

Andreja Erman<sup>1</sup>, Kristijan Jezernik<sup>2</sup>

# Avtofagija in njena vloga v zdravju in bolezni

## *Autophagy and its Role in Health and in Sickness*

---

### IZVLEČEK

**KLJUČNE BESEDE:** avtofagija, razgradnja, celična smrt, bolezen

Avtofagija je kataboličen proces razgradnje celici lastnih sestavin s pomočjo lizosomov. Je močno reguliran proces, ki poteka med celično rastjo in diferenciacijo. Ima osrednjo vlogo v vzdrževanju celične homeostaze, pri čemer ohranja ravnovesje med sintezo, razgradnjo in kroženjem celičnih sestavin. Njena osnovna naloga je zaščitna, saj preprečuje kopičenje poškodovanih organelov in beljakovinskih skupkov v celici. Obenem omogoča celici preživetje v ekstremnih pogojih, kot sta stradanje ali oksidativni stres. Ločujemo med avtofagijo s šaproni, mikroavtofagijo in makroavtofagijo. V prispevku smo se osredotočili izključno na makroavtofagijo, s katero se razgrajujejo dolgožive citosolne beljakovine, organeli in celo deli jedra. Nezadostna avtofagna aktivnost je povezana s številnimi človeškimi boleznimi, kot so npr. mišična bolehnja in boleznj živčevja. Prevelika avtofagna aktivnost je za celico škodljiva, saj lahko vodi celo v celično smrt. Avtofagija predstavlja tudi obrambni mehanizem gostitelja pred okužbo z mikroorganizmi. Pomembno vlogo pa ima tudi pri nastanku in razvoju rakavih obolenj. Rakave celice za svoje preživetje bodisi sprožijo ali blokirajo avtofagijo v različnih fazah razvoja tumorja. Nova spoznanja o mehanizmi in kontroli avtofagije bodo v prihodnje lahko omogočila nove možnosti zdravljenja nekaterih bolezni, zlasti nekaterih mišičnih obolenj, boleznj živčevja in rakavih obolenj.

---

### ABSTRACT

**KEY WORDS:** autophagy, degradation, cell death, sickness

Autophagy is a catabolic process of the degradation of cellular components by lysosomal enzymes. It is essential for cellular homeostasis by maintaining the balance between the synthesis, degradation and turnover of intracellular constituents. Its primary role is cytoprotective. It protects the cells against the accumulation of damaged organelles or protein aggregates and it ensures cell survival in extreme conditions like during starvation or oxidative stress. Three major forms of autophagy are known: chaperone-mediated autophagy, microautophagy and macroautophagy. In macroautophagy, long-lived proteins, organelles and even specific nuclear regions could be eliminated. In this paper, macroautophagy is mostly in focus. Many human diseases like muscular disorders and neurodegenerative disorders appear as a consequence of autophagic malfunctioning. Excessive autophagy is cell-destructive and could lead even into autophagic (type II) programmed cell death. Autophagy participates also in cell defense against infectious disease. Autophagy has special role in cancer, where activated or inactivated benefit tumoral cells in different stages of cancer. New discoveries about mechanisms and regulation of autophagy would enable scientists to develop in future new methods for manipulating the activity of the autophagic pathway as new therapeutic tools against some diseases, particularly muscular disorders, neurodegenerative disorders and cancer.

---

<sup>1</sup> Asist. dr. Andreja Erman, univ. dipl. biol., Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Lipičeva 2, 1000 Ljubljana; andreja.erman @mf.uni-lj.si

<sup>2</sup> Prof. dr. Kristijan Jezernik, univ. dipl. biol., Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Lipičeva 2, 1000 Ljubljana

## UVOD

Beseda avtofagija izvira iz grških besed *auto-* (sebi lasten, svoj) in *phagy* (jesti). Avtofagija je torej razgradni proces celici lastnih sestavin, ki so odvečne ali poškodovane. Te se v končnih fazah avtofagije razgradijo s pomočjo lizosomskih encimov do organskih molekul, ki jih celica lahko ponovno uporabi in tako pridobi (reciklira) nujno potrebne hranilne snovi za vzdrževanje biosintetskih reakcij. Avtofagija se je namreč med evolucijo razvila kot primarni odgovor celic na stradanje, zato v ekstremnih pogojih brez hranil celicam omogoča preživetje (1).

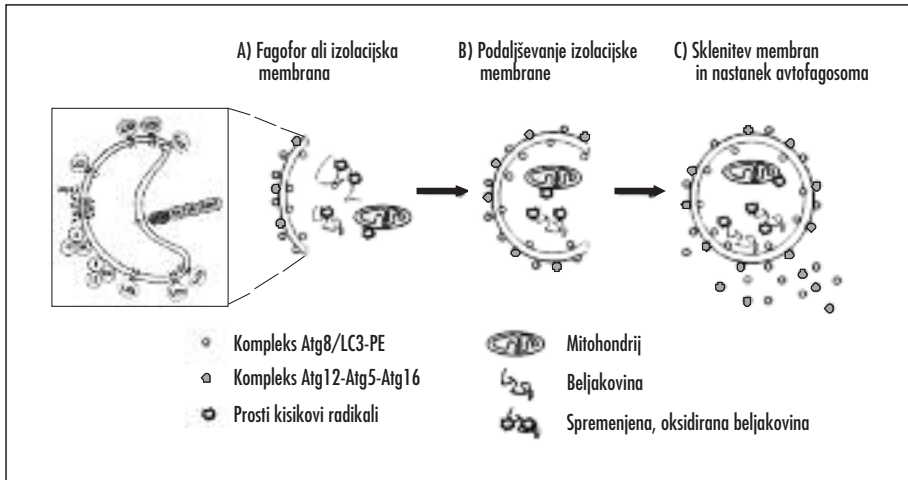
Avtofagija je natančno reguliran proces, ki ima pomembno vlogo med rastjo celice in pri ohranjanju celičnega ravnovesja (homeostaze) med sintetskimi in razgradnimi procesi, še zlasti v mišicah, jetrih in vranici (2, 3). Sprožijo jo lahko znotrajcelični signali, kot so kopičenjske poškodovanih organelov in odvečnih beljakovin v citosolu. Lahko pa so sprožitveni signali tudi zunajcelični, med njimi zlasti hipertermija, hipoksija, okužba z mikroorganizmi ali pomanjkanje hranil.

