęcherzyk otoczony pojedynczą błoną i nazywa się ciałem autofagowym. Ciało autofagowe jest błyskawicznie degradowane przez wakuolarnie enzymy lityczne. Do białek uczestniczących w degradacji ciała autofagowego u drożdży zalicza się

proteinazę A (Pep4), proteinazę B (Prb1) oraz Atg15. Jest to najlepiej opisany enzym lityczny uczestniczący w procesie degradacji ciała autofagowego u drożdży. Atg15 wykazuje aktywność lipolityczną i uczestniczy nie tylko w degradacji membrany, ale także w degradacji wnętrza ciała autofagowego. Rola enzymów Atg22, Atg42, Ybr139 i Prc1 nie jest do końca potwierdzona i opisana, ale przypuszcza się, że mogą one także być zaangażowane w degradację ciał autofagowych u drożdży (Stefaniak i in., 2020). Produkty degradacji ciała autofagowego są transportowane z wakuoli do cytoplazmy i są ponownie wykorzystywane (Borek i in., 2015; Mizushima, 2018; Stefaniak i in., 2020).



Ryc.1. Schemat przebiegu makroautofagii w komórkach drożdży. PAS – miejsce tworzenia fagofory (ang. *Phagophore Assembly Site*), Pep4, Prb1 i Atg15 – enzymy lityczne degradujące ciało autofagowe, Atg22, Atg42, Ybr139 i Prc1 – białka, które prawdopodobnie uczestniczą w degradacji ciała autofagowego (na podstawie Borek i in., 2015 i Stefaniak i in., 2020)

Przebieg makroautofagii u roślin

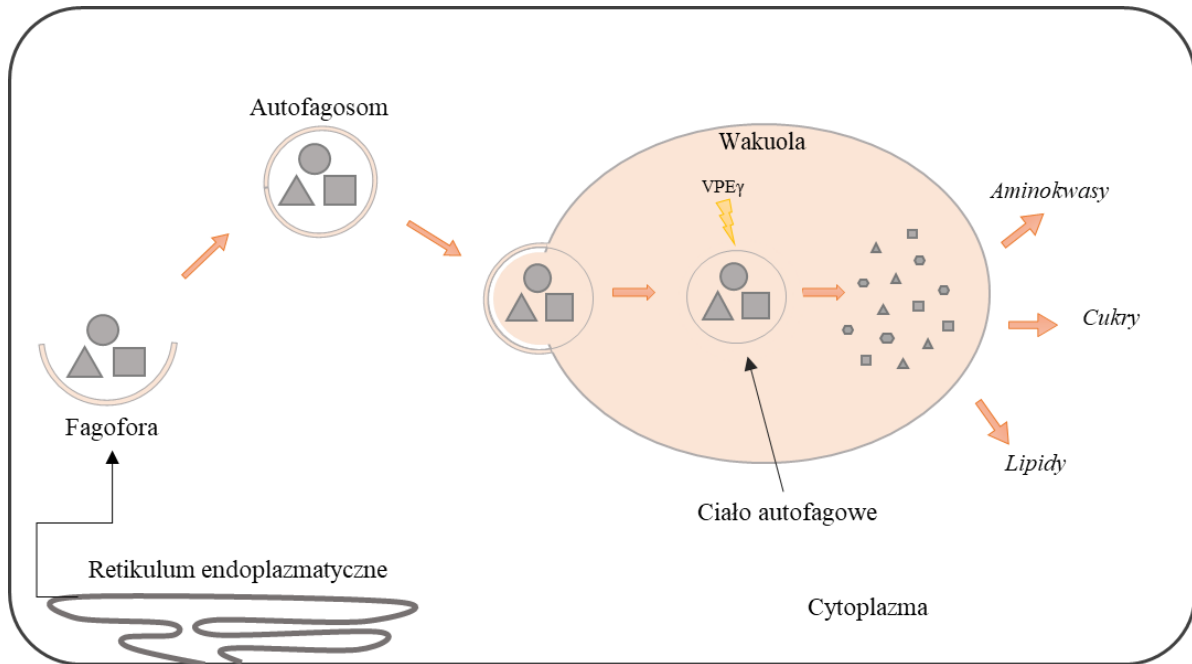
W komórkach roślin (Ryc. 2) nie występuje PAS, więc nie ma zdefiniowanego miejsca, w którym zaczyna wykształcać się fagofora. Sugeruje się, że u roślin źródłem błony dla powiększającej się fagofory, a w konsekwencji autofagosomu, jest retikulum endoplazmatyczne (Mizushima, 2018). Dojrzały autofagosom łączy się z tonoplastem, tworząc wewnątrz wakuoli ciało autofagowe, które ulega degradacji. Dekompozycja ciał autofagowych u roślin jest bardzo słabo poznanym etapem autofagii i nieliczne tylko badania wskazują, że enzymem, który może uczestniczyć w tym etapie autofagii u roślin jest wakuolarny enzym procesujący (VPE; ang. *Vacuolar Processing Enzyme*). VPE należy do proteaz cysteinowych i odgrywa centralną rolę w mobilizacji białek zapasowych, a także podczas wzrostu i rozwoju roślin, oraz reakcji organizmu na czynniki stresowe. VPE uczestniczy również w programowanej śmierci komórki (PCD; ang. *Programmed Cell Death*). Przez obecność w komórce roślinnej ściany komórkowej, podczas PCD nie jest ona usuwana przez sąsiednie komórki, jak to jest w przypadku komórki zwierzęcej. Natomiast wyspecjalizowane enzymy, a zwłaszcza VPE, mogą prowokować uwolnienie enzymów litycznych do cytoplazmy. VPE może oddziaływać na tonoplast i powodować rozerwanie wakuoli i w ten sposób uwalniać proteazy do cytoplazmy (Teper-Bamnolker i in., 2019). Do tej pory wyróżnia się cztery typy VPE: α , β , γ i δ (Vorster i in., 2019). U *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano izoformę γ , która działa podobnie do drożdżowej Proteinyzy A, aktywując kaskadę innych hydrolaz, które odpowiedzialne są za degradację różnych elementów zlokalizowanych wewnątrz wakuoli, w tym ciał autofagowych (Rojo i in., 2003; Stefaniak i in., 2020). Ekspresja genów kodujących VPE może być indukowana przez

