

AUTOFAGIA

Lysosomaalinen hajotusreitti

Kandidaatintutkielma
TURUN YLIOPISTO
Biokemianlaitos
Biokemia
Toukokuu 2019
Tuomas Javanainen

TIIVISTELMÄ

Tuomas Javanainen
AUTOFAGIA, LYSOSOMAALINEN HAJOTUSREITTI
Turun yliopisto
Biokemia

Autofagia on tärkeä solujen energiatasapainon ylläpitäjä. Sen tehtävänä on vastata erilaisiin stressitekijöihin, joita ovat esimerkiksi ravintoaineiden puutostilat. Kun solu altistuu stressitekijöille, autofagia käynnistyy ja sen määrä elimistössä lisääntyy. Autofagian johdosta proteiinit ja vaurioituneet soluelimet lähetetään hajotettavaksi ja kierrätettäväksi lysosomeille, jotta ne voidaan uudelleen käyttää metabolisiin reaktioihin ja soluenergian valmistukseen. Autofagiolla pystytään siirtämään suuria määriä erilaisia substraatteja kierrätykseen tehokkaasti, jolloin solu selviytyy hyvin stressistä ja pystyy tuottamaan uusia rakennuskomponentteja vanhoista ja toimimattomista substraateista.

Autofagia on tarkoin säädelty mekanismi, joka käynnistyy ainoastaan silloin, kun sen tarve kasvaa. Keskeisimmät ravintosensorit reaktion säätelyssä on mammalian target of rapamycin mTOR-kompleksi sekä adenosiinimonofosfaatti-riippuvainen kinaasi AMPK. mTOR on herkkä aistimaan aminohappojen määrää sekä kasvutekijöitä. Jos ravintoaineita on tarpeeksi saatavilla mTOR aktivoituu, autofagia estyy ja organismi haluaa kasvaa. Solujen ollessa ravintoainepuutoksessa esimerkiksi paaston aikana mTOR-kompleksi on inaktiivinen ja autofagia aktiivinen. Myös muut solujen molekulaariset säätelijät aistivat ravintoainepuutoksia, kuten glukoosin puutoksen ja soluenergian määrän aistiva AMPK. Tällöin solu ei tuota tehokkaasti ATP:tä ja tämä tehostaa autofagiaa.

Koska autofagian on osoitettu olevan erittäin tärkeä mekanismi nisäkkäiden fysiologiassa, sen puutos saattaa johtaa erilaisiin sairauksiin ja nopeutettuun ikääntymiseen. Tänä päivänä autofagia on tutkimuksessa tärkeä kohde. Viimeaikaiset löydökset ovat viitanneet autofagian potentiaaliin erilaisten sairauksien terapeuttisena hoitomuotona.

Sisälllys

TIIVISTELMÄ	0
LYHENNELUETTELO	2
1. JOHDANTO	3
3. AUTOFAGIAN HISTORIA	5
3.1 AUTOFAGIAN LÖYTYMINEN	5
3.2 NOBELIN PALKINTO 2016.....	6
4. MEKANISMI	7
4.1 RAVINTOSENSORIT MTOR JA AMPK	7
4.1.1 KÄYNNISTYMINEN	8
4.1.2 KÄYNNISTYMINEN	8
4.1.3 AUTOFAGOSOMIN NUKLEAATIO	9
4.1.4 ELONGAATIO JA AUTOFAGOSOMIN MUODOSTUMINEN.....	9
4.1.5 LYSOSOMIIN FUUSIOITUMINEN JA AUTOLYSOSOMIN MUODOSTUMINEN	10
5. AUTOFAGIA JA SAIRAUDET	10
5.1 AUTOFAGIA JA IKÄÄNTYMINEN.....	10
5.2 PROTEIINIEN HAJOTUSSYSTEEMIT	11
5.3 NEURODEGENERATIIVISET SAIRAUDET	13
6. YHTEENVETO	14
LÄHTEET	15

1

¹ Kansikuva. Autofagosomi fuusioituu lysosomiin, taiteilijan näkemys (Kuvan omistaa Tuomas Javanainen Vaste Oy).

Lyhenneluettelo

AMPK	AMP aktivoitu proteiinikinaasi
ATG	Autofagiaan liittyvä geeni
Beclin-1	Mammalian homologue of Atg6 yeast
Hsc70	Lämpösokkiproteiini 70Kda
LC3	Mikrotubulus avusteinen proteiini
mTOR	Mammalian target of rapamycin
PI(3)P	Phosphoinositide phosphatidylinositol 3-phosphate
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinaasi
Rap7	GTPaasi
ULK-1	autofagiaa aktivoiva kinaasi
UPS	ubikitiini-proteasomi-järjestelmä

1. JOHDANTO

Autofagia on evoluutiosta säilynyt ja tarkoin säädelty lysosomaalinen kierrätysreitti, joka siirtää soluliman ainesosia ja soluelimiä lysosomiin hajotettavaksi (Eskelinen 2008). Autofagia aktivoituu stressiolosuhteissa, kuten aminohappojen ja ravinteiden puutteesta (paastotila), laskostumattomien proteiinien lisääntyessä tai virusinfektiossa. Kierrätettävän materiaalin perusteella, sen reitistä ja siitä kuinka se saapuu lysosomiin hajotettavaksi, autofagia voidaan jakaa kolmeen pääluokkaan 1) makroautofagiaan (autofagia) 2) mikroautofagiaan, ja 3) kaperonivälitteiseen autofagiaan (Eskelinen 2008).