Ločujemo med avtofagijo s šaproni, mikroavtofagijo in makroavtofagijo. Vsem trem vrstam je skupna končna razgradnja celičnih sestavin v lizosomih (4). Avtofagija s šaproni (molekularskimi spremljevalci) je zelo izbirna, saj se z njo razgrajujejo le citosolne beljakovine, ki imajo specifično signalno zaporedje. Z njim se beljakovine vežejo na šapronski kompleks in prenesejo v lizosome. Mikroavtofagija je razgradnja citosolnih sestavin, ki v lizosome vstopijo z uvihanjem lizosomske membrane v notranjost lizosoma. Makroavtofagija pa je proces, v katerem se del citoplazme obda z na novo nastalo dvojno membrano in nastane avtofagosom, katerega vsebina se razgradi po združitvi z lizosomom. Z makroavtofagijo se razgrajujejo dolgožive citosolne beljakovine, celi organi in celo nekateri specifični predeli jedra. Glede na celični organel (kompartiment), ki se razgrajuje z avtofagijo, ločimo naslednje vrste makroavtofagije:

- peksofagijo (razgradnjo peroksisomov),
- mitofagijo (razgradnjo mitohondrijev) in
- ksenofagijo (razgradnjo znotrajceličnih bakterij in virusov).

Avtofagija je bila prvič opisana pred dobri mi štiridesetimi leti, a so šele v zadnjem desetletju raziskave na tem področju dosegle izreden napredek z odkritjem t. i. genov Atg (angl. *autophagy-related gene*) in beljakovin Atg, ki so vključeni v proces avtofagije v celicah gliv. Za večino teh so že znani homologni geni in beljakovine tudi pri višjih evkariontih, kot so npr. *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, miš in človek (5). To potrjuje dejstvo, da je avtofagija med evolucijo ohranila svoj osnovni mehanizem in vlogo vse do danes.

Avtofagijo lahko povzročijo številni že omenjeni zunanji in notranji stresni dejavniki, ki sprožijo v celici nastajanje avtofagnih vakuol. Tvorba le-teh je kompleksen proces, za katerega še ni v celoti znan niti izvor niti mehanizem nastanka membrane avtofagne vakuole. Po začetnem sprožitvenem signalu se v citosolu izoblikuje posebna membranska struktura fagofor ali izolacijska membrana (slika 1, faza A). Ta pri glivah nastane iz t. i. pred-avtofagosomske strukture (PAS) in predstavlja začetno mesto zbiranja ter urejanja specifičnih beljakovin, ki sodelujejo pri tvorbi bodočega avtofagosoma. PAS pri sesalcih ni, zato lahko nastajajo avtofagosomi kjer koli v citosolu, medtem ko pri glivah vsi avtofagosomi nastanejo iz ene PAS (6). Tudi izvor izolacijske membrane še vedno ni dokončno pojasnjen. Ena od hipotez obravnava izolacijsko membrano kot poseben celični organel, druga hipoteza pa predvideva njen izvor iz membran endoplazemskega retikuluma, ki so brez ribosomov (8, 9). V postopnem podaljševanju izolacijske membrane, s katerim se postopno obdaja del citoplazme, namenjen razgradnji, koordinirano sodelujeta dva konjugacijska beljakovinska sistema. Prvi sistem vključuje 4 beljakovine (Atg5, Atg7, Atg10 in Atg12), med katerimi sta Atg7 in Atg10 encima (10, 11, 12). Začetni kompleksi Atg12-Atg5 se v citosolu najprej nekovalentno vežejo na beljakovine Atg16, združevanje številnih končnih kompleksov Atg12-Atg5-Atg16, vezanih na membrano, pa omogoči tvorbo membrane bodočega avtofagosoma. Drugi konjugacijski sistem predstavljajo pri glivah skupki beljakovine Atg8, ki je analogna beljakovini LC3 pri sesalcih, ter fosfatidil etanolamina (PE). Ob sprožitvi avtofagije encim Atg4 cepi LC3



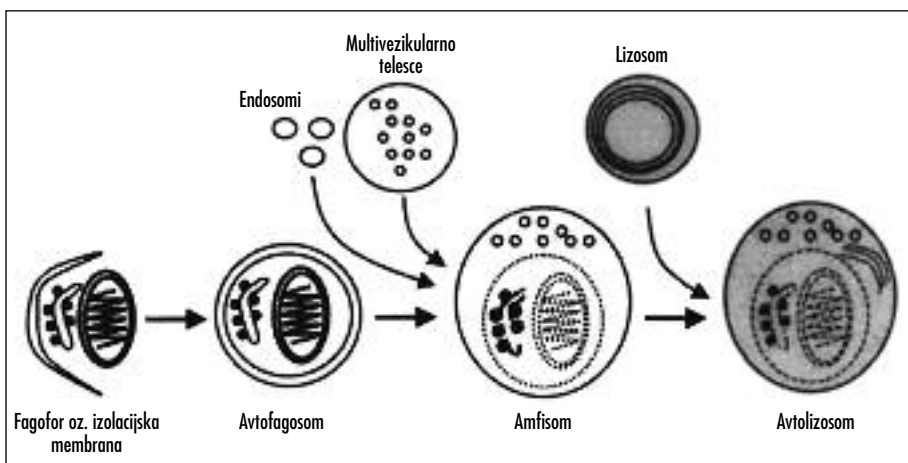
Slika 1. Shematski prikaz nastanka avtofagosoma (prirejeno po 6, 7).

in nastane najprej citosolna oblika LC3I, ki se z encimskim delovanjem Atg3 in Atg7 nato spremeni v LC3II. Ta se, povezan s PE, veže na membrano bodočega avtofagosoma (13–15). LC3 je prva identificirana beljakovina sesalcev, ki je kot LC3II lokalizirana na membranah avtofagosomov in je zato specifični označevalec avtofagnih vakuol v celici (16).

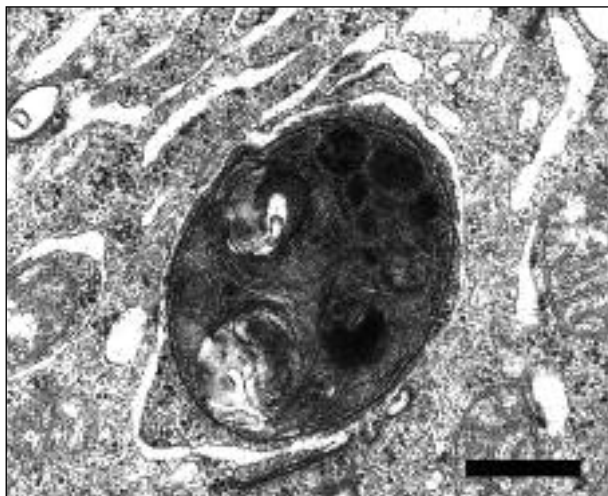
Poleg obeh beljakovinskih konjugacijskih sistemov sodelujeta pri tvorbi avtofagosoma tudi encim fosfatidilinozitol-3-fosfatna kinaza (razred III PI3K) ter kompleks iz molekul

Beclin-1 (pri glivah imenovan Atg6), Ambra (angl. *activating molecule in Beclin1-regulated autophagy*), UVRAG (angl. *ultraviolet irradiation resistance-associated gene*) in Bif-1 (angl. *endophilin B1*), ki skupaj sodelujejo pri podaljševanju izolacijske membrane, tvorbi avtofagosomov in sprožitvi avtofagije (17–19).