reakcje nadwrażliwości (HR; ang. *Hypersensitivity Reactions*), które w połączeniu z PCD mogą być elementem reakcji obronnych roślin na działanie wirusowych lub bakteryjnych patogenów. Sugeruje się, że PCD może być zahamowana przez inhibicję aktywności VPE (Patrzyłtas i in., 2014).

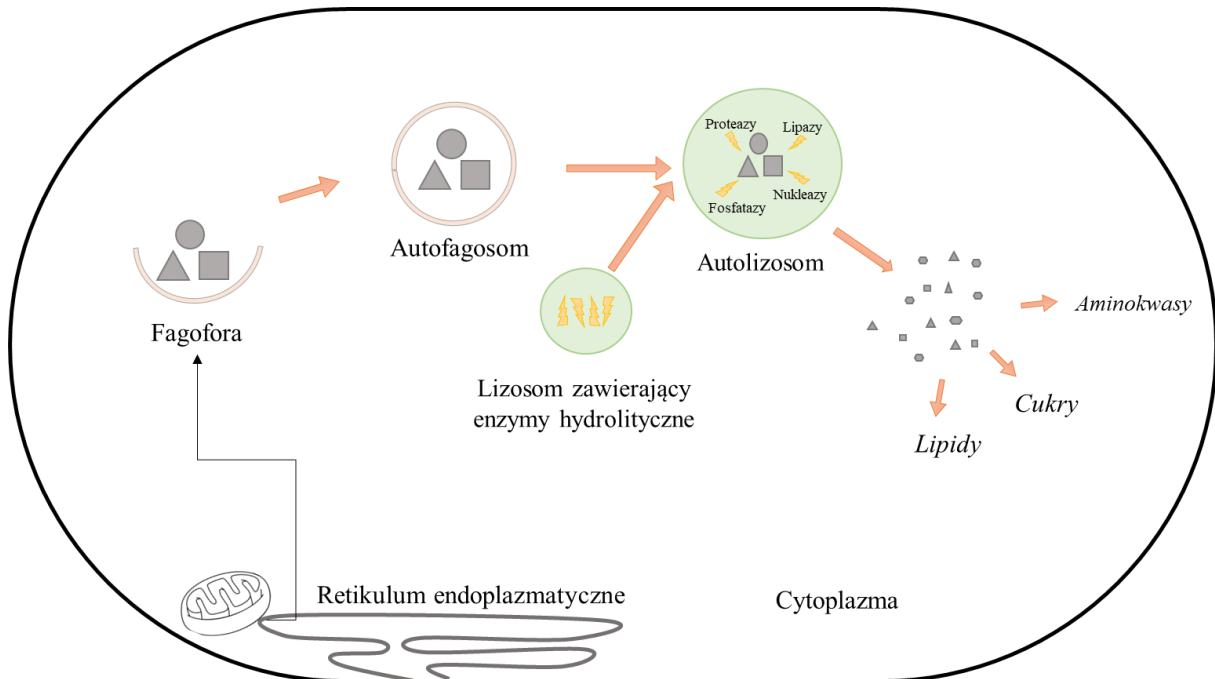
Przebieg makroautofagii u zwierząt

Makroautofagia w komórkach zwierząt (Ryc. 3) zaczyna się od powstania fagofory i jej transformacji w autofagosom zawierający przeznaczony do degradacji ładunek. Podobnie jak u roślin, w komórkach ssaków nie występuje PAS, a prawdopodobnym źródłem błony dla formującej się fagofory jest rejon kontaktu retikulum endoplazmatycznego i mitochondrium (Mizushima, 2018). Dojrzały autofagosom u zwierząt łączy się z lizosomem, co prowadzi do powstania autolizosomu. Następnie ładunek wewnątrz autolizosomu zostaje zdegradowany wskutek działania lizosomalnych enzymów hydrolitycznych. U zwierząt odpowiednikiem grzybowego i roślinnego białka Atg8 jest białko LC3 (ang. *Light Chain 3*) i występuje w dwóch postaciach: LC3-I i LC3-II (Borek i in., 2015; Mizushima, 2018).

W komórkach ssaków występuje proces nazywany autofagią zależną od chaperonów (CMA; ang. *Chaperone-Mediated Autophagy*). CMA jest rodzajem selektywnej degradacji białek, podczas którego nie powstaje autofagosom, ani nie odbywa się inwaginacja błony lizosomu, lecz przeznaczone do degradacji białka transportowane są bezpośrednio do wnętrza lizosomu. W przebiegu CMA nie uczestniczą białka Atg, lecz kluczowymi elementami są tzw. białka opiekuńcze, czyli chaperony (Mizushima, 2018).



