

Poti razgradnje celičnih sestavin Degradation pathways of cell ingredients

Peter Veranič*, Majda Pšeničnik**

Ključne besede
lizosomi
avtofagocitoza
lizosomi, shranjevalne motnje

Key words
lysosomes
autophagocytosis
lysosomal storage diseases

Izleček. Razgradnja mnogih celičnih sestavin poteka v lizosomih. Ena od poti, po katerih vstopajo snovi v lizosome, je avtofagija. V tem procesu se manjši del citoplazme omeji od ostale celice z membrano (sekvestrirajoča membrana) in tako se oblikuje avtofagna vakuola oziroma avtofagosom. Vsebina avtofagosoma se razgradi po združitvi z lizosomom. Citosolne beljakovine, ki vsebujejo specifično signalno zaporedje, vstopajo v lizosome selektivno ob sodelovanju šapronov (Hsp 70). Krinofagija pa je pojav, pri katerem se vezikli z novo sintetiziranimi sekrecijskimi beljakovinami namesto s plazmalemo zlijejo z membrano lizosoma. Najpomembnejša selektivna razgradnja beljakovin poteka izven lizosomov v citosolu natančneje v beljakovinskih kompleksih imenovanih proteasomi. Pri tem sodeluje beljakovina ubikvitin, s katerim se označijo kratkožive citosolne in jedrne beljakovine. Produkti, ki nastajajo pri različnih oblikah razgradnje, se uporabijo za izgradnjo novih sestavin celice. Razgraditveni procesi tako sodelujejo pri ponovni uporabi snovi v celici.

Abstract. The degradation of cell ingredients takes place mainly in lysosomes. The most important and also the best known degradation pathway is autophagy, where a sequestering membrane separates a part of the cytoplasm so forming an autophagic vacuole. Degradation of the autophagic vacuole ingredients starts after the fusion of the autophagic vacuole with a lysosome. Some cytosolic proteins are introduced to a lysosome by a heat-shock protein (Hsp 70) in a process called carrier mediated proteolysis. Another pathway of lysosomal protein degradation is crinophagy where the secretory vesicles containing newly synthesised proteins fuse with the lysosomal membrane instead of fusing with the plasma membrane. Part of the proteolysis is localised in the cytosol and is known as nonlysosomal proteolysis. In this degradation, large protein complexes proteasomes and protein ubiquitin are involved. The degradation products are reused for the synthesis of new cell components. Thus degradation processes are involved in recycling of the cell ingredients.

Uvod

Množino beljakovin v celici določata tako hitrost izgradnje kot tudi hitrost razgradnje teh molekul. Oba procesa morata biti usklajena. Pospušena razgradnja beljakovin kaže na nepravilnosti v presnovi, ki so posledica stradanja, hipoksije ali staranja celice. V članku so navedeni načini razgradnje tistih beljakovin, ki nastajajo v sami celici, in sicer razgradnja v lizosomih in citosolna razgradnja.

Lizosomi so osrednje mesto razgradnje celičnih sestavin. V njih se razgrajujejo tako biološke makromolekule, ki so lastni proizvod celice, kar imenujemo avtofagija, kot tudi tiste, ki jih celica sprejme z endocitozo ali fagocitozo iz okolja. Razen tega v lizosome

*As. dr. Peter Veranič, dipl. biol., Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Lipičeva 2, 1000 Ljubljana.

**Doc. dr. Majda Pšeničnik, dipl. inž. kem., Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Lipičeva 2, 1000 Ljubljana.

selektivno prihajajo še citosolne in jedrne beljakovine označene s specifičnim zaporedjem aminokislin ob sodelovanju šapronov (9, 28). Večina citosolnih beljakovin pa se razgradi v posebnih beljakovinskih kompleksih, imenovanih proteasomi (12).