Izolacijska membrana oz. membrana bodočega avtofagosoma se podaljšuje z dodajanjem vseh omenjenih osnovnih gradnikov, številnih kompleksov Atg12-Atg5-Atg16 in Atg8/LC3-PE ter Atg9 in lipidov (slika 1, faza B). Ko se membrana sklene, pri čemer



Slika 2. Shema nastanka in zorenja avtofagnih vakuol (prirejeno po 20).



Slika 3. Elektronska mikroskopska slika zgodnje avtofagne vakuole (avtofagosoma) v urotelijski celici sečnega mehurja miši. Merilce označuje dolžino 0,5  $\mu\text{m}$ . (Avtor mikrofografije: Andreja Erman.)

ima pomembno vlogo LC3II, nastane z dvojno membrano obdan mešiček, imenovan avtofagosom ali tudi zgodnja avtofagosomna vakuola (slika 1, faza C), s povprečno prečno velikostjo od 0,3  $\mu\text{m}$  do 1  $\mu\text{m}$  (15). LC3II, ki je vezan na zunanjo membrano avtofagosoma, se odcepi. LC3II, vezan na notranjo membrano, pa ostane ujet v notranjo avtofagosomno vakuolo, vse dokler ga ne razgradijo somatski encimi (20). Avtofagosom se namreč združuje s primarnim lizosomom, ki vsebuje številne encime (ki se hidrolizirajo) za razgradnjo makromolekul ter membranskega aparata in druge organelne komponente. Ta je namreč nujen za vzdrževanje pH. Ta je namreč nujen za vzdrževanje delovanja lizosomskih encimov. Z zlitjem avtofagosoma in lizosoma nastane avtofagosom. Ko se ob zlitju obeh vezni delovi zunanje membrane avtofagosoma združijo s membrano lizosoma, se s pomočjo lizosomskih encimov začne razgradnja vsebin v notranjo membrano nove nastale avtofagosomne vakuole. Če pa se avtofagosom združuje z endosomom ali multivesicularnim telesom, nastane amfisosom ali pozna avtofagosomna vakuola, ki šele združuje vse lizosomne komponente avtofagosoma (slika 2).

Splošno uveljavljeni pojem avtofagosomna vakuola se nanaša tako na avtofagosom, amfisosom kot na avtofagosom. Venčar pa avtofagosom

some obdajata dve membrani (slika 3), medtem ko so amfiosomi in avtolizosomi obdani le z eno membrano. Razgradni produkti, ki nastanejo v avtolizosomih, so osnovni gradniki polimernih organskih molekul. Ti prehajajo skozi membrano v citosol, kjer so celici lahko na voljo za ponovno uporabo.

## AVTOFAGIJA, APOPTOZA IN AVTOFAGNA CELIČNA SMRT

Avtofagija in apoptoza sta v celici natančno nadzorovana procesa, njun medsebojni odnos pa odloča o preživetju ali smrti celice. Tako se na primer v celici, ki ima le posamezne poškodovane in zato prepustne mitohondrije, lahko iz njih sprostijo v citosol signalne molekule za sprožitev apoptoze (npr. citokrom c, AIF, Smac/DIABLO). Vendar pa lahko sprožena avtofagna razgradnja poškodovanih mitohondrijev ustavi prezgodnjo apoptozo ter tako prepreči celično smrt. V hudo poškodovani celici, kjer je število poškodovanih mitohondrijev močno povečano, pa avtofagija ne zadostuje več za popravilo obsežne škode in ponovno obnovo. Celica zato sproži svojo lastno smrt. Pri tem lahko nadaljuje z avtofagno aktivnostjo vse do svojega propada ali pa sproži program apoptoze. Če le-ta izide sedaj še neznanega vzroka v celici zataji, pa se lahko

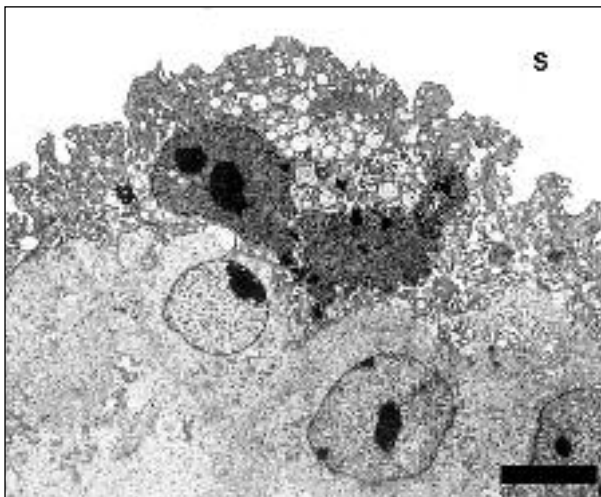
sproži posebna oblika programirane celične smrti, t. i. avtofagna celična smrt (1, 21).

Avtofagija in apoptoza nista vedno izključujoča procesa in sta lahko sočasno prisotna v isti celici (22). Glede na odnos med avtofagijo in apoptozo lahko celice razdelimo v tri kategorije. V prvi kategoriji so celice, v katerih makroavtofagija ni del celične smrti in njena sprožitev upočasnji ali celo prepreči apoptozo. Z avtofagijo se namreč odstranjujejo mitohondriji s prepustno zunanjo membrano, skozi katero se lahko sprostijo signalni proteini za sprožitev apoptoze. V drugi kategoriji celic je avtofagija del apoptotskega odmiranja in se aktivira šele v zadnjih fazah apoptoze kot pomožni mehanizem odstranitve apoptotske celice. V tretji kategoriji celic pa tako avtofagija kot apoptoza potekata sočasno in skupaj prispevata k celični smrti (23).