Makroautofagiassa solut muodostavat kaksoismembraanisen vesikkelin eli autofagosomin. Kierrätettävä materiaali kuljetetaan autofagosomissa lysosomeille hajotettavaksi ja entsyymien toimesta monomeereihinsa pilkottu materiaali voidaan uudelleen käyttää solujen toimintoihin (kuva 1.). Makroautofagia reaktion ensimmäisiä vaiheita on eristetyn kuppimaisen membraanin muodostuminen (fagofori), jonka oletetaan olevan peräisin golgin laitteesta (Van Der Vaart 2010). Tätä prosessia kutsutaan nukleaatioksi ja sitä säätelevät monet proteiinit (Suzuki ja Ohsumi 2007). Fagofori kasvaa ja pitenee vähitellen elongaatiovaiheessa muodostaen lopuksi autofagosomin. Viimeisessä vaiheessa autofagosomi fuusioituu lysosomin kanssa muodostaen autolysosomin ja kierrätettävä solumateriaali vapautetaan lysosomin hydrolaaseille hajotettavaksi (Suzuki ja Ohsumi 2007).

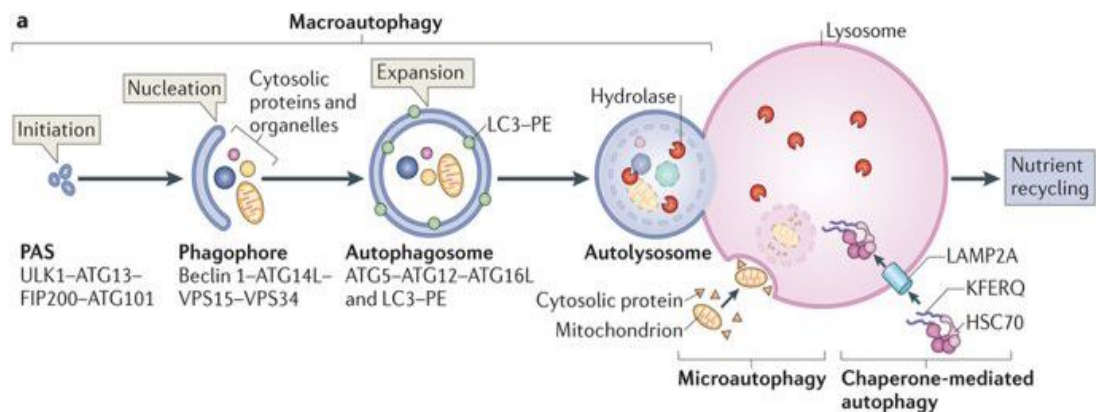
Nonselektiivisessä mikroautofagiassa lysosomi (hiivoilla vakuoli) kaappaa nielaisemalla sytosolisia komponentteja membraanin läpi kierrätykseen solulimasta (kuva 1). Mekanismissa on tutkittu paljon hiivasoluissa mutta on tuntemattomampi muissa organismeissa (Li 2012). Mikroautofagia on yleensä ei-valikoivaa, mutta on olemassa myös poikkeuksia, jolloin mikroautofagiasta tulee valikoivaa (micropexophagy, tuman mikroautofagia ja mikromitofagia). Ravintoainepuutoksessa hiivan vakuolimembraaniin alkaa muodostumaan putkiloita ja kuroumia, joita kutsutaan autofagiaputkiloiksi. Vesikkeli

fuusioituu kuroumaan ja kierrätettävä materiaali siirtyy endosytoottisesti lysosomin luumeniin hajotettavaksi (Li 2012).

Kaperonivälitteisessä autofagiassa kaperonikompleksi, johon kuuluu ko-kaperonien lisäksi lämpösokkiproteiini Hsc70 (70Kda), tunnistaa kierrätettävät proteiinisubstraatit sytosolissa ja sitoutuu niihin (kuva 1.). Tämä valikoiva autofagian muoto valitsee proteiineja, joissa on pentapeptidi KFERQ sekvenssi (Massey ja muut 2006). Kaperonisubstraattikompleksi siirtää toimimattomat proteiinit yksitellen lysosomin pinnalle, jossa ne sitoutuvat LAMP-2A membraaniproteiiniin. Hajotukseen menevä materiaali siirtyy lysosomin membraanin läpi lysosomaalisen Hsc70 avustuksella. Lysosomin hydrolaasit hajoittavat proteiinit uudelleen käytettäväksi (Massey ja muut 2006). Paaston aikana kaperonivälitteinen autofagia kerää aminohappoja proteiinisynteesiin ja poistaa toimimattomia proteiineja, jotka estävät solua selviytymästä (Cuervo 1995).

Autofagia voidaan nimetä myös useisiin erilaisiin alatyyppeihin riippuen kierrätettävästä materiaalista, kuten esimerkiksi mitofagia, lipofagia, lysofagia, aggregafia, ja ribofagia (Ghosh ja Pattinson 2018).

Geneettiset tutkimukset ovat osoittaneet, että hiivan ATG1-kinaasilla on keskeinen rooli autofagian käynnistymisessä (Joungmok ja muut 2011). Lisäksi autofagian toimintaa edistää AMP aktivoitu proteiinikinaasi AMPK, joka on tärkeä ravintosensori. Se säätelee solun aineenvaihduntaa saavuttaakseen energiatasapainon ja kiihdyttää autofagiaa aktivoimalla seriini/treoniini proteiinikinaasi ULK1 entsyymillä fosforyloimalla Ser 317 ja Ser 777:n. Autofagiaa inhiboi keskeinen solukasvua säätelevä the mammalian target of rapamycin (mTOR/TOR) (nisäkkäillä/hiivoilla), joka pitää sisällään kasvutekijät ja ravintoainesäätelyn. Kinaasiaktiivisuuden inhibio rapamysiinilla, taas aktivoi autofagian. (Joungmok ja muut 2011).



Kuva 1. Kuvassa on esiteltyä kolme autofagian päätyyppiä. Makroautofagia, mikroautofagia ja kaperonivälitteinen autofagia. Makroautofagiassa fagoforista muodostuu autofagosomi, jonka sisällä kierrätettävä materiaali siirtyy lysosomiin hajotettavaksi. Mikroautofagiassa lysosomi nielaisee epäselektiivisesti kierrätettävää materiaalia sisäänsä hajotettavaksi. Kaperoni välitteisessä autofagiassa kaperonikompleksin lämpösokkiproteiini HSC70 tunnistaa kierrätettävän materiaalin pentapeptidi KFERQ sekvenssin avulla. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16, 461-472 (2015).