Avtofagija

Avtofagija označuje proces, pri katerem se del citoplazme najprej obda z membrano in se tako oddeli od ostale citoplazme (sekvestracija). Nato se nastala vakuola, ki vsebuje bodisi citosol ali citosol in organele, združi z lizosomom. Še vedno obstajajo deljena mnenja o tem, ali je avtofagija selektiven ali neselektiven proces (3, 11, 27, 28). Vprašanje je, ali se organeli, ki vstopijo v proces razgradnje, izbirajo naključno ali obstaja sistem za odbiranje izrabljenih oziroma v določenem obdobju nepotrebnih celičnih sestavin. Hitrost nastajanja avtofagosomov (AF) je odvisna predvsem od koncentracije aminokislin v celičnem okolju (14, 20). Avtofagijo se lahko pospeši z gojenjem celic v mediju brez aminokislin ali seruma. Nasprotno pa dodajanje aminokislin, predvsem triptofana in leucina v medij, močno zavre nastanek novih AF (10). Nekateri purini (3-metil-adenin) podobno kot aminokisliline zavirajo sekvestracijo citoplazme (27).

Nastajanje avtofagosomov

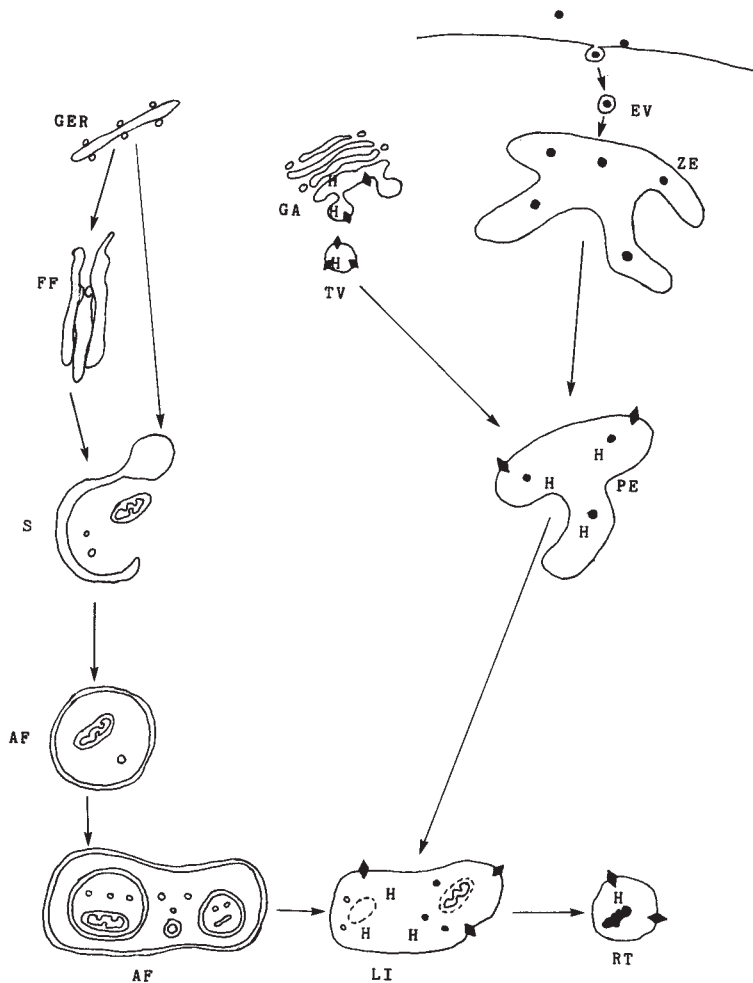
Začetne stopnje nastajanja avtofagosomov so najmanj poznane. Še vedno ni povsem jasen izvor membrane, ki oddeli vsebino avtofagosoma od okolice. Med raziskovalci avtofagije se je izoblikovalo dvoje mnenj. Nekateri trdijo, da sekvestrirajoča membrana izvira iz področja zrnatnega endoplazemskega retikuluma brez ribosomov (8). Drugi pa iščejo izvor omenjene membrane v posebnem organelu, imenovanem fagofor, ki ima obliko v svitek navitih membran in se pojavlja predvsem v celicah z intenzivno avtofagijo (26). Omejujoče membrane nekaterih avtofagnih vakuol vsebujejo beljakovine, značilne za granularni endoplazemski retikulum. To pomeni, da ta organel gotovo vsaj posredno sodeluje pri nastanku avtofagosomov (8).