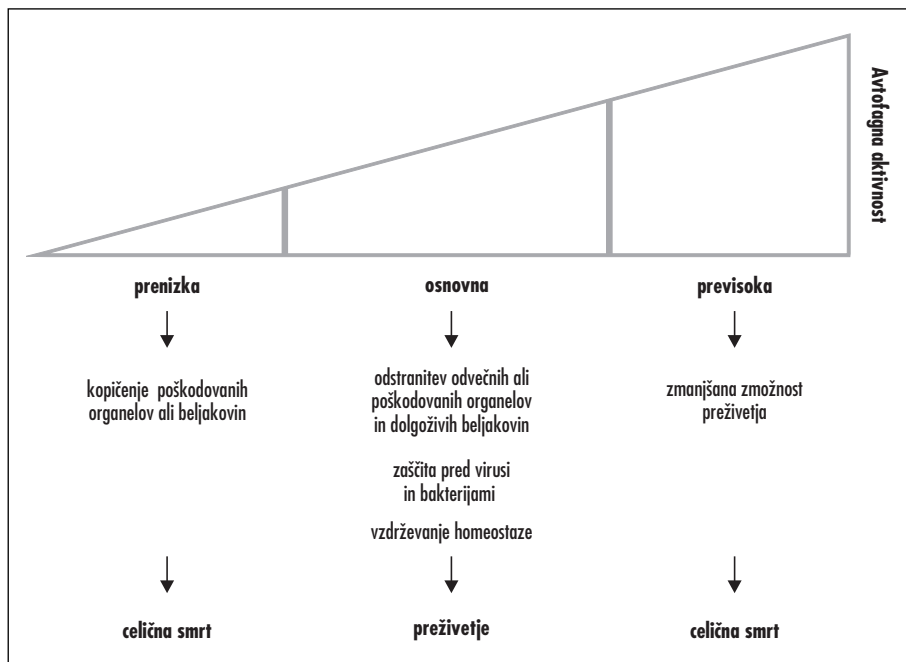
Številne raziskave v zadnjih letih so potrdile, da obstajajo molekularne povezave med avtofagijo in apoptozo. Nekatere beljakovine, npr. Bcl-2, p53 in DAP-kinaze (angl. *death-associated protein kinase*), so skupne regulatorne molekule obema procesoma. Z direktno fosforilacijo različnih substratov DAP-kinaz je možno vplivati na potek tako avtofagije kot apoptoze (24). Odkrite so tudi že nekatere beljakovine, ki aktivno sodelujejo v obeh procesih. Tako ima Atg5 kot »avtofagna beljako-

vina« tudi vlogo molekularnega »stikala« med avtofagijo in apoptozo. Ob sprožitvi apoptoze aktivirani encimi kalpaini cepijo Atg5, ki se premesti v mitohondrije, sproži sprostitve citokroma c v citosol in s tem začetek apoptoze (21, 25). Tudi Beclin-1, ki je sestavni del fosfatidilinozitol-3-kinaznega kompleksa in ki sodeluje pri nastajanju avtofagosomov, je tesno povezan z beljakovino Bcl-2, ki ima pomembno vlogo v apoptozi. Rezultati najnovejših raziskav dokazujejo vlogo Beclina-1 tako v sprožitvi avtofagije kot v zaviranju apoptoze (26, 27). Znižanje nivoja Beclina-1 pod osnovno raven namreč zmanjša avtofagijo, aktivira pa apoptozo. Ta dognanja prikazujejo Beclin-1 v novi luči kot povezovalno molekulo med avtofagijo in apoptozo.

Celice lahko umirajo na različne načine. Do nedavne sta bila znana dva osnovna načina celičnega propadanja: nekroza in apoptoza. Nekrotska smrt, definirana kot tip III celične smrti, je patološki odgovor celice na nenadne spremembe v okolju, spremljan z vnetno reakcijo tkiva. Apoptoza, ki je tip I programirane celične smrti in je znana kot fiziološka celična smrt, pa je genetsko programiran in natančno nadzorovan proces celične smrti, ki ima odločilno vlogo v homeostazi tkiva. V zadnjih letih so znanstveniki odkrili, da lahko celice odmirajo tudi s t. i. avtofagno



Slika 4. Elektronska mikroskopska slika urotelija sečnega mehurja miši. Na svetlino (S) sečnega mehurja meji površinska uroteljska celica z morfološki značilnostmi avtofagne celične smrti. Merilce označuje dolžino 10 µm. (Avtor mikrofografije: Andreja Erman.)



Slika 5. Shematski prikaz vloge normalne avtofagne aktivnosti v celici in posledice odstopanj (prirejeno po 30).

celično smrtjo, ki so jo označili kot tip II programirane celične smrti. Celica odmre z avtofagno celično smrtjo, kadar je makroavtofagija glavni in edini mehanizem, ki povzroči celično smrt brez prisotnih znakov celične smrti tipa I ali tipa III (23, 28). Za ta tip celične smrti je značilna razgradnja endoplazemskega retikuluma, cistern Golgijevega aparata in poliribosomov še pred razpadom jedra. V citosolu so številne avtofagne vakuole, kromatin pa je za razliko od značilne kondenzacije kromatina ob robu jedra med apoptozo kondenziran sredi jedra (slika 4).

Bistvena razlika med celično smrtjo tipa I in tipa II je v ohranjenosti citoskeleta. Med avtofagno celično smrtjo je citoskelet v celoti ohranjen, pri apoptozi pa se citoskeletni elementi razgradijo in reorganizirajo (28, 29). Aktivacija kaspaz, ki so bistveni encimi apoptoze, ter encimska razgradnja DNA, ki je ena glavnih značilnosti apoptoze, se pojavita šele v poznih fazah avtofagne celične smrti ali pa sta celo odsotni (24). Dokončne potrditve vzroka za avtofagno celično smrt še ni, zato obstaja do sedaj le več domnev. Ena od njih je, da se ta tip celične smrti sproži, kadar

se med razvojem ali v odrasli dobi pojavi potreba po obsežni odstranitvi celic iz tkiva, bodisi zaradi potrebe po preoblikovanju tkiva med razvojem ali zaradi vzdrževanja tkivne homeostaze že diferenciranega tkiva. Avtofagna celična smrt pa se pojavlja tudi v nekaterih bolnih tkivih sesalcev (npr. pri ishemičnih poškodbah srčnih mišičnih celic, v živčnih celicah oseb s Parkinsonovo boleznijo) ter v tumorskih celičnih linijah, ki so jih izpostavili kemoterapevtikom (29).