Ryc. 2. Schemat przebiegu makroautofagii w komórkach roślin. VPE γ – izoforma γ wakuolarnego enzymu procesującego, prawdopodobnie uczestniczącego w degradacji ciała autofagowego u roślin (na podstawie Borek i in., 2015 i Stefaniak i in., 2020)



Ryc. 3. Schemat przebiegu makroautofagii w komórkach zwierząt (na podstawie Borek i in., 2015 i Stefaniak i in., 2020)

Rola autofagii w ontogenezie i w odpowiedzi organizmu na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe

Komórki eukariotyczne często doświadczają niestabilnych warunków wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych, takich jak np. zmiany w dostępności składników odżywczych, temperatury, nasłonecznienia, czy interakcji z innymi organizmami, które po przekroczeniu pewnego limitu stają się czynnikami stresowymi dla komórki. Spośród wielu procesów w komórce, autofagia jest jednym z kluczowych komponentów odpowiedzi na różne abiotyczne i biotyczne czynniki stresowe. Jednakże, udział procesów autofagicznych w reakcjach na czynniki stresowe różni się u drożdży, roślin i zwierząt.

Drożdże

Składniki odżywcze, najczęściej aminokwasy lub inne źródła azotu, są kluczowe dla przeżycia i regulacji procesów metabolicznych w komórkach drożdży (*Saccharomyces* spp.). W warunkach niedoboru składników odżywczych nasileniu ulega autofagia i w ten sposób możliwe jest pozyskiwanie składników niezbędnych do podtrzymania podstawowych procesów metabolicznych, takich jak np. oddychanie, umożliwiających przeżycie komórki w niesprzyjających warunkach troficznych. Głównym regulatorem autofagii u drożdży jest kompleks białkowy, w skład którego wchodzi enzym (kinaza), zwany celem rapamicyny (TOR; ang. *Target of Rapamycin*). W warunkach niedoboru azotu aktywność TOR jest hamowana, i tym samym staje się możliwa stymulacja autofagii (Xie i Klionsky, 2007). Produkty powstające wskutek autotrawienia mogą także być wykorzys-

tywane jako substraty oddechowe podczas stresu energetycznego dla syntezy ATP (Lei i in., 2022). Do abiotycznych czynników stresowych, które mogą nasilać autofagię u drożdży zaliczyć można również wysoki poziom niektórych pierwiastków chemicznych. Na przykład duże ilości cynku lub żelaza mogą powodować u drożdży akumulację reaktywnych form tlenu (ROS; ang. *Reactive Oxygen Species*), które są bardzo aktywnymi cząsteczkami mogącymi uszkodzić różne komponenty komórki, prowadząc nawet do jej śmierci. Zaobserwowano u drożdży, że wzrost poziomu ROS powoduje intensyfikację autofagii (Lei i in., 2022).

Jedną z odmian selektywnej autofagii, bardzo dobrze opisaną u drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) jest nukleofagia. Nukleofagia jest to rodzaj autofagii, podczas którego degradacji ulegają uszkodzone lub nieużywane części jądra komórkowego, a czasami nawet całe jądra. U drożdży zachodzi ona na trzy różne sposoby w zależności od natury ładunku i mechanizmu jego dostarczania do wakuoli. Fragmentaryczna mikroautofagia jądra (PMN; ang. *Piecemeal Microautophagy of the Nucleus*) jest inicjowana przez połączenie błon jądra komórkowego i wakuoli poprzez interakcje pomiędzy tonoplastowym komponentem Vac8 i elementem otoczki jądrowej – Nvj1. Poprzez inwaginację tonoplastu, w którym znajdzie się fragment otoczki jądrowej i pewna część nukleoplazmy, wewnątrz wakuoli powstaje pęcherzyk składający się z trzech błon (tonoplast i dwie błony otoczki jądrowej) i porcji nukleoplazmy. W kolejnym etapie PMN jądro komórkowe i wakuola oddzielają się, a zawartość pęcherzyka wewnątrz wakuoli ulega degradacji. Ten sposób

umożliwia dostarczenie do wakuoli takich składników jądra, które są odseparowane przez otoczkę jądrową, a w pewnych stadiach rozwojowych nie są potrzebne. Inną odmianą nukleofagii jest tzw. nukleofagia późna. Ten rodzaj nukleofagii zachodzi u *Saccharomyces cerevisiae* podczas wydłużonego głodu azotowego (20–24 godzin). W przeciwieństwie do PMN, nukleofagia późna zachodzi bez udziału Vac8 i Nvj1, czyli bez interakcji tonoplastu i otoczki jądrowej. U *Saccharomyces cerevisiae* może też zachodzić programowana destrukcja jądra (PND; ang. *Programmed Nuclear Destructuin*). Ta odmiana nukleofagii zachodzi w komórkach, które wskutek głodu azotowego wytwarzają spory. Diploidalne komórki drożdży w warunkach stresu mogą uruchomić proces sporulacji, wytwarzając cztery spory, a ich powstanie poprzedzone jest wytworzeniem czterech jąder na drodze mejozy. Natomiast w pewnych warunkach suboptymalnego odżywienia węglowego powstają tylko dwie spory, a dwa pozostałe jądra ulegają degradacji wskutek pęknięcia tonoplastu i uwolnienia do cytoplazmy litycznej zawartości wakuoli. Ten sposób autofagicznej degradacji nie jest specyficzny dla jąder komórkowych, lecz jest to proces podobny do roślinnej megaautofagii (Mijaljica i in., 2013).