3. AUTOFAGIAN HISTORIA

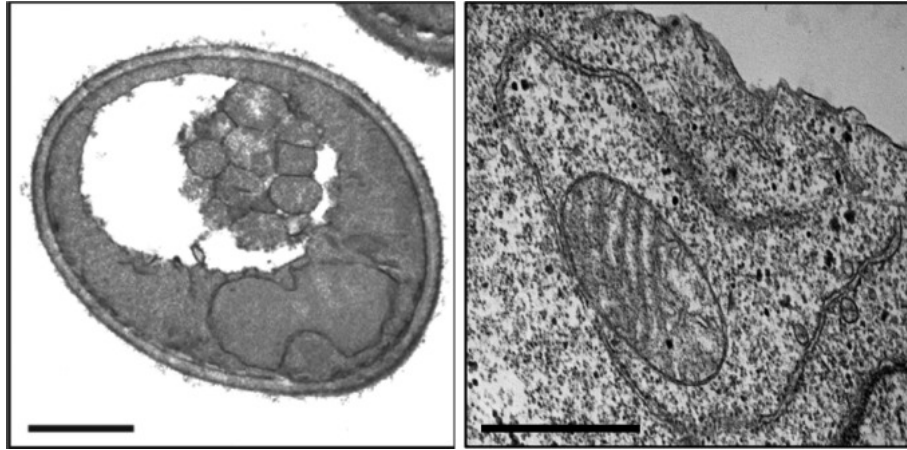
3.1 Autofagian löytyminen

Belgialainen biokemisti Christian De Duve keksi termin autofagia vuonna 1963 (De Duve 1983). De Duve ja Hänen työryhmänsä löysivät lysosomit nämä yksinkertaisen kalvon ympäröivät soluelimet, jotka sisältävät erilaisia hajottavia entsyymeita. Hän voitti fysiologian Nobelin palkinnon 1974 (De Duve 1983). Autofagia termi syntyi, kun elektronimikroskoopilla havaittiin rotan maksasolun solulimassa kaksimembraanisen vesikkelin (autofagosomin) kuljettavan soluelimiä, kuten mitokondrioita ja osia endoplasmisesta kalvostosta (Klionsky 2008). Tämä uuden tyyppinen vesikkeli fuusioitui lysosomiin siirtäkseen kierrätettävän solumateriaalin sinne hajotettavaksi. Aikaisempien löydösten perusteella de Duve ja hänen työryhmänsä olivat varmoja, että glukagoni hormonin läsnäolo käynnisti autofagian (Ohsumi 2014). Muut tutkijat löysivät myöhemmin hormonaalisen ja entsyymaattisen säätely mekanismit autofagiassa, kuten 3-metyyliadeniinin inhiboinnin merkityksen. De Duven mielestä autofagia saattoi olla selektiivistä (Ohsumi 2014).

Autofagian löytymisen jälkeen moni tutkimus epäonnistui, koska ei pystytty ymmärtämään molekyyllitasolla, kuinka kierrätysmekanismi toimii. Vuonna 1992 tapahtui kuitenkin läpimurto tutkimuksessa, kun saavutettiin ensimmäinen morfologinen havainto non-selektiivisestä autofagiasta hiivassa (Baba ja muut 1994). Se johti peräkkäisten autofagiaa säätelevien geenien löytymiseen hiivasta ja paljasti erityisiä molekyyliä, jotka olivat vastuussa membraanin dynamiikasta autofagian aikana (Ohsumi 2014). Autofagiaa sääteleviä genejä alkoi löytymään muistakin organismeista. Ymmärrettiin, että näin keskeisen mekanismin oli toimittava myös eukaryoottisissa soluissa. Nämä löydökset toivat mullistavan harppauksen eteenpäin autofagian tutkimuksessa. Viimeiset kymmenen vuotta autofagian tutkimuksessa ja ymmärryksessä on edistytty, ei vain ainoastaan molekyyli ja mekanismi tasolla, vaan myös autofagian fysiologisesta merkityksestä terveydessä ja eri sairauksissa (Ohsumi 2014).

3.2 Nobelin palkinto 2016

Vuonna 2016 japanilainen solubiologi Yoshinori Ohsumi sai fysiologian tai lääketieteen Nobelin palkinnon selvitettyään autofagian biokemiallisen mekanismin leivontahiivassa (Levine ja Klionsky 2016; kuva 2.). Ohsumi ja hänen työryhmänsä löysivät vuonna 1992 autofagiaan kuuluvia ”osia” *Saccharomyces cerevisiae* hiivan vakuolista sen ollessaan ilman ravinteita (Baba ja muut 1994). Tämä oli ensimmäinen havainto epäselektiivisestä autofagiasta hiivasolussa. Näännyttämällä hiivamutanteja, joista oli poistettu vakuolissa olevat hajotuksesta vastaavat entsyymit, pystyttiin stimuloimaan autofagiamekanismia. He huomasivat, että hiivasolun vakuoli alkoi täyttymään vesikkeleistä eli autofagosomeista (kuva 2.). Menetelmä todisti autofagian tapahtumisen hiivasoluissa ja mahdollisti autofagian toiminnan kannalta keskeisimpien geenien tunnistamisen (Tsu-kada ja Ohsumi 1993). Tutkimalla hiivakantoja, jotka kerryttivät autofagosomeja vakuoliin paastotilassa, pystyttiin säätelemään autofagiasta vastaavien geenien (ATG) toimintaa. Autofagian toimintamekanismin selvittäminen hiivasolussa, johti päätelmään, että autofagia toimii myös muissa organismeissa, kuten esimerkiksi eläinsoluissa.