Apoptoza in avtofagna celična smrt sta zelo verjetno evolucijsko sorodna procesa, saj so odkrite nekatere skupne molekule, kot so npr. že omenjene DAP-kinaze (angl. *death-associated protein kinase*) in DRP-1-kinaze (angl. *DAPk related protein kinase-1*). Te molekule sprožijo tako brstenje plazmaleme, značilno za apoptozo, kot tudi intenzivno avtofagno aktivnost, značilno za avtofagno celično smrt (24). Dodatni dokaz so tudi nekatere celice, ki v procesu odmiranja kažejo morfološke oz. ultrastrukturne značilnosti intenzivne avtofagije, medtem ko so na molekularnem nivoju izražene značilnosti apoptoze (25). Zgolj pojav avtofagnih vakuol v citosolu celice še ni

zadosten dokaz avtofagne celične smrti. Sprožena avtofagija je lahko namreč še zadnji poskus, da celica preživi različne stresne razmere. Šele potrjene povišane koncentracije Beclina-1 in Atg5 so dokaz, da je celica res umrla zaradi avtofagne celične smrti (29).

Vloga avtofagije je za celico dejansko dvojna. Normalna avtofagna aktivnost namreč celici omogoča nemoteno delovanje in preživetje ter jo ščiti pred smrtjo. Prevelika ali nezadostna avtofagna aktivnost pa postane lahko za celico zelo hitro škodljiva ali celo usodna in vodi v celično smrt (slika 5).

## AVTOFAGIJA IN STARANJE

Najpogostejša značilnost celic, ki se starajo, je kopičenje spremenjenih beljakovin in poškodovanih organelov. S staranjem celic in tkiv pride namreč do morfoloških sprememb lizosomov, sprememb v njihovi vsebini in delovanju ter sprememb v aktivnosti avtofagije (31). Učinkovitost makroavtofagije in avtofagije s šaproni s staranjem dokazano upada (32). Posledično se zato v celicah kopičijo poškodovani celični organeli, porušena je homeostaza celic in zmanjšana zmožnost učinkovite obrambe celic pred mikrobi ali zunanjimi škodljivimi vplivi. To je lahko še zlasti nevarno za diferencirane celice, ki se ne delijo več (npr. srčne mišične celice, živčne celice). Pri njih se posledice staranja prej kot pri ostalih celicah odražajo v zmanjšanem opravljanju specifičnih nalog.

Intenzivnost makroavtofagije s staranjem upada, saj je zmanjšana tako tvorba novih avtofagnih vakuol kot tudi njihovo združevanje z lizosomi (33). Zato se v celicah tkiv starih organizmov kopičijo avtofagne vakuole. Lizosomi so v takih celicah ponavadi večji in vsebujejo poleg celičnih sestavin, namenjenih razgradnji, tudi starostni pigment lipofuscin beljakovinsko-lipidne narave (34). Lipofuscin je fluorokrom in velja za glavne označevalca staranja, saj njegova količina v celicah s staranjem skoraj linearno narašča (35). Do sedaj ni dokazov, da bi bil sam lipofuscin škodljiv za celice. Vendar pa je bilo ugotovljeno, da vakuole, polne nerazgrajenega lipofuscina, ovirajo lizosome. Na novo sintetizirani lizosomski encimi se namreč transpor-

tirajo zlasti v lizosome z lipofuscinom. Lizosomi, polni lipofuscina, neprestano dobivajo na novo sintetizirane lizosomske encime za razgradnjo nerazgradljivega lipofuscina. V avtolizosomih tako primanjkuje lizosomskih encimov, ki zato ne morejo več vzdrževati avtofagne aktivnosti na osnovnem nivoju (36). Diferencirane celice, ki se ne delijo več, sicer vsebujejo veliko lizosomskih encimov, ki pa so v napačnih organelih in zato nesposobni sodelovati v učinkoviti razgradnji celičnih sestavin. To vodi v kopičenje poškodovanih in starih mitohondrijev, ki prepuščajo ione in povzročijo nastajanje prostih kisikovih radikalov. Ti so vzrok za številne spremembe v celici (poškodbe DNA, peroksidacijo lipidov v membranah, tvorbo prečnih vezi med proteini, kopičenje membranskega lipida dolihola), za katere je znano, da v veliki meri prispevajo k staranju (37). Avtofagija torej posredno z odstranjevanjem poškodovanih mitohondrijev omejuje količino škodljivih kisikovih prostih radikalov in s tem zmanjšuje tudi t. i. oksidativni stres (tabela 1). Ta je vedno prisoten pri staranju in je tudi znan patogeni dejavnik pri številnih akutnih in kroničnih boleznih.

Omejitve vnosa kalorij v telo z dieto je do sedaj edina znana in potrjena možnost, ki upočasnjuje številnih živalskih vrst, saj zmanjša nivo krvnega sladkorja in inzulina, zaviralca avtofagije (38). Znižan nivo inzulina pa spodbudi avtofagijo, ki prepreči nastanek že omenjenih dejavnikov staranja (39, 40). Inzulinski receptor v plazmalemi celice je namreč ena ključnih molekul v regulaciji avtofagije skupaj z že omenjenim encimom fosfatidilinozitol-3-fosfatno kinazo, ki sodeluje pri tvorbi avtofagosomov (41). Študije na živalih so že potrdile možnost farmakološkega vpliva na povečanje avtofagije in s tem na možnost podaljšanja življenjske dobe. Tako so pri starih podganah, izpostavljenih dieti, z dolgotrajnim dodajanjem anti-lipolitičnih zdravil, dovoljenih tudi za uporabo pri ljudeh, znižali nivo glukoze in inzulina ter povečali avtofagno razgradnjo organelov jetrnih celic (42). Ta živalski model je tako neposredno potrdil tesno povezavo med avtofagijo in staranjem.

Tabela 1. Pozitivna in negativna vloga avtofagije pri staranju in nekaterih obolenjih (prirejeno po 38).

	Staranje	Infekcije in imunost	Živčna obolenja	Mišična obolenja	Rakava obolenja
<b>Pozitivna vloga avtofagije</b>	Odstranjuje poškodovane organele in zmanjša nastanek reaktivnih kisikovih skupin	Odstranjuje mikroorganizme med infekcijo in lahko prepreči avtoimuna in vnetna obolenja	Prepreči kopičenje spremenjenih celičnih beljakovin	Prepreči kopičenje spremenjenih celičnih beljakovin	Odstrani poškodovane organele in zmanjša kromosomska nestabilnost
<b>Negativna vloga avtofagije</b>	Dolgotrajna nezadostna razgradnja pospeši staranje	Neučinkovita za nekatere mikroorganizme	Nezadostna lizosomska razgradnja povzroči kopičenje avtofagosomov	Nezadostna avtofagija vodi v okvaro funkcije mišičnih celic	Omogoča odpornost rakavih celic na zdravljenje