Rośliny

Autofagia u roślin jest elementem składowym procesów zachodzących w komórkach dla utrzymania homeostazy na każdym etapie ontogenezy, począwszy od embriogenezy, aż do śmierci organizmu. Podczas embriogenezy, dojrzewania i kiełkowania nasion, różnicowania ksylemu, rozwoju korzeni, czy starzenia się, autofagia jest procesem regulującym dostarczanie skład-

ników odżywczych do komórki lub też procesem prowadzącym do śmierci komórki roślinnej. Stężenie pierwiastków chemicznych regulujących procesy rozwoju rośliny, takich jak żelazo, cynk lub mangan jest decydujące podczas wzrostu rośliny. Translokacja wyżej wymienionych pierwiastków niezbędnych do wzrostu i dojrzewania nasion, między innymi, jest oparta również na prawidłowej regulacji autofagii (Su i in., 2020). Podczas różnych stadiów wzrostu i rozwoju organizmu roślinnego, komórki, tkanki lub części organów są degradowane wskutek PCD. Dla przykładu, podczas dojrzewania nasion u okrytonasiennych, VPE δ uczestniczy w PCD podczas regulowania grubości warstw komórkowych, co pozwala na formowanie okrywy nasiennej. Badania na nasionach jęczmienia wykazały, że autofagia uczestniczy w degradacji tkanek załączka, a zwłaszcza jądra woreczka załączkowego, wpływając tym samym na rozmiar nasion. VPE δ uczestniczy także w degradacji wewnętrznych warstw okrywy nasiennej u *Arabidopsis thaliana* (Vorster i in., 2019).

Autofagia jest komponentem naturalnej odporności organizmu roślinnego na patogeny wirusowe, grzybowe i bakteryjne. Roślinnym mechanizmem obronny przed atakiem patogenów są reakcje nadwrażliwości (HR), które są ściśle związane z roślinną PCD. W tym przypadku, autofagia ogranicza rozprzestrzenianie PCD do obszaru zainfekowanego. W ten sposób destrukcji ulegają wyłącznie komórki zainfekowane. Umożliwia to ograniczenie rozprzestrzeniania się obumierania komórek w tkance. Wiadomo, że regulacja HR jest związana z poziomem ekspresji genów *ATG*. Podczas wyciszenia genu *Beclin1*, ortologa genu *ATG6* w komórkach tytoniu, doszło do ograniczenia autofagii i niekontrolowanego rozprzestrzenienia HR pod wpływem infekcji wirusem mozaiki tytoniu (TMV; Patrzylas i in. 2014).

Autofagia odgrywa również ważną rolę w tolerancji roślin na stres solny i osmotyczny. Stres abiotyczny może nasilać ekspresję proteaz cysteinowych, które w warunkach normalnego wzrostu i rozwoju nie są aktywne. Badania nad brodawkami korzeniowymi soi w warunkach suszy wykazały zwiększoną ekspresję genów kodujących proteazy cysteinowe C1 (papaino-podobna) i C13 (VPE-podobna), potwierdzając że VPE uczestniczą w odpowiedzi na stres abiotyczny (Vorster i in. 2019). Także badania na *Arabidopsis thaliana* z obniżoną ekspresją VPE wykazały zmniejszony poziom aktywności proteazy cysteinowej C1 oraz wyższą biomasę i poziom białka w warunkach suszy. W komórkach *Arabidopsis thaliana* niedobór składników odżywczych oraz stres solny prowadzą do indukcji autofagii w sposób zależny od błonowej oksydazy NADPH za pośrednictwem ROS, podczas gdy stres osmotyczny wydaje się stymulować autofagię inną drogą, niekoniecznie zależną od wolnych rodników jako cząsteczek sygnałowych (Patrzyłs i in., 2014).

Stres oksydacyjny jest jedną z reakcji na abiotyczne i biotyczne czynniki stresowe. Podczas reakcji na stres oksydacyjny, utlenione lub uszkodzone elementy komórki są dostarczane do wakuoli i degradowane. Nadmierne uszkodzenia spowodowane utlenieniem komponentów komórki roślinnej są jedną z przyczyn degradacji peroksy-somów. Są to bardzo dynamiczne struktury – ich liczba i intensywność zachodzących w nich reakcjach zależą od zmieniających się czynników środowiska wewnątrz- i zewnątrz-komórkowego. W komórkach roślinnych peroksy-somy są jednym z głównych źródeł ROS. Przykładem może być generowane w peroksy-somach H_2O_2 , który rozkładany jest przez peroksy-somalną katalazę. Niemniej jednak wysoka produkcja ROS prowadzi do uszkodzenia białek peroksy-somalnych, a tym samym do nieprawid-

łowego funkcjonowania tych organelli. Takie uszkodzone peroksy-somy muszą być usunięte z komórki i są one wtedy degradowane na drodze peksofagii, czyli autofagicznej degradacji peroksy-somów (Borek i in., 2019). Uważa się, że peksofagia występuje z większą intensywnością niż selektywna autofagia innych organelli, o czym świadczy wyższa akumulacja białek peroksy-somalnych w porównaniu do białek innych organelli, takich jak aparat Golgiego, retikulum endoplazmatyczne, mitochondria, czy chloroplasty, u mutantu *Arabidopsis thaliana* (*atg5*) z obniżonym poziomem autofagii (Shibata i in., 2013, Yoshimoto i in., 2014).