Kuva 2. Elektronimikroskoopi kuvat autofagiasta hiiva- ja nisäkässolussa. Vasemmalla on kuvattuna hiivasolussa (*S. cerevisiae*) tapahtuva autofagia, jossa havaitaan autofagiaan liittyviä rakenteita vakuolin sisällä typen puutostilassa. Oikeassa kuvassa on kuvattuna autofagosomin muodostuminen aminohappojen puutostilassa olevassa ihmisen rintasyöpäsolussa (Levine ja Klionsky 2016).

4. MEKANISMI

Makroautofagia on tutkituin ja merkittävin sytoplasminen proteiinien hajoitusreitti, jossa sytoplasman kierrätettävä solumateriaali tuodaan kaksoismembraanisen autofagosomin sisällä lysosomiin hajotettavaksi (Bento ja muut 2016) Reaktio alkaa nukleatiolla, jota edeltää solun ravinneainepuutos. Fagofori muodostuu sen substraattien avustuksella. Fagoforin päät pitenevät vesikkelin muotoon (elongaatio), jota kutsutaan autofagosomiksi. Autofagosomi fuusioituu lysosomiin, jossa sen sisältö hajotetaan hydrolaasien toimesta. Autofagiaa säätelevät siihen liittyvät geenit ja ravintoainesensorit (Bento ja muut 2016).

4.1 Ravintosensorit mTOR ja AMPK

Jo aikaisissa tutkimuksissa on havaittu, että ravinteiden saatavuus ja hormonaaliset muutokset liittyen syömiseen ovat keskeisessä roolissa autofagian säätelyssä koe-eläinten maksasoluissa (Mortimore 1970). Analyysit lysosomivälitteisestä proteiinin hajotuksesta *in vivo* paljastavat, että glukagonin erityis stimuloi autofagiaa ja insuliini toimii potentiaalisena inhibiittorina reaktiossa (Mortimore 1970). Laajat tutkimukset osoittavat ravitsemuksellisen tilan ja autofagian yhteydestä, joita säätelevät solunsisäiset

ravintosensorit (Singh ja Cuervo 2011). Makroautofagian tutkimuksissa on todistettu, että yksi tärkeimmistä ravintosensoreista ja solukasvun säätelijöistä on mTOR (nisäkkäillä) ja TOR (hiivoilla). Tämä kinaasi aistii aminohappo-, insuliini- ja ATP -tasoja elimistössä ja estää makroautofagian käynnistymisen, jos ravinteita on saatavilla (Kanazawa ja muut 2004). Hiivassa TOR fosforyloi suoraan ATG13 geenin varmistaakseen, ettei se pääse vaikuttamaan muiden ATG proteiinien kanssa, jotta autofagosomin muodostuminen on mahdollista (Huang ja Klionsky 2002). Nisäkkäillä ravintoaineiden ja insuliinin matala taso inaktivoi mTOR kinaasin. Ravintosensori mTORin inaktivaatio johtaa autofagian käynnistymiseen ja autofagosomin muodostumiseen (Singh ja Cuervo 2011). Tämä mTORin inhibitio ja autofagian aktivaatio tapahtuu silloin, kun esimerkiksi solulla on tarve poistaa vaurioituneita soluelimiä lysosomaaliseen hajotukseen (Kiffin ja muut 2004).

Toinen tärkeä ravintosensori on AMPK, joka aistii soluenergian (ATP) tasoa saavuttaakseen solussa energiahomöostaasin (Hardie 2007). Ravintoaineiden puutostilassa AMP/ATP suhde nousee ja se johtaa ULK-1 fosforylaatioon. Tutkimukset osoittavat AMPK:lla on tärkeä rooli autofagian käynnistymisessä. Pohjimmainen mekanismi kuinka AMPK säätelee autofagiaa on vielä osin epäselvä. Oletetaan kuitenkin, että AMPK stimuloi autofagiaa inhiboimalla mTOR1 kompleksin, fosforyloimalla Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2):n (Inoki ja muut 2003.) ja Regulatory-associated protein of mTOR (RPTOR):n, joka on osa mTOR kompleksia (Gwinn ja muut 2008.).

4.1.2 Käynnistyminen

Autofagia käynnistyy, kun useat signaalireitit aistivat erilaisia stressisignaaleja ravintoainepuutoksista taudinaiheuttajiin ja matalaan soluenergian määrään. Autofagian molekulaariseen mekanismiin liittyy useita ATG proteiineja, joista useimmat on tunnistettu hiivassa (Tsukada ja Ohsumi 1993). Autofagian käynnistymiseen liittyy myös vahvasti Sirt1, NAD⁺ riippuvainen deasetylaasi (Sirt-1) (Finkel ja muut 2009). Autofagosomin syntyyn liittyy kaksi tärkeää proteiinikompleksia nisäkkäillä. Serini/treoniinikinaasi ULK-1 (homologinen hiivan ATG1:lle) ja Beclin-1 (homologinen hiivan ATG6:lle), joka sisältää luokan III PI3 kinaasin (Suzuki ja Ohsumi 2007). ULK-1 kompleksi muodostuu, kun

ravintosensorikompleksi mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) on inhi-
boitunut. Se vaatii aktivoituakseen ATG 13, focal adhesion kinase interacting protein 200
kDa (Fip200) ja ATG 101 -proteiinit (Kim J ja muut 2011). Ravintoaineiden, kasvutekijöi-
den, sekä AMP:n ja ATP:n suhdetta aistii mTORC1 ja AMPK, joka myös säätelee ULK-1/2
toimintaa fosforylaatiolla. AMPK aktivoituu, kun AMP sitoutuu allosteerisesti molekyy-
liin ja treoniini 172 (Thr172) fosforyloituu. Reaktio johtaa ULK-1 aktivoitumiseen (Kim ja
muut 2011).