Za sekvestracijo je potrebna energija v obliki ATP (21). Pri oblikovanju avtofagosoma aktivno sodeluje tudi citoskelet, predvsem aktinski mikrofilamenti in intermediarni filament. Znano je, da citohalazin D in faloidin, ki delujeta na mikrofilamente, preprečita nastanek novih avtofagnih vakuol (1). Za intermediarne filamente pa domnevajo, da sodelujejo pri usmerjanju beljakovin v avtofagosom (6).

Dozorevanje avtofagosoma

Z omejitvijo dela citoplazme (sekvestracija) nastane avtofagosom (28). Razgradnja vsebine avtofagosoma se prične po zlitju z lizosomom, ki lahko vsebuje poleg protonskih črpalk v membrani in številnih kislih hidrolaz, tudi endocitiran material. V tem primeru je nastal lizosom iz poznega endosoma (19). Prenašalni vezikli prenašajo hidrolaze in protonske črpalke iz *trans* Golgijevega mrežja do poznega endosoma, ki dozori v lizosom tedaj, ko vsebuje vse lizosomske encime (23). V kislem mediju poznih endosomov se lizosomski encimi ločijo od receptorjev (manoza-6-fosfatni receptor), ki se v prenašalnih veziklih vračajo v *trans* Golgijevo mrežje. Zaradi prisotnosti večjega števila protonskih

črpalke na membrani lizosoma, je pH-vrednost njegove vsebine nižja kot v poznem endosomu. Lizosomi, v katerih že poteka razgradnja, so oviti z enojno membrano, za razliko od zgodnejših stopenj AF, kjer je ovoj iz dveh ali več membran.

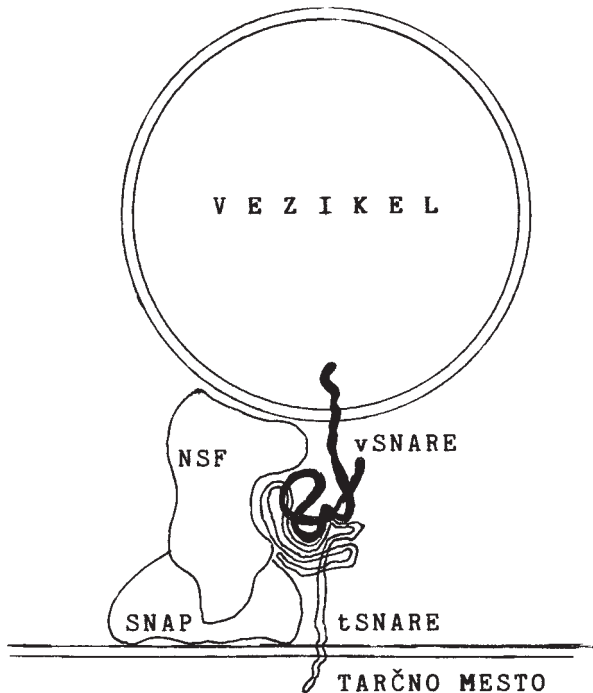


Slika 1. Nastanek in razvoj avtofagnih vakuol v hepatocitih sesalca. Avtofagosom (AF) nastane, ko sekvestrirajoča membrana (S), ki izvira iz endoplazemskega retikuluma (GER) ali fagoforja (FF), oddeli del citoplazme od ostale celice. Avtofagosomi se med seboj združujejo v večje vakuole (AF). Transportni vezikli (TV) prenesajo hidrolitične encime (H) in protonske črpalke (♦) iz Golgijevega aparata (GA) v pozni endosom (PE). PE se preimenuje v lizosom (LI) po sprejemu vseh potrebnih hidrolitičnih encimov. V lizosomu se združita avtofagna in endocitotska pot. Nerazgradljive snovi se kopičijo v rezidualnih telesih (RT). ZE – zgodnji endosom, EV – endocitotski vezikel.

Do združevanja med AF, endosomi in lizosomi prihaja na različnih stopnjah razvoja teh vakuol. Hitrost dozorevanja in stopnje, po katerih nastajajo avtofagne vakuole, so vrstno specifični in se razlikujejo med različnimi tipi celic (23). Na sliki 1 so podane najpomembnejše poti v procesu avtofagne razgradnje.