## AVTOFAGIJA IN BOLEZEN

### Avtofagija in infekcijske bolezni

Patogeni mikroorganizmi so razvili številne mehanizme, ki jim omogočajo vstop in razmnoževanje v evkariotskih celicah. Avtofagija pa predstavlja uspešen obrambni mehanizem odstranjevanja mnogih bakterij (npr. *Mycobacterium tuberculosis*, *Shigella*, *Salmonella*, *Listeria*), virusov in parazitov (npr. *Toxoplasma gondii*) v okuženih celicah gostitelja, saj se v fagolizosomih uničijo in razgradijo (43, 44). Vendar pa lahko nekateri znotraj-celični patogeni sami vplivajo na potek avtofagije in jo obrnejo sebi v prid s preprečitvijo zorenja fagosomov (45). Tako npr. *Brucella abortus*, *Legionella pneumophila* in *Porphyromonas gingivalis* spremenijo in prilagodijo avtofagosome v svoje zavetišče pred obrambnim mehanizmom gostitelja, vsebina avtofagosomov pa jim služi kot vir hranil (1, 44). Zgodnji endosomi zaradi vsebnosti bakterij ne zorijo, temveč se združijo z avtofagosomi in preprečijo združitev z lizosomi, ki bi povzročili razgradnjo bakterij. Legionele so pri tem še bolj »predrzne«. V avtofagosomih, ki že vsebujejo razgradne encime, se namreč uspešno razmnožujejo in ni znano, kako se zaščitijo pred zanje nevarnimi encimi. Legionele lahko celo same direktno sprožijo avtofagijo z izločanjem sekrecijskih beljakovin. Če se njihovo izločanje ustavi, avtofagija preneha in bakterije se razgradijo v fagolizosomih (46). Prav nasprotno pa velja za virus *Herpes simplex*, ki z izločanjem posebne beljakovine prepreči zanj sicer usodno aktivacijo avtofagije (47). Zanimiv način izkoriščanja avtofagije

sebi v prid ima tudi virus HIV. Ta ob okužbi celic imunskega sistema CD4<sup>+</sup> sproži intenzivno avtofagijo in apoptozo sosednjih, neokuženih celic in tako z učinkovitim zmanjšanjem števila zdravih celic CD4<sup>+</sup> povzroči oslabitev imunskega sistema ter izbruh bolezni AIDS (1).

Identifikacija bakterijskih in virusnih beljakovin, ki vplivajo na proces avtofagije, ter razumevanje njihovega delovanja bi lahko v prihodnosti omogočilo nove načine zdravljenja infekcijskih bolezni.

### Avtofagija in bolezni živčevja

Številni raziskovalci so pri mnogih nevrodegenerativnih boleznih odkrili dve skupni značilnosti okvarjenih živčnih celic, in sicer prisotnost beljakovinskih skupkov v citosolu ter spremenjeno proteolitično aktivnost celic. Tako so pri Alzheimerjevi, Huntingtonovi in Parkinsonovi bolezni zasledili velike spremembe v izgledu in aktivnosti lizosomskega sistema, ki je v možganskih nevronih sicer zelo dobro razvit (48). Te spremembe pri Alzheimerjevi bolezni vključujejo nenormalno povečano nastajanje lizosomov ter povečano sintezo vseh lizosomskih hidrolaz, vključno s katepsini. V primeru Huntingtonove bolezni se mutirana beljakovina huntingtin kopiči v jedru in citoplazmi nevronov, kar aktivira lizosomski sistem za razgradnjo huntingtina ter avtofagijo (49). Pri Parkinsonovi bolezni pa se v dopaminergičnih nevronih črne substance kopiči mutirana beljakovina  $\alpha$ -sinu-klein, ki spremeni mehanizme razgradnje in poveča avtofagno aktivnost, ki lahko vodi tudi v avtofagno celično smrt ter izgubo nevronov (50).



Rezultati raziskav živčnih obolenj kažejo, da spremenjene (mutirane ali napačno zvite) beljakovine sprožijo lastno razgradnjo s pomočjo šapronov ali proteaz, kar verjetno v zgodnjih fazah živčnih obolenj zadostuje. Vendar pa postane kasneje zaradi vedno večje količine spremenjenih beljakovin razgradnja s pomočjo šapronov ali proteaz neučinkovita in edina možnost za odstranjevanje beljakovinskih skupkov je tako avtofagija. Z napredovanjem bolezni se količina beljakovinskih skupkov še povečuje, njihova zmanjšana dovzetnost za razgradnjo z lizosomskimi encimi ter povečana avtofagija pa lahko vodi celo v propad nevronov z avtofagno celično smrtjo (4).

V raziskavah, namenjenih proučevanju Huntingtonove bolezni, je znanstvenikom že uspelo na modelnih tkivih s sproženo intenzivno avtofagijo razgraditi spremenjeni huntingtin in tako preprečiti tvorbo in kopičenje skupkov huntingtina v živčnih celicah (49, 51). Aktivacija avtofagije v zgodnjih fazah razvoja živčnih obolenj bi torej v prihodnje lahko bila možna terapija teh obolenj.

### **Avtofagija in mišična obolenja**

Dedna mišična obolenja, za katera je značilno kopičenje avtofagnih vakuol v sarkoplazmi mišičnih celic, so v osnovi lizosomske bolezni (52). Med njimi je najbolj znana Danonova bolezen, ki je na kromosom X vezana vakuolarna miopatija in je trenutno najbolje raziskana bolezen iz skupine t. i. primarnih lizosomskih bolezni. Povzroči jo pomanjkanje lizosomske membranske beljakovine LAMP-2. V eni od raziskav so znanstveniki z inaktivacijo LAMP-2 v miših povzročili masivno kopičenje avtofagnih vakuol v celicah jeter, mišic in srca ter tako razvili živalski model za Danonovo bolezen. Raziskave na jetrnih celicah s primanjkljajem LAMP-2 *in vitro* pa so pokazale, da je kopičenje avtofagnih vakuol povezano z zmanjšanim obnavljanjem (vračanjem v trans Golgijevo mrežje) manozna-6-fosfatnih receptorjev za lizosomske encime (2, 53). LAMP-2 naj bi bil torej posredno ali neposredno udeležen v tem procesu. To je dokaz, da so lizosomi in z njimi povezane bolezni v tesni povezavi z avtofagijo. Identifikacija mutacij v genih, ki so odgovorni za lizosomsko-avtofagno pot, bo v prihodnosti omogočila bolj