4.1.3 Autofagosomin nukleaatio

Nukleaatio aloittaa autofagosomin muodostumisen. Fosfoinositide 3-kinase (PI3K)
kompleksin aktivointi edistää vesikkelin nukleaatiota autofagosomin muodostumisessa.
Tähän kompleksiin kuuluvat Beclin-1 proteiini (ATG6 hiivassa), PI3K ja vakuoliset prote-
iinit Vps34 ja Vps15. Beclin-kompleksiin voi myös kuulua muita proteiineja, kuten acti-
vation molecule in Beclin-1 regulated autophagy (AMBRA1) ja ultraviolet irradiation re-
sistance associated gene (UVRAG), jotka avustavat Vps35:n aktivaatiota autofagosomin
muodostumisessa (Funderburk ja muut 2010). ULK-1 aktivoi Beclin-1:n fosforyloimalla
sen (Russell ja muut 2013). Kompleksi toimii kuten PI3-Kinaasi ja se valmistaa PIP3 :sta
fosforyloimalla fosfatidylinositol 2-Phosphate (PIP2):n. PIP3 konsentraation kasva-
essa, phosphoinositide-interacting proteins (WIPI) proteiinien järjestäytyminen fagofori
membraanille lisääntyy (Lamark ja muut 2009). Membraanille järjestäytyy myös muita
proteiineja, kuten p62 ja NBR1, jotka toimivat substraattien tunnistusreseptoreina
membraanilla. Nämä reseptorit toimivat myös UPS – proteasomisysteemin ja autofagian
välisessä vuorovaikutuksessa (Lamark ja muut 2009).

4.1.4 Elongaatio ja autofagosomin muodostuminen

Fagoforin elongaatioon (pidentymiseen) tarvitaan ubikitiinin kaltainen konjugaatio jär-
jestelmä. ATG12-ATG5-ATG16 avustavat pre-autofagosomin membraanin pidentymi-
sessä (Bento ja muut 2016). Autofagosomin muodostumiseen tarvitaan myös mikrotu-
bulus avusteinen proteiini LC3 (ATG8 hiivalla). Kysteiini proteaasi ATG4 muuttaa LC3:n
sytosoliseen LC3-1 muotoon membraanille. LC3-1 aktivoidaan ATG7-ATG3 ja PE
(phosphatidylethanolamine) lipidin avustuksella, joiden tehtävänä on ankkuroida

membraania yhä pitemmäksi konjugoituneeksi LC3-2 muodoksi (lipidimuoto). Tapahtumasarja johtaa fagoforin membraanin päiden sulkeutumiseen ja kypsän kaksimembraanisen autofagosomin muodostumiseen (Bento ja muut 2016).

4.1.5 Lysosomiin fuusioituminen ja autolysosomin muodostuminen

Kypsät autofagosomit liikkuvat nopeasti kohti lysosomeja. Ulkoisen membraanin kohdattessaan autofagosomit fuusioituvat lysosomiin muodostaen autolysosomin. Kierrätettävä solumateriaali vapautuu lysosomien hydrolaasien ja cathepsiini-proteasien hajotettavaksi (Coutts 2016). Autofagosomin ja lysosomin fuusiosta tiedetään vielä hyvin vähän mutta oletetaan, että myöhäiset endosomit fuusioituvat lysosymien kanssa normaalissa endosytoottisessa reaktiossa, joten voidaan päätellä, että samankaltainen mekanismi toimii myös autofagosomin ja lysosomin välisessä fuusiossa. Fuusiota säätelee autofagosomin membraanilla SNARE-proteiinit ja GTPaasi (Rab7) (Coutts 2016). Rab7 proteiinia on tutkittu hiirillä, hiivoilla ja hedelmäkärpäksillä. Tutkimukset ovat osoittaneet, että kun Rab7 proteiini vaimennetaan hiivoilla ja hedelmäkärpäksillä, johtaa se autofagosomien akkumulaatioon, koska fuusiota ei pääse tapahtumaan (Kirisako ja muut 1999). Voidaan olettaa, että Rab7 on merkittävässä roolissa autofagosomin fuusion säätelyssä.

5. AUTOFAGIA JA SAIRAUDET

Autofagian tehtävänä on huolehtia siitä, että proteiinit eivät pääse kertymään liikaa ja soluelinten uudistuminen on tasaista. Jos tähän kierrätysjärjestelmään tulee häiriö esimerkiksi ikääntyessämme, johtaa se epänormaaliin solujen kasvuun, solukuolemaan tai erilaisiin sairauksiin (Klionsky ja Emr 2000).

5.1 Autofagia ja ikääntyminen

Solutason toiminnot heikkenevät ikääntymisen myötä. Se kuinka makroautofagia vähenee iän myötä, on vielä suurimmaksi osaksi tuntematonta. Yksi mahdollisuus on se, että

kierrätettävän materiaalin tunnistukseen on tullut häiriö ja näin ollen autofagia ei pystyisi keräämään vaurioituneita organelleja hajotukseen.