Zwierzęta

Podobnie do komórek drożdży i roślin, komórki zwierzęce mogą kompensować deficyt energetyczny przez pozyskiwanie substratów oddechowych na drodze autofagii. Do zwierzęcych czynników regulujących autofagię zaliczyć można kinazy aktywowane przez AMP (AMPK; ang. 5' Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase). Są to kinazy odpowiedzialne za kontrolę przemian energetycznych w komórce. Podczas głodu energetycznego AMPK hamują procesy anaboliczne aktywując procesy kataboliczne, łącznie z autofagią. AMPK także mogą stymulować autofagię przez fosforylację białek związanych z autofagią, na przykład ULK1 lub PIK3, lub bezpośrednio białka Atg. Spośród białek, które są fosforylowane przez AMPK jest kompleks mTOR (ang. *mammalian Target of Rapamycin*). W warunkach stresowych mTOR jest negatywnie regulowany, co pozwala na intensyfikację autofagii. Inaktywacja mTOR powoduje aktywację kaskady sygnałowej prowadzącej do wytworzenia struktur autofagowych (Lei i in., 2022).

Badania potwierdzają, że zaburzenia na różnych etapach autofagii mogą przyczynić do poważnych dysfunkcji organizmu zwierzęcego, w tym człowieka (Tab. 1). Na przykład, procesy starzenia się organizmu są ściśle powiązane ze zmniejszeniem zdolności do odpowiedzi na środowiskowe czynniki stresowe i skutkują zaburzeniem homeostazy. Początek starzenia się często związany jest z obniżeniem intensywności makroautofagii, prowadząc do spowolnienia formowania autofagosomu, a tym samym do wzrostu nagromadzenia zbędnych komponentów komórki. Badania przeprowadzone na różnych organizmach modelowych, wykorzystując metadane i metody analizy statystycznej, umożliwiają naukowcom identyfikowanie genów uczestniczących w autofagii u zwierząt i ich związek z przebiegiem chorób u człowieka. Jednym z powszechnie wykorzystywanych zwierzęcych organizmów modelowych jest nicień *Caenorhabditis elegans*. Badania procesów starzenia się wykazały, że zaburzenie szlaku IGF-1 zwiększa czas życia *Caenorhabditis elegans* (Cheng i in., 2005). W szlaku IGF-1 uczestniczą stymulatory mTOR, który jak już wspomniano, jest negatywnym regulatorem autofagii. Innym organizmem modelowym są myszy. Badania na transgenicznym myszach z delecją lub wyciszeniem wybranych genów *Atg* wykazały związek pomiędzy zaburzeniem w przebiegu autofagii i powstaniem różnych chorób, m. in. powstanie nowotworów, chorób neurodegeneracyjnych, czy zaburzeń szlaków metabolicznych (Saha i in., 2018).

Autofagia odgrywa podwójną rolę w powstawaniu i rozwoju nowotworów. Z jednej strony, czynniki wzrostu mogą być degradowane w komórce w procesie autofagii, przyczyniając się do nieprawidłowego różnicowania w komórki nowotworowe (Yun i Lee, 2018). Na przykład podczas przejścia epithelialnomezenchymal-

nego (EMT; ang. *Epithelial-Mesenchymal Transition*) – procesu, w którym komórka epithelialna traci polaryzację oraz połączenia między-komórkowe, a zyskuje zdolność do migracji i inwazyjności stając się komórką mezenchymalną. Z drugiej strony, w komórkach nowotworowych autofagia może być elementem mechanizmu chroniącego je przed działaniem leków przeciwnowotworowych (Yun i Lee, 2018). Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym o własnościach supresora nowotworowego i jest białkiem łączącym autofagię z kancerogenezą, ponieważ mutacje w genie kodującym p53 mogą prowadzić do rozwoju raka, a zwłaszcza zaburzają szlak mTOR. Białko spustowe autofagii, Beclin1, także jest supresorem nowotworowym. Badania wskazują że receptor EGF (ang. *Epidermal Growth Factor*) wiążąc z Beclin1 powoduje obniżenie intensywności autofagii, a zatem pozwala na przeżycie komórkom nowotworowym (Cordani i in., 2017).

Cukrzyca typu 2 i otyłość są jednymi z najbardziej rozpowszechnionych problemów zdrowotnych człowieka. Cukrzyca typu 2 to najczęściej występujący na świecie typ cukrzycy. Przyczyny cukrzycy mają zarówno podłoże genetyczne, jak i środowiskowe. Różne czynniki genetyczne przyczyniają się do m.in. upośledzenia wydzielania insuliny, czy wzrostu ilości adipocytów (komórek tłuszczowych). Zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe, na przykład otyłość, mogą przyczyniać się do powstania oporności na działanie insuliny. Wzrost ilości adipocytów i oporność na działanie insuliny głównie jest powiązany z zaburzeniem działalności mitochondriów, a zwłaszcza beta-oksydacji kwasów tłuszczowych, co prowadzi do nagromadzenia tłuszczu, nasilenia stresu oksydacyjnego i uszkodzenia mitochondrium. W tym przypadku autofagia, a szczególnie mitofagia, czyli autofagiczna degradacja mitochondriów, odgrywa ważną rolę

w ograniczeniu nagromadzenia komórek tłuszczowych i chroni organizm przed nabyciem oporności na insulinę (Saha i in., 2018). Autofagia także zapobiega nagromadzeniu uszkodzonych mitochondriów (Yang i in., 2010; Borek i in., 2015). Nagromadzenie nieprawidłowo sfałdowanych białek w retikulum endoplazmatycznym prowadzi do stresu ER, który stymuluje łańcuch odpowiedzi adaptacyjnych nazywany odpowiedzią na niesfałdowane białka (UPR; ang. *Unfolded Protein Response*). UPR komórek beta trzustki jest regulowana przez autofagię. Badania wykazały, że komórki trzustki, w których potwierdzono obniżenie efektywności autofagii, są bardziej narażone na stres ER i progresję cukrzycy. Na przykład, zahamowanie ekspresji genu *Atg7* u myszy z otyłością wykazały wzrost stresu ER i zaburzenie w szlaku sygnałowym insuliny. Podczas normalizowania ekspresji *Atg7*, stres ER był minimalny i efekt insuliny był wzmocniony (Quan i in., 2012).