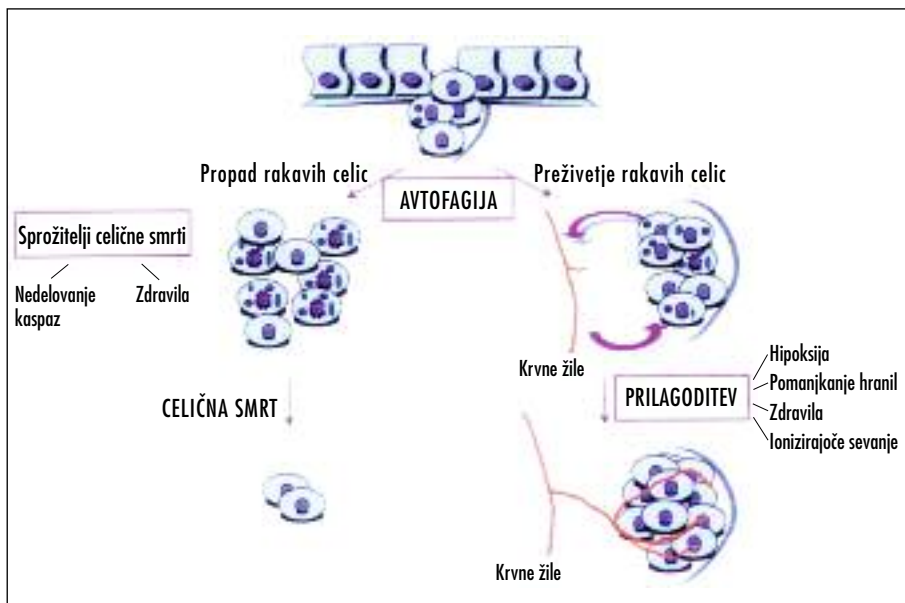
še razumevanje in zdravljenje mišičnih obolenj.

### **Avtofagija in rakava obolenja**

V rakavih celicah ima avtofagija posebno vlogo, saj tako sprožitev kot zaustavitev avtofagije omogočata preživetje teh celic. V začetnih fazah razvoja tumorjev je program avtofagije blokiran. Sinteza beljakovin prevladuje nad razgradnjo in celice hitro in nemoteno rastejo, kar je ena od osnovnih značilnosti rakavih celic. Z nadaljnjo rastjo solidnega in slabo prekrvavljene tumorja pa imajo celice v notranjosti tumorja omejen dostop do hranil in kisika, zato preklopijo iz anabolnega metabolizma v katabolni metabolizem in aktivirajo avtofagijo, da bi lahko preživele v ekstremnih pogojih (4). Dodatno prednost v boju za preživetje in s tem tudi večjo odpornost na zdravljenje daje avtofagija tumorskim celicam tudi v primeru obsevanja ali kemoterapije, saj lahko z avtofagijo celice odstranjujejo svoje poškodovane organele (54, 55).

Avtofagija torej pomembno prispeva k prilagajanju rakavih celic na razmere v okolju in s tem na njihovo preživetje. Lahko pa sodeluje tudi pri njihovem propadu, ko se zaradi različnih sprožiteljev celične smrti, npr. nedelovanja kaspaz ali delovanja zdravil (npr. Tamoxifena, Resveratrola, Rapamicina), sproži v njih avtofagno celična smrt (slika 6) (55, 56). To so že potrdile številne raziskave rakavih tkiv debelega črevesa, prostate, dojke in možganov, kjer so bile zaradi terapije, ki sproži avtofagijo, odkrite celice, ki so odmrle z avtofagno celično smrtjo (57). V zadnjih letih se z intenzivnim iskanjem možnosti neposrednega vpliva na sprožitev avtofagije v rakavih celicah in s tem na njihovo smrt nakazujejo nekatere obetavne možnosti zdravljenja rakavih obolenj v prihodnosti (58).

Beclin-1 je edini doslej znan tumorski zaviralni gen (genski lokus na kromosomu je 17q21), ki sodeluje v tvorbi avtofagosomov. Nezadostno izražanje Beclina-1 vodi v zmanjšano avtofagno aktivnost ter s tem v zmanjšano odstranjevanje poškodovanih organelov, zlasti mitohondrijev. Poškodbe in posledična prepustnost membran teh organelov so vzrok za sprostitve reaktivnih kisikovih prostih radikalov v citosol in v jedro. V njem povzročijo spremembe v genomu, ki lahko prispe-



Slika 6. Shematski prikaz različne usode rakavih celic zaradi dvojne vloge avtofagije med rasto tumorja (prirejeno po 55).

vajo k rakasti transformaciji celic (1, 47, 59). Monoalelna delecija Beclina-1 so odkrili v 40–75% primerov rakavih obolenj pljuč, dojke, jajcevodov in prostate. V teh primerih sprožitev avtofagije v rakavih celicah zaradi premajhne količine Beclina-1 ni bila možna (47).

## ZAKLJUČEK

Z odkritjem genov oz. beljakovin, ki sodelujejo v procesu avtofagije, ter s proučevanjem posledic mutacij teh genov so se razkrile do nedavnega neznane povezave med avtofagijo in apoptozo ter med avtofagijo in nekaterimi že omenjenimi bolezenskimi spremembami. Kljub temu pa ostaja še veliko odprtih vprašanj. Tako na primer še vedno ni znan odgovor na eno ključnih vprašanj, kateri meha-

nizmi omogočajo, da se npr. poškodovani mitohondriji izolirajo in razgradijo, medtem ko se nepoškodovani mitohondriji v neposredni bližini temu izognejo. Pojasnitev tega vprašanja bo odprla nove razsežnosti tudi v obravnavanju oksidativnega stresa, kjer imajo ti organeli odločilno vlogo. Prav tako tudi še ni znano, kako je medsebojna interakcija med različnimi vrstami avtofagije spremenjena v celicah obolelega tkiva ali v rakavih celicah oziroma do kakšne mere lahko npr. mikroavtofagija nadomesti zmanjšanje makroavtofagije v procesu staranja.

Raziskave avtofagije so v polnem razmahu, saj bodo nova spoznanja lahko prispevala k razvoju novih metod zdravljenja rakavih, živčnih in mišičnih obolenj, kjer ima avtofagija dokazano pomembno vlogo.

## LITERATURA

1. Deretic V, Klionsky DJ. How cells clean house. *Sci Am.* 2008; 298 (5): 74–81.
2. Tanaka Y, Guhde G, Suter A, et al. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature.* 2000; 406 (6798): 902–6.
3. Eskelinen EL, Tanaka Y, Saftig P. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* 2003; 13 (3): 137–45.