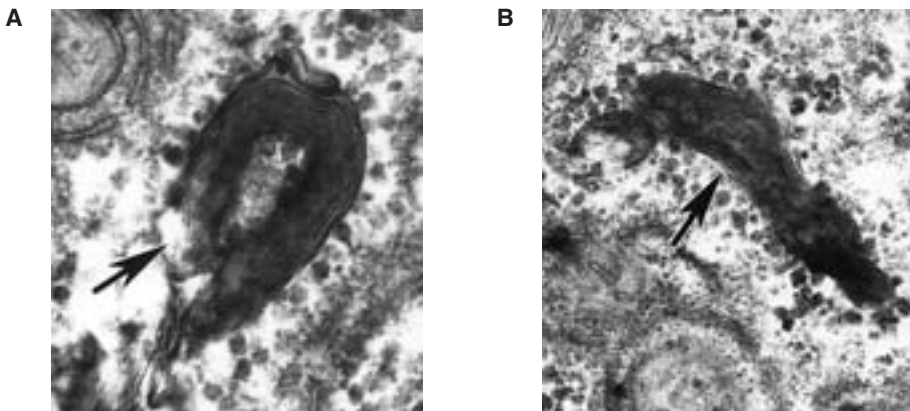
Pri zlivanju veziklov, ki prenašajo encime in protonske črpalke z večjimi vakuolami, vsebujočimi substrat za razgradnjo, je zelo pomembno, da se vezikel zlije s pravilno izbrano tarčno vakuolo. Nepravilna izbira bi porušila urejenost predelkov in onemogočila njihovo delovanje. Razlago molekularnega mehanizma zlivanja transportnih veziklov s tarčnimi membranami daje t. i. hipoteza SNARE (22). Pravilno izbiro tarčnih mest omogočajo beljakovine iz skupine SNARE ob sodelovanju beljakovin SNAP, NSF in Rab (slika 2). Beljakovine SNARE omogočijo vezavo vezikla na tarčno mesto. Na veziklih se nahajajo v-SNARE, na tarčnih membranah pa beljakovine t-SNARE. Do povezave pride le med ustreznimi seti beljakovin v- in t-SNARE (30). Vsak organel ima tudi svoj tip beljakovin Rab, ki nadzorujejo natančnost vezave beljakovin SNARE (18). Po vezavi ustreznih beljakovin v- in t-SNARE pride do zlitja obeh membran.

Združevanje vakuol med seboj omogočajo mikrotubuli, ki služijo kot tirnice, po katerih vakuole potujejo. Učinkovine, ki razgrajujejo ali stabilizirajo mikrotubule, preprečijo

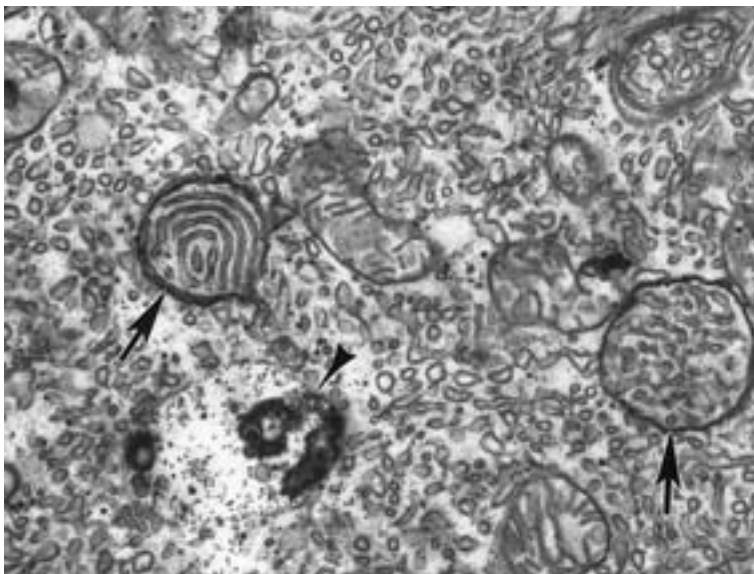


Slika 2. Pravilno izbiro in zlitje vezikla s tarčno membrano omogočata transmembranski beljakovini v-SNARE in t-SNARE ob sodelovanju citosolnih beljakovin NSF in SNAP.