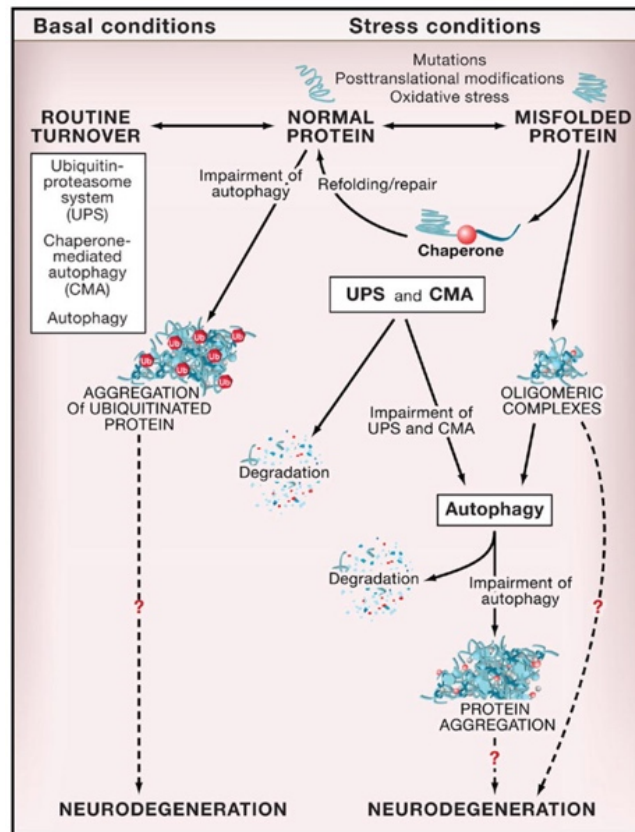
Autofagian käynnistymisen kannalta tärkeimmät proteiinit, kuten ATG proteiinit ja Sirtuin1:n ilmentyminen on vähentynyt ikääntyneissä kudoksissa. Tämä ilmenee esimerkiksi ihmisen ikääntyvissä aivoissa (Lipinski ja muut 2010). Genome-wide analyysissä on havaittu, että ATG5, ATG7 ja Beclin 1 säätely on huomattavasti vähentynyt (Lipinski ja muut 2010), insuliiniresistenssi- ja metabolisen oireyhtymän tiloissa, joissa Sirtuin1 säätely vähentynyt (Kreutzenberg ja muut 2010), sekä osteoartriitissa (nivelrikko), jossa ULK1, Beclin1 ja LC3 säätely on puutteellista (Carames ja muut 2010). Ikääntymisestä johtuvaa autofagia proteolyysin heikkenemistä on tavattu jyrsijöillä *in vivo* sekä jyrsijöistä eristetyissä maksasoluissa *in vitro* (Bergamini ja muut 1993).

Hiivojen (*Saccharomyces cerevisiae*) elinikä lyhenee, jos autofagiassa tai siihen vaikuttavissa geeneissä on toimintahäiriö tai niiden toiminta on estetty. Toiminnalliset puutokset ATG1, ATG7, ATG18 ja Beclin1- proteiineissa sukkulamadon (*Caenorhabditis elegans*) mutanteissa, ovat myös yhteydessä lyhyempään elinikään (Toth ja muut 2008). Mutatio *C.elegans* sukkulamadon phosphatidylinositol 3-kinase *age-1* (*age-1*) geenissä ja insuliini/insuliininkaltaisen kasvutekijää (IGF-1) koodaavassa *daf-2* geenissä on havaittu pidentävän elinikää (Toth ja muut 2008). Havaintoja on tehty myös hedelmäkärpäsellä *Drosophila melanogaster*, kun ATG1 ja ATG8 geenit hiljennettiin, kärpästen elinikä lyheni huomattavasti (Simonsen ja muut 2008). Hiirillä autofagian kannalta välttämättömien ATG proteiinien sammuttaminen on letaali syntymän jälkeisenä ajanjaksolla, koska autofagia on vastuussa solunsisäisen energian varastoinnista emosta vieroittamisen aikana (Levine ja Kroemer 2008).

5.2 Proteiinien hajotussysteemit

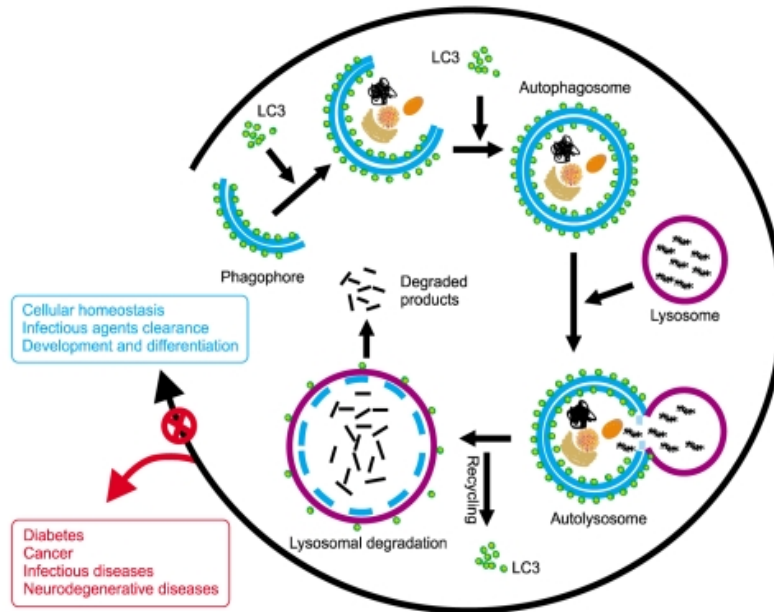
Eukaryoottisissa soluissa vallitsee kaksi tärkeää proteiinien hajotussysteemiä ubikitiini proteasomi systeemi UPS, joka keskittyy lyhytikäisiin yksittäisiin proteiineihin ja autofagia-lysosomaalinen systeemi, joka keskittyy pitkäikäisiin proteiineihin ja kokonasiin soluelimiin. Nämä kaksi systeemiä toimii keskenäisessä yhteistyössä. Kun UPS -systeemiin

tulee häiriö, autofagia kompensoi sitä lisäämällä proteiinien hajotusta ja kierrätystä solussa (Nedelsky 2008) (kuva 3). Autofagia toimii perustasolla lähes jokaisessa eukaryoottisessa solussa. Hajotussysteemien toiminta on tärkeää, sillä jos systeemit ovat puutteellisia, alkaa normaalia suurempi proteiinien kertyminen (kuva 3) ja mitokondrioiden epäjärjestäytyminen, joka saattaa johtaa erilaisiin sairauksiin (Hara ja muut 2006).