Choroba Parkinsona jest drugą po chorobie Alzheimera najbardziej rozpowszechnianą chorobą neurodegeneracyjną. Choroba Parkinsona jest zwyrodnieniem struktur mózgu o nieznanym przyczynie. Jej istotą jest zanik tzw. komórek dopaminergicznych znajdujących się w mózgu, co powoduje objawy, takie jak spowolnienie ruchowe, sztywność mięśni, drżenie spoczynkowe, zaburzenia chodu i postawy. Choroba Parkinsona rozwija się wraz z zanikiem neuronów dopaminergicznych, co powoduje agregacje białek tau i α -synukleiny (Fahn, 2003). Wyniki badań sugerują, że agregacja α -synukleiny i tau jest konsekwencją upośledzonej degradacji autofagiczno-lizosomalnej. Wykazano również, że synukleina i tau wpływają na funkcjonowanie mitochondriów i lizosomów oraz przebieg autofagii. Z kolei nagromadzenie uszkodzonych mitochondriów powoduje wzrost poziomu reaktywnych form tlenu, które mogą uszkodzić sąsiednie,

nieuszkodzone mitochondria, i w ten sposób przyspieszać postęp choroby (Hou i in., 2020).

Uszkodzenie mitochondriów i zaburzenie w procesie mitofagii odgrywa kluczową rolę również w chorobach wątroby. Alkohol jest najczęstszą przyczyną chorób wątroby w krajach rozwiniętych i powoduje alkoholową chorobę wątroby (ALD; ang. *Alcoholic Liver Disease*). Alkoholowe uszkodzenie wątroby rozwija się w wyniku nadużywania alkoholu etylowego. Ponieważ wątroba jest głównym miejscem metabolizmu alkoholu etylowego, jej uszkodzenie jest zwykle najbardziej widoczne w obrazie klinicznym. Etanol obniża poziom fosforylacji oksydacyjnej, co prowadzi do nagromadzenia ROS. Stres oksydacyjny z kolei może prowadzić do degradacji DNA mitochondrialnego (mtDNA). Badania na szczurach wykazały, że nawet jedna dawka alkoholu etylowego (5 g na kg masy ciała) może wywołać degradację mtDNA (Mansouri i in., 1999). Mitofagia odgrywa ochronną rolę podczas konsumpcji alkoholu, prowadząc do degradacji uszkodzonych mitochondriów, przy czym ilość spożytego alkoholu uwarunkowuje poziom zaburzenia mitofagii. Myszy z ostrym upojeniem alkoholowym wykazały podwyższony poziom mitofagii. Natomiast, hepatocyty myszy w warunkach chronicznej konsumpcji alkoholu wykazały podwyższony poziom akumulacji uszkodzonych mitochondriów, co świadczy o zaburzeniu mitofagii (Lemasters i Zhong, 2018). Przy konsumpcji tolerowanych przez organizm ilości alkoholu, autofagia nasila się i może być regulowana przez szlaki PINK/Parkin lub BNIP3. Ograniczona mitofagia prowadzi do wystąpienia struktur molekularnych związanych z uszkodzeniem mitochondriów (mtDAMPs; ang. *Mitochondrial damage-associated molecular patterns*), które wywołują odpowiedzi zapalne komórek prowadząc do postępu ALD (Ma i in., 2020).

Gen *EPG5* koduje białko zaangażowane w powstanie autolizosomów. Recesywne mutacje genu *epg5*, odgrywają kluczową rolę w zespole Vicięgo. Jest to bardzo rzadka i ciężka wrodzona wieloukładowa choroba charakteryzująca się głównymi cechami agenezji ciała modzelowatego, zaćmy, hipopigmentacji oczno-skinnej, kardiomiopatii i skojarzonego niedoboru odporności (Jiang i Mizushima, 2014). Wyciszenie *epg5* w komórkach myszy doprowadziło do zaburzenia w procesie autofagii, a zwłaszcza do degeneracji neuronów i powstania agregatów w różnych częściach mózgu. Jednakże, zważywszy na fakt, że *EPG5* także uczestniczy w endocytozie, bardzo ważne jest zweryfikowanie znaczenia zaburzenia endocytozy w patogenezie zespołu Vicięgo, ponieważ badania na myszach z wyci-

szeniem *epg5* wykazały tylko częściowe objawy zespołu Vicięgo (Zhao i in., 2013).