združevanje AF z lizosomi (13). Podobne posledice ima tudi delovanje lizosomotropnih šibkih baz, ki se kopičijo v lizosomih in zvišujejo pH v njihovi notranjosti. Z inaktivacijo lizosomskih encimov se upočasnijo razgradnja vsebine AF in tako podaljša njegova življenjska doba (15, 31, 32). V normalnih pogojih je življenjska doba AF 5 do 10 minut,



Slika 3 a, b. Fagofor v hepatocitu. To je svitek membran, ki se pogosto pojavlja v celicah z intenzivno avtofagijo. Predstavlja naj bi izvor za sekvestrirajoče membrane. Njegova vloga v avtofagiji je še slabo poznana (↑). 21000-krat.



Slika 4. Avtofagna vakuola, ovita z dvema ali več membranami (↑). Vsebuje še nerazgrajene celične strukture; v našem primeru endoplazemski retikulum. Lizosom z močno razgrajenimi strukturami (∇). 20000-krat.

odvisno od vsebine, ki se razgrajuje (21). Gradbeni elementi makromolekul, ki se razgrajujejo znotraj lizosoma prehajajo skozi njegovo membrano in jih celica uporabi za izgradnjo novih struktur ali za energijo. Po zaključeni razgradnji ostanejo v lizosomu nerazgradljive snovi in hidrolitični encimi. Takšna vakuola se preimenuje v rezidualno telo (28).

Avtofagija je pomemben proces, ki se odvija v celici. Omogoča ponovno uporabo (recikliranje) snovi v celici in nadzoruje tudi celično rast ter množino organelov v njej. Ob pomanjkanju aminokislin se zaradi povečane avtofagije velikost celic zmanjša. Po določenem času lahko to zmanjševanje citoplazme privede do celične smrti (25). Poleg tega je avtofagija zelo pomemben dejavnik tudi v razvoju, ker sodeluje pri preoblikovanju tkiva med diferenciacijo. Pri neoplastnih celicah je avtofagija močno zmanjšana, zato so te celice manj občutljive na pomanjkanje aminokislin in seruma (25).

Selektivna lizosomska proteoliza

Znano je, da se pri celicah v kulturi ob pomanjkanju seruma podvoji proteolitična razgradnja dolgoživih beljakovin (2). Selektivno izbiranje določenih beljakovin omogoča KFERQ-zaporedje aminokislin. KFERQ je kratica za aminokislino K – lizin, F – fenilalanin, E – glutamat, R – arginin in Q – glutamin. To zaporedje prepozna lizosomski membranski receptor LGP96 (4). KFERQ-zaporedje vsebuje večina dolgoživih citosolnih beljakovin. Da lahko te beljakovine prodrejo skozi lizosomsko membrano, je potrebno sodelovanje molekularnih šapronov, v tem primeru je to beljakovina iz družine Hsp70, t. i. beljakovin vročinskega šoka (ang. *heat-shock*) (29).

Krinofagija

Krinofagija je proces, pri katerem se sekrecijska zrna zlivajo z lizosomi. V tako nastalih krinosomih se sekrecijske beljakovine razgradijo. Omenjeni proces je v nekaterih celicah dokaj pogost, saj se npr. v hepatocitih po tej poti razgradi tudi do 40 % novosintetiziranih serumskih beljakovin (20). Pomen takšne razgradnje novonastalih beljakovin še ni pojasnjen.

Citosolna razgradnja beljakovin

Večji del citosolne razgradnje beljakovin poteka v velikih beljakovinskih kompleksih, imenovanih proteasomi. Nahajajo se po celotni citoplazmi. Vsak proteasom je sestavljen iz številnih proteaz, ki oblikujejo centralni valj. Aktivni centri proteaz so usmerjeni v notranjost valja. Na začetku vsakega valja se nahaja velika, kompleksno zgrajena receptorska beljakovina, ki izbira beljakovine namenjene razgradnji, in jih vodi v notranjost proteasoma, kjer le-ta poteka. Beljakovine, ki so namenjene za razgradnjo v proteasomu, morajo biti označene. Kot označevalec služi majhna beljakovina ubikvitin, ki se kovalentno veže na lizinski preostanek beljakovine. Nato se še nadalje dodajajo ubikvitini, ki oblikujejo poliubikvitinsko verigo (12).