Kuva 3. Häiriö autofagiassa johtaa ubikitiini proteiini aggregaattien kertymiseen hermosoluissa, joka on yhdistetty neurodegeneratiivisten sairauksien syntyyn. UPS ja autofagia toimivat yhteistyössä. Ikääntymiseen liittyy usein puutoksia molemmissa reaktioissa ja proteiinikertymäsauroksien riski kasvaa. (Levine B. ja Kroemer G. 2008. Auto in the pathogenesis of Disease. Cell. Jan 11; 132(1): 27-42.)

Autofagia ei ole vain vastuussa epänormaalien proteiinien ja soluelinten kierrätyksestä vaan myös infektioita aiheuttavien virusten ja bakteerien eliminoimisesta isännästä (Kuva 4.). Tutkimusta löytyy mm. mycobacterium tuberkuloosista (Gutierrez ja muut 2004.), Streptokokista (Nakagawa ja muut 2004.) ja Herpes simplex viruksesta (Talloczy ja muut 2006.)



Kuva 4. Häiriöt autofagiassa on yhdistetty johtavan useaan erilaiseen sairauteen. Autofagian tehtävänä on säädellä solujen homeostaasia ja jos siihen tulee häiriö, johtaa se erilaisiin sairaustiloihin (Kaipeng J. Why is autophagy important in human diseases? *Exp Mol Med.* 2012 Feb 29; 44(2): 69-72).

5.3 Neurodegeneratiiviset sairaudet

Aivot ovat herkimpiä elimiä vaurioitumaan lysosomaalisista häiriötiloista. Tästä voidaan päätellä, että autofagian toiminta aivoissa nousee tärkeäksi tekijäksi saavuttamaan homeostaasin siellä olevissa proteiineissa (Guo 2018). Koska dendriitit ja aksonit neuroneiden sytoplasmassa ovat kookkaita soluelimiä, niiden kierrätys häiriötilassa on todella vaikeata tai lähestulkoon mahdotonta ilman autofagia mekanismia (Boland ja muut 2008). Ikääntyminen heikentää asteittain neuronien kykyä poistaa jätettä soluista, joka voi johtaa epänormaaliin proteiinien kertymiseen (Fang ja muut 2018).

Tutkimuksissa, joissa autofagiaa säätelevä ATG-geeni on deletoitu tai reaktio inhiboitu, on havaittu elimistön homeostaasin heikkenevän ja sen johtavan mm. neurodegeneratiivisiin sairuksiin (Komatsu ja muut 2006). Hiiren ATG7 geenin deleetio maksasoluissa, ATG5 ja ATG7 geenien deleetio neuroneissa ja ATG5 geenin deleetio sydänlihassoluissa

aiheuttaa upikitiini positiivisten proteiiniagregaattien kertymistilan soluihin (Hara ja muut 2006).

Neurodegeneratiiviset sairauksien ehkäisemisessä on tärkeää, että kertyvien proteiinien hajotus toimii jatkuvasti perustasolla elimistössä. Esimerkiksi kertyvä amyloid- β (A β) peptidi ja tau proteiini Alzheimerin taudissa, α -synukleiini Parkinsonin taudissa ja huntingtiini Huntingtonin taudissa (Rahman ja Heywhon 2017).

6. YHTEENVETO

Autofagian prosessi on tunnettu 1960-luvulta lähtien. Sitä on tutkittu elektronimikroskoopilla ja biokemiallisin menetelmin pitkään, mutta monia vuosia sen molekulaariset reaktiotiet ja tärkeimmät avainmolekyylit olivat tuntemattomia. 1990-luvun lopussa kolme tutkimusryhmää onnistui kuitenkin löytämään ensimmäiset autofagiaa säätelevät geenit hiivasta. Tämä mahdollisti ensimmäistä kertaa jäljittämään autofagia reaktiota reaaliajassa ja opittiin tunnistamaan autofagian fysiologinen merkitys. Tämän hetkisen ymmärryksen mukaan autofagian rooli erilaisissa sairauksissa on hahmottunut yhä paremmin. Vaikkakin tietyt yhteydet sairauksiin ovat vielä tuntemattomia, reaktioon osallistuvien molekyylien ja reittien tunnistaminen on tuonut uusia fysiologisia näkökulmia sairauksien hoitoon ja patofysiologiseen mallintamiseen. Tulevaisuudessa tutkimus tulee laajentumaan mikroRNA tutkimukseen autofagiassa, koska sen katsotaan olevan tärkeässä roolissa sairauden diagnostiikassa.

Ikääntyminen vähentää solujen kykyä korjata vaurioita ja hallita homeostaasia. Tämä johtaa vaurioituneiden solurakenneseiden kertymiseen ja sitä kautta ikääntymiseen liittyvien sairauksien riski kasvaa. Vuosikymmenien aikana tutkimuksissa on selvinnyt, että ikääntymisprosessi liittyy vahvasti geeneihin ja varsinkin metabolisesta signaaloinnista vastaaviin geeneihin. Monet näistä geeneistä mukaan lukien ravintosensorit kuten mTOR ja AMPK ovat tärkeässä roolissa autofagian säätelyssä. Autofagian kyky poistaa vaurioituneita makromolekyylejä sekä myrkyllistä materiaalia solusta ja käyttämään sitä vaihtoehtoisena ravinnonlähteenä on tärkeää, jotta solussa valitsee homeostaasi. Se

lisää solun ikää, koska solu kykenee selviytymään tämän mekanismin avulla nopeammin solussa tapahtuvista vaurioista.

On selvää, että emme vielä täydellisesti ymmärrä kaikkia autofagian vaiheita ja erilaisia säätelytekijöitä. Kun tulevaisuudessa löydämme kaikki avaintekijät, jotka reaktioon kuuluu, voimme täydellisesti ymmärtää, kuinka mekanismi toimii ja kuinka se tulee edistämään terveellistä ikääntymistämme. Autofagian tutkiminen ja ymmärtäminen johtaa myös uusien hoitomuotojen kehitykseen erilaisissa sairauksissa.