Badania transkryptomu i proteomu różnych tkanek człowieka, wykazały, że białka koronawirusa SARS-CoV-2 zaburzają procesy autofagii komórki gospodarza (Stukalov i in., 2021). Co więcej, funkcjonalna analiza białek SARS-CoV-2 wykazała że białka ORF3a i ORF7a zaburzają przebieg autofagii na drodze dwóch różnych mechanizmów: ORF3a spowalnia łączenie autofagosomu z lizosomem i przerywa utworzenie autolizosomów, z kolei ORF7a destabilizuje środowisko wewnątrz lizosomu, zaburzając prawidłowe pH. ORF3a i ORF7a spowalniają późne kroki autofagii, które są najtrudniejszymi do zbadania (Lei i Klionsky, 2021).

Tab. 1. Przykłady zaburzeń na różnych etapach autofagii i wywołane choroby u człowieka

Białko lub <i>gen</i>	Rola w autofagii	Etap życia lub choroby u człowieka	Referencje
IGF-1	Obniżenie poziomu makroautofagii	Starzenie się	Saha i in., 2018
PTEN, mTORC1, Beclin1	Inicjacja autofagii	Powstanie nowotworów	Wen X i in., 2013
UPR	Stres ER	Progresja cukrzycy	Quan i in., 2012
PARK2/Parkin, PARK6/PINK1	Zaburzenie przebiegu mitofagii	Mutacje powodujące chorobę Parkinsona o wczesnym początku lub autosomalną recesywną	Trinh i in., 2013
PARK1/Parkin, BNIP3	Zaburzenie przebiegu mitofagii	Zaburzenie szlaków sygnalizacyjnych powoduje alkoholową chorobę wątroby	Ma i in., 2020
<i>EPG5</i>	Powstanie i/lub degradacja autolizosomu	Recesywne mutacje powiązane z powstaniem zespołu Vicięgo	Jiang i Mizushima, 2014
IRGM	Degradacja autofagosomu	Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP) powiązane z podwyższonym ryzykiem powstania choroby Crohna	Parkes i in., 2007
ORF3a i ORF7a	Inhibicja fuzji autofagosomu z lizosomem; zaburzenie pH lizosomu	COVID-19	Lei i Klionsky, 2021

Podsumowanie

Autofagia umożliwia nie tylko przeżycie komórki w warunkach głodu węglowego czy azotowego, ale jest też niezwykle istotnym procesem biorącym udział w obrocie metabolicznym, w utrzymaniu homeostazy komórki, czy też w reakcjach obronnych. Prawidłowa regulacja autofagii umożliwia podtrzymywanie podstawowych procesów metabolicznych i przeżycie komórki. Natomiast, komórki z ograniczoną zdolnością do autofagii są kierowane na drogę śmierci komórki z uwagi na brak możliwości rozkładu uszkodzonych białek i innych wewnątrzkomórkowych składników, jak również niemożność dostarczenia energii niezbędnej do podtrzymania podstawowych życiowych funkcji. O ile ogólny schemat przebiegu autofagicznej degradacji poszczególnych organelli komórkowych, kompleksów białkowych czy makromolekuł jest już w miarę dobrze poznany, niektóre aspekty autofagii pozostają nadal niewyjaśnione. Przykładem może tutaj być nie do końca poznany etap kształtowania się fagofory i mechanizmów indukujących pojawianie się tej struktury. Również nie do końca poznana jest funkcja poszczególnych białek związanych z autofagią. Wiele do odkrycia i zrozumienia pozostaje też w odniesieniu do końcowych etapów zachodzących w wakuoli, czyli degradacji ciał autofagowych. Biorąc pod uwagę liczne funkcje autofagii, ostateczne wyjaśnienie znaczenia tego procesu jako mechanizmu podtrzymującego przeżycie w warunkach stresowych, czy raczej przyczyniającego się do śmierci komórki wymaga niewątpliwie dalszych badań.

Podziękowania

Artykuł powstał w ramach tutoringu prowadzonego na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu i projektu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza”, BESTStudentGRANT nr 010/39/UAM/0004, realizowanego w latach 2021–2023.

Literatura:

- Borek, S., Paluch-Lubawa, E., Ruta-Piosik, M., Pietrowska-Borek, M., 2015. Selektywne rodzaje autofagii. *Postępy Biologii Komórki*, 42, 505–538.
- Borek, S., Stefaniak, S., Śliwiński, J., Garnczarska, M., Pietrowska-Borek, M., 2019. Autophagic Machinery of Plant Peroxisomes. *International Journal of Molecular Sciences*, 25, 4754.
- Cheng, C., L., Gao, T., Q., Wang Z., Li, D.D., 2005. Role of insulin/insulin-like growth factor 1 signaling pathway in longevity. *World Journal of Gastroenterology*, 11, 1891–1895.
- Cordani, M., Butera, G., Pacchiana, R., Donadelli, M., 2017. Molecular interplay between mutant p53 proteins and autophagy in cancer cells, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1867, 19–28.
- Fahn, S, 2003. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 991, 1–14.
- Hou, X., Watzlawik J., O., Fiesel, F., C., Springer, W., 2020. Autophagy in Parkinson's Disease. *Journal of Molecular Biology*, 432, 2651–2672.
- Jiang, P., Mizushima, N., 2014. Autophagy and human diseases. *Cell Research*, 24, 69–79.
- Lei, Y., Huang, Y., Wen, X., Yin, Z., Zhang, Z., Klionsky, D.J., 2022. How cells deal with the fluctuating environment: Autophagy