4. Cuervo AM. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.* 2004; 14 (2): 70–7.
5. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell.* 2003; 5 (4): 539–45.
6. Longatti A, Tooze SA. Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell Death Differ.* 2009; 16: 956–65.
7. Vellai T. Autophagy genes and ageing. *Cell Death Differ.* 2009; 16: 94–102.
8. Dunn Jr WA. Autophagy and related mechanisms of lysosomal-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.* 1994; 4 (4): 139–43.
9. Reunanen H, Punnonen EL, Hirsimäki P. Studies on vinblastine-induced autophagocytosis in mouse liver. A cytochemical study on the origin of membranes. *Histochem.* 1985; 83 (6): 513–7.
10. Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, et al. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature.* 1998; 395: 395–8.
11. Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J.* 1999; 18 (14): 3888–96.
12. Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, et al. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol.* 2001; 152 (4): 657–68.
13. Tanida I, Ueno T, Kominami E, et al. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36 (12): 2503–18.
14. Wu J, Dang Y, Su W, et al. Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B- two novel markers of autophagosome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 339 (1): 437–42.
15. Fader CM, Colombo MI. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ.* 2009; 16 (1): 70–8.
16. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localised in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000; 19 (21): 5720–8.
17. Petiot A, Ougier-Denis E, Blommaert EF, et al. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem.* 2000; 275 (2): 992–8.
18. Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol.* 2007; 9: 1142–51.
19. Peplowska K, Cabrera M, Ungermann C. UVRAG reveals its second nature. *Nature Cell Biol.* 2008; 10 (7): 759–61.
20. Eskelinen EL. Maturation of autophagic vacuoles in mammalian cells. *Autophagy.* 2005; 1 (1): 1–10.
21. Lemasters JJ, Qian T, Elmore SP, et al. Confocal microscopy of the mitochondrial permeability transition in necrotic cell killing, apoptosis and autophagy. *Biofactors.* 1998; 8 (3–4): 283–5.
22. Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, et al. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature Cell Biol.* 2006; 8 (10): 1124–32.
23. Scarlatti F, Granata R, Meijer AJ, et al. Does autophagy have a license to kill mammalian cells? *Cell Death Differ.* 2009; 16 (1): 12–20.
24. Inbal B, Bialik S, Sabanay I, et al. DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J Cell Biol.* 2002; 157 (3): 455–68.
25. Paglin S, Hollister T, Delohery T, et al. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res.* 2001; 61: 439–44.
26. Wang J. Beclin1 bridges autophagy, apoptosis and differentiation. *Autophagy.* 2008; 4 (7): 947–8.
27. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol.* 2007; 8: 741–52.
28. Bursch W, Ellinger A, Gerner CH, et al. Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD or others? *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 926: 1–12.
29. Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest.* 2005; 115 (10): 2679–88.
30. Yousefi S, Simon HU. Apoptosis regulation by autophagy gene 5. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007; 63 (3): 241–4.
31. Cuervo AM, Dice JF. When lysosomes get old. *Exp Gerontol.* 2000; 35: 119–31.
32. Cuervo AM, Dice JF. Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem.* 2000; 275: 31505–13.
33. Terman A. The effect of age on formation and elimination of autophagic vacuoles in mouse hepatocytes. *Gerontology.* 1995; 41 (2): 319–26.
34. Terman A, Brunk UT. Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. *APMIS.* 1998; 106 (2): 165–76.
35. Nakano M, Gotoh S. Accumulation of cardiac lipofuscin depends on metabolic rate of mammals. *J Gerontol.* 1992; 47: B126–9.
36. Terman A, Dalen H, Brunk UT. Ceroid/lipofuscin-loaded human fibroblasts show decreased survival time and diminished autophagocytosis during aminoacid starvation. *Exp Gerontol.* 1999; 34 (8): 943–57.
37. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Mitochondrial decay in aging. *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1271: 165–70.
38. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008; 451 (7182): 1069–75.

39. Bergamini E, Gori Z. Towards an understanding of the biological mechanism of dietary restriction: a signal transduction theory of aging. *Aging Clin Exp Res.* 1995; 473-5.
40. Bergamini E, Cavallini G, Donati A, et al. The anti-ageing effects of caloric restriction may involve stimulation of macroautophagy and lysosomal degradation, and can be intensified pharmacologically. *Biomed & Pharmacotherapy.* 2003; 57 (5-6): 302-8.
41. Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci.* 2005; 118 (1): 7-18.
42. Locci Cubeddu T, Masiello P, Pollera M, et al. Effects of antilipolytic agents on rat liver peroxisomes and peroxisomal oxidative activities. *Biochim Biophys Acta.* 1985; 839: 96-104.
43. Taloczy Z, Jiang W, Virgin HW 4th, et al. Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci.* 2002; 99 (1): 190-5.
44. Scott CC, Botelho RJ, Grinstein S. Phagosome maturation: a few bugs in the system. *J Membr Biol.* 2003; 193: 137-52.
45. Dorn BR, Dunn WA, Progulskie-Fox A. Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell Microbiol.* 2002; 4 (1): 1-10.
46. Coers J, Kagan JC, Mathews M, et al. Identification of icm protein complexes that play distinct roles in biogenesis of an organelle permissive for *Legionella pneumophila* intracellular growth. *Mol Microbiol.* 2000; 38 (4): 719-36.
47. Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin-1. *Nature.* 1999; 402 (6762): 672-6.
48. Nixon RA, Cataldo AM, Mathews PM. The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurochem Res.* 2000; 25 (9-10): 1161-72.
49. Kegel KB, Kim M, Sapp E, et al. Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci.* 2000; 20 (19): 7268-78.
50. Stefanis L, Karsen KE, Rideour HJ, et al. Expression of A53T mutant but not wild-type  $\alpha$ -synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *J Neurosci.* 2001; 21 (24): 9549-60.
51. Qin ZH, Wang Y, Kegel KB, et al. Autophagy regulates the processing of amino terminal huntingtin fragments. *Hum Mol Genet.* 2003; 12 (24): 3231-44.
52. Nishino I. Autophagic vacuolar myopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2003; 3 (1): 64-9.
53. Eskelinen EL, Illert AL, Tanaka Y, et al. Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Biol Cell.* 2002; 13: 3355-68.
54. Aita VM, Liang XH, Murty VVVS, et al. Cloning and genomic organization of Beclin-1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics.* 1999; 59 (1): 59-65.
55. Ogier-Denis E, Codogno P. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1603 (2): 113-28.
56. Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ. BAX-induced cell death may not require interleukin1 beta-converting enzyme like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93 (25): 14559-63.
57. Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, et al. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nature Rev Cancer.* 2005; 5 (9): 726-34.
58. Kitanaka C, Kuchino Y. Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ.* 1999; 6 (6): 508-15.
59. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature.* 2004; 6: 1221-8.

Prispelo 21. 8. 2009