Nepravilnosti v razgradnji celičnih sestavin v lizosomih

Nepravilnosti v razgradnji, ki se pojavljajo kot posledica mutacije genov za lizosomske encime, so vzrok za več kot 30 različnih obolenj pri človeku. Znane so kot lizosomske

bolezni (angl. *lysosomal storage diseases*). V vseh primerih se zaradi pomanjkanja enega, več ali vseh lizosomskih encimov kopičijo nerazgrajene celične sestavine v celicah. To vodi do hudih bolezenskih oblik. Navajamo dva primera, in sicer Gaucherjevo bolezen in bolezen *I-cell*. Pri prvi se zaradi pomanjkanja encima glukocerebrozidaze, ki katalizira razgradnjo glukocerebrozidov na glukozo in ceramid, nerazgrajeni glikolipid kopiči v celicah. Posledica tega kopičenja je povečanje in pomnožitev lizosomov v celicah ter hkrati moteno delovanje posameznih celic in patološke spremembe na organih (5). Pri bolezni *I-cell* pa fibroblasti in makrofagi bolnikov ne vsebujejo encima, ki katalizira prvo stopnjo pri označevanju lizosomskih encimov z glukozo-6-fosfatom v *cis*-delu Golgijevega aparata. Lizosomski encimi se zato v *trans* Golgijevem mrežju ne ločijo od poti tistih beljakovin, ki potujejo iz celic s konstitutivno sekrecijo. V celicah se kopičijo velike vakuole z nerazgrajeno vsebino, ki bi jih sicer razgradili lizosomski encimi (17).

Pomen razgraditvenih procesov v celici

Z razgradnjo lastnih sestavin celica odstranjuje izrabljene ali nepotrebne makromolekule, obenem pa se oskrbi z gradbenimi elementi in energijo. V splošnem je rast celice odvisna od razmerja med izgradnjo in razgradnjo snovi v celici. Predvsem proces avtofagije omejuje preveliko rast celic. Hkrati je avtofagija potrebna pri preoblikovanju celic med diferenciacijo in pri odstranjevanju poškodovanih delov celice, kadar so celice izpostavljene citotoksičnim dejavnikom. Krinofagija in s prenašalci posredovana razgradnja beljakovin predstavljata količinsko manjši delež lizosomalne razgradnje. Omogočata pa selektivno razgradnjo nekaterih beljakovin v celicah.

S citosolno razgradnjo beljakovin se iz celice odstranijo nepravilno oblikovane in zato nefunkcionalne beljakovine, pa tudi regulacijske citosolne beljakovine, s čimer celica usklajuje svoje delovanje in pogostnost celičnih delitev. Predvsem regulacijske molekule morajo imeti učinkovit sistem odbiranja za razgradnjo, kar omogoča hitrejše odzivanje na dražljaje iz okolja.

Zahvala

Zahvaljujemo se prof. dr. Kristijanu Jezerniku za koristne pripombe k tekstu in Lindi Štrus za izdelavo skic.

Literatura

1. Aplin A, Jasionowski T, Tuttle DL, Lenk SE, Dunn WA jr. Cytoskeletal elements are required for the formation and maturation of autophagic vacuoles. *J cell Physiol* 1992; 152: 458–66.
2. Auteri JS, Okada A, Bochaki V, Dice JF. Regulation of intracellular protein degradation in IMR – 90 human diploid fibroblasts. *J cell Physiol* 1983; 115: 167–74.
3. Bolender RP, Weibel ER. A morphometric study of the removal of phenobarbital-induced membranes from hepatocytes after cessation of treatment. *J Cell Biol* 1973; 56: 746–61.
4. Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP, Dice JF. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 1989; 246: 382–5.
5. Cooper GM. The cell: a molecular approach. *ASM Press* 1997: 380–1.
6. Doherty FJ, Wassell JA, Mayer RJ. A putative protein-sequestration site involving intermediate filaments for protein degradation by autophagy. *Biochem J* 1987; 241: 793–800.