- regulation under stress in yeast and mammalian systems. *Antioxidants*, 11, 304.
- Lei, Y., Klionsky, D.J., 2021 The Emerging Roles of Autophagy in Human Diseases. *Biomedicines*, 9, 1651.
- Lemasters, J., J., Zhong, Z., 2018. Mitophagy in hepatocytes: Types, initiators and role in adaptive ethanol metabolism. *Liver Research*, 2, 125–132.
- Li, W., He, P., Huang, Y., Li, Y. F., Lu, J., Li, M., Kurihara, H., Luo, Z., Meng, T., Onishi, M., Ma, C., Jiang, L., Hu, Y., Gong, Q., Zhu, D., Xu, Y., Liu, R., Liu, L., Yi, C., Zhu, Y., Feng, D., 2021. Selective autophagy of intracellular organelles: recent research advances. *Theranostics*, 11, 222–256.
- Ma, X., McKeen, T., Zhang, J., Ding, W.-X., 2020. Role and Mechanisms of Mitophagy in Liver Diseases. *Cells*, 9, 837.
- Mansouri, A., Gaou, I., De Kerguenec, C., Amsellem, S., Haouzi, D., Berson, A., Moreauz, A., Feldmannz, G., Lettéron, P., Pessayre, D., 1999. An alcoholic binge causes massive degradation of hepatic mitochondrial DNA in mice. *Gastroenterology*, 117, 181–190.
- Mijaljica, D., Devenish, R., J., 2013. Nucleophagy at a glance. *Journal of Cell Science*, 126, 4325–4330.
- Mizushima, N., 2018. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nature Cell Biology*, 20, 521–527.
- Morishita, H., Mizushima, N., 2019. Diverse cellular roles of autophagy. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1, 35.
- Orzechowski, A., 2017. Autofagia, czyli wielkie sprzątanie. *Kosmos*, 2, 153–166.
- Parkes, M., Barrett, J., C., Prescott, N., J., i in., 2007. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nature Genetics*, 39, 830–832.
- Patrzylas, P., Seta-Koselska, A., Betlej, A., Spaczyński, M., Skórzyńska-Polit, E., 2014. Autofagia u roślin w warunkach stresu. *Postępy biologii komórki*, 41, 445–462.
- Quan, W., Hur, K.Y., Lim, Y., Oh, S.H., Lee, J.C., Kim, K.H., 2012. Autophagy deficiency in beta cells leads to compromised unfolded protein response and progression from obesity to diabetes in mice. *Diabetologia*, 55, 392–403.
- Rojo, E., Zouhar, J., Carter, C., Kovaleva, V., Raikhel, N., V., 2003. A unique mechanism for protein processing and degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 7389–7394.
- Saha, S., Panigrahi, D. P., Patil, S., Bhutia, S. K., 2018. Autophagy in health and disease: a comprehensive review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 104, 485–495.
- Shibata, M., Oikawa, K., Yoshimoto, K., Kondo, M., Mano, S., Yamada, K., Hayashi, M., Sakamoto, W., Ohsumi, Y., Nishimura, M., 2013. Highly oxidized peroxisomes are selectively degraded via autophagy in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25, 4967–4983.
- Stefaniak, S., Wojtyła, Ł., Pietrowska-Borek, M., Borek, S., 2020. Completing autophagy: Formation and degradation of the autophagic body and metabolite salvage in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 2205.
- Stukalov, A., Girault, V., Grass, V., Karayel, O., Bergant, V., Urban, C., Haas, D.A., Huang, Y., Oubraham, L., Wang, A., 2021. Multilevel proteomics reveals host perturbations by SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Nature*, 594, 246–252.
- Su, T., Li, X., Yang, M., Shao, Q., Zhao, Y., Ma, C., Wang, P., 2020. Autophagy: An intracellular degradation pathway regulating plant survival and stress response. *Frontiers in Plant Science*, 11, 164.

- Teper-Bamnolker, P., Danieli, R., Peled-Zehavi, H., Belausov, E., Abu-Abied, M., Avin-Wittenberg, T., Sadot, E., Eshela, D., 2019. Vacuolar processing enzyme translocates to the vacuole through the 3 autophagy pathway to induce programmed cell death. *New Results*, 3109–3123.
- Trinh, J., Farrer, M., 2013. Advances in the genetics of Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*, 9, 445–454.
- Vorster, B., J., Cullis, C., A., Kunert, K., J., 2019. Plant vacuolar processing enzymes. *Frontiers in Plant Science*, 10, 479.
- Wen, X., Wu, J., Wang, F., Liu, B., Huang, C., Wei, Y., 2013. Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 402–410.
- Xie, Z., Klionsky, D., J., 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, 9, 1102–1109.
- 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 Metabolism*, 11, 467–478.
- Yoshimoto, K., Shibata, M., Kondo, M., Oikawa, K., Sato, M., Toyooka, K., Shirasu, K., Nishimura, M., Ohsumi, Y., 2014 Organ-specific quality control of plant peroxisomes is mediated by autophagy. *Journal of Cell Science*, 127, 1161–1168.
- Yun, C., W., Lee, S., H., 2018. The roles of autophagy in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 3466.
- Zhao, Y., G., Zhao, H., Sun, H., Zhang, H., 2013. Role of *Epg5* in selective neurodegeneration and Vici syndrome. *Autophagy*, 9, 1258–1262.

Notka o autorce:

Jestem studentką trzeciego roku studiów licencjackich na kierunku biotechnologia Wydziału Biologii UAM w Poznaniu. Moje zainteresowania dotyczą biologii komórki i biologii molekularnej. Głównie jestem pasjonatką podłoża molekularnego procesów życiowych i interesuję się inżynierią genetyczną i tkankową.