7. de Duve G, Wattiaux R. Functions of lysosomes. *A Rev Physiol* 1966; 28: 435–92.
8. Dunn WA, Jr. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* 1990; 110: 1923–33.
9. Dunn WA, Jr. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol* 1994; 4: 139–43.
10. Grinde B. Effect of aminoacid metabolites on lysosomal protein degradation. A regulatory role for kynurenine? *Eur J Biochem* 1984; 145: 623–27.
11. Helminen HJ, Ericsson JLE. Ultrastructural studies on prostatic involution in the rat. Mechanism of autophagy in epithelial cells, with special reference to the rough-surfaced endoplasmic reticulum. *J Ultrastr Res* 1971; 36: 708–24.
12. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 1992; 61: 761–807.
13. Kopitz J, Kisen GO, Gordon PB, Bohley P, Seglen PO. Non-selective autophagy of cytosolic enzymes in isolated rat hepatocytes. *J Cell Biol* 1990; 111: 941–53.
14. Kovacs AL, Grinde B, Seglen PO. Inhibition of autophagic vacuole formation and protein degradation by amino acids in isolated hepatocytes. *Exp Cell Res* 1981; 133: 431–6.
15. Kovacs J, Karpati AP. Regression of autophagic vacuoles in mouse pancreatic cells: a morphometric study of the effect of methylamine and chloroquine followed by cycloheximide treatment. *Cell Biol Inter Rep* 1989; 13: 805–11.
16. Lenk SE, Fisher DL, Dunn WA, Jr. Regulation of protein secretion by crinophagy in perfused rat liver. *Eur J Cell Biol* 1991; 56: 201–9.
17. Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J. *Molecular cell biology*. New York: Scientific American Books; 1995. p. 711.
18. Lombardi D, Soldati T, Riederer MA, et al. Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *EMBO J* 1993; 12: 677–82.
19. Lucocq J, Walker D. Evidence for fusion between multilamellar endosomes and autophagosomes in He-La cells. *Eur J Cell Biol* 1997; 72: 307–13.
20. Mortimore GE, Schvorer CM. Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused liver. *Nature* 1977; 270: 174–6.
21. Papadopoulos T, Pfeifer U. Regression of rat liver autophagic vacuoles by locally applied cycloheximide. *Lab Invest* 1986; 54: 100–7.
22. Pelham HRB. SNAREs and the organisation of the secretory pathway. *Eur J Cell Biol* 1997; 74: 311–4.
23. Punnonen EL, Autio S, Marjomaki VS, Reunanen H. Autophagy, cathepsin L transport, and acidification in cultured rat fibroblasts. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 1579–87.
24. Plomp PJAM, Wolvetang EJ, Groen AK, Meijer AJ, Gordon PB, Seglen PO. Energy dependence of autophagic protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 1987; 164: 197–203.
25. Schwarze PE, Seglen PO. Reduced autophagic activity, improved protein balance and enhanced in vitro survival of hepatocytes isolated from carcinogen-treated rats. *Exp Cell Res* 1985; 157: 15–28.
26. Seglen PO. Regulation of autophagic protein degradation in isolated liver cells. In: Glauman H, Ballard JF, eds. *Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown*, London: Academic Press 1987. p. 369–414.
27. Seglen PO, Gordon PB, Tolleshaug H, Hoyvik H. Use of (³H) raffinose as a specific probe of autophagic sequestration. *Exp Cell Res* 1986; 162: 273–7.
28. Seglen PO, Bohley P. Autophagy and other protein degradation mechanisms. *Experientia* 1992; 48: 158–72.
29. Slot LA, Lauridsen AMB, Hendil KB. Intracellular protein degradation in serum deprived human fibroblasts. *Biochemical J* 1986; 237: 491–98.
30. Sollner T, Whitehart SW, Brunner M, et al. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 1993; 362: 318–24.
31. Veranič P, Pipan N. The use of chloroquine in analysing autophagy in fish hepatocytes after cessation of treatment with estradiol 17 β. *Exp Clin Gastroenterol* 1993; 3: 184–8.
32. Veranič P, Pipan N. Two degradation pathways of endoplasmic reticulum in fish hepatocytes. *Biol Cell* 1995; 69–76.

Prispelo 16. 7. 1998