LÄHTEET

Baba M, Takeshige K, Baba N, Ohsumi Y (1994) Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J Cell Biol. Mar;124(6):903-13.*

Baehrecke EH (2005) Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol. 6(6):505-10.*

Bento C.F, Renna M, Ghislat G, Puri C, Ashkenazi A, Vicinanza M, Menzies F.M, Rubinsztein DC (2016) Mammalian Autophagy: How Does it work? *Annu Rev Biochem. Jun 2;85:685-713.*

Bergamini E, Del Roso A, Fierabracci V, Gori Z, Masiello P, Masini M, Pollera M (1993) A new method for the investigation of endocrine-regulated autophagy and protein degradation in rat liver. *Exp Mol Pathol. Aug;59(1):13-26.*

Boland B, Kumar A, Lee S, Platt MP, Wegiel J, Yu WH, Nixon RA (2008) Autophagy Induction and Autophagosome Clearance in Neurons: Relationship to Autophagic Pathology in Alzheimer's Disease. *J Neurosci. Jul 2; 28(27):6926-37.*

Carames B, Taniguchi N, Otsuki S, Blanco FJ, Lotz M (2010) Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis. *Arthritis Rheum. Mar;62(3):791-801.*

Cuervo AM, Knecht E, Terlecky SR, Dice JF (1995) Activation of selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am J Physiol. Nov;269(5 Pt 1):C1200-8.*

De Duve C (1983) Lysosomes revisited. *Eur J Biochem. Dec 15;137(3):391-7.*

De Kreutzenberg SV, Ceolotto G, Papparella I, Bortoluzzi A, Semplicini A, Dalla Man C, Cobelli C, Fadini GP, Avogaro A (2010) Downregulation of the longevity-associated protein sirtuin 1 in insulin resistance and metabolic syndrome: potential biochemical mechanisms. *Diabetes Apr*;59(4):1006-15

Eskelinen E-L (2008) New Insight into the Mechanisms of Macroautophagy in Mammalian Cells. *International Review of Cell and Molecular Biology. Volume 266. pages 207-247.*

Finkel T, Deng CX, Mostoslavsky R (2009) Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature Jul 30*;460(7255):587-91.

Funderburk SF, Wang QJ, Yue Z (2010) The Beclin-1-VPS34 complex at crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol. Jun*;20(6):355-62

Ghosh R and Pattinson SJ (2018 Jan 18) Macroautophagy and Chaperone-Mediated Autophagy in Heart failure: The Known and the Unknown. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Volume 2018, 22 pages.*

Guo F, Liu X, Cai H, Le W (2018) Autophagy in Neurodegenerative Diseases: Pathogenesis and Therapy. *Brain Pathol. Jan*; 28(1): 3-13.

Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V (2004) Autophagy is a defence mechanism inhibiting BCG an Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell. Dec*; 119(6):753-66.

Gwinn DM, Schackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell Apr 25*;30(2):214-26.

Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature. Jun 15*; 441(7095):885-9.

Hardie DG (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol. Oct*;8(10):774-85.

Huang WP, Klionsky DJ (2002) Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell Struct Funct. Dec*;27(6):409-20.

Inoki K, Zhu T ja Guan KL (2003) TSC mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell. Nov 26*; 115(5):577-90.

Joungmok K (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.13(2)*: 132-141.

Kanazawa T, Taneike I, Akaishi R, Yoshizawa F, Furya N, Fujimura S, Kadowaki M (2004) Amino acids and insulin control autophagic proteolysis through different signalin pathways in relation to mTOR in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem. Feb 27;279(9):8452-9.*

Kiffin R, Christian C, Knecht E, Cuervo AM (2004) Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Biol Cell. Nov;15(11):4829-40.*

Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol. Feb;13(2):132-41.*

Kirisako T, Baba M, Ishihara N, Miyazawa K, Ohsumi M, Yoshimori T, Noda T, Ohsumi Y (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol. Oct 18;147(2):435-46.*

Klionsky DJ (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science. 290(5497):1717-21.*

Klionsky DJ (2008) Autophagy revisited: a Conversation with Christian de Duve. *Autophagy. Aug;4(6):740-3.*

Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2006) Loss of autophagy in centrl nervous systems causes neurodegeneration in mice. *Nature. Jun 15;441(7095):880-4.*

Kundu Mondira ja Thompson Craig B (2008) Autophagy: Basic Principles ans Relevance to Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. Volume 3, 2008, pp 427-455.*

Lamark T, Kirkin V, Dikic I, Johansen T (2009) NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell Cycle Jul 1;8(13):1986-90.*

Levine B ja Klionsky DJ (2016) Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker's yeast fuel advances in biomedical research. *Proc Natl Acad Sci USA. Jan 10; 114(2):201-205.*

Levine B and Kroemer G (2008) Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell 132(1): 27-42.*

Li WW (2012) Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci.*

Liou Willisa, Geuze Hans J, Geelen Math. J.H, Slot Jan W (1997). The Autophagic and Endocytic Pathways Converge at the Nascent Autophagic Vacuoles. *Journal of Cell Biology Home, Archive, 13 January, 136(1):61.*

Lipinski MM, Zheng B, Lu T, Yan Z, Py BF, Ng A, Xavier RJ, Li C, Yanker BA, Scherzer CR, Yan J (2010) Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in

normal brain aging and in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. Aug 10;107(32):14164-9.

Massey AC, Zhang C, Cuervo AM (2006) Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol*. 73:205-35.

Mortimore GE, Mondon CE (1970) Inhibition by insulin of valine turnover in liver. Evidence for a general control of proteolysis. *J Biol Chem*. May 10;245(9):2375-83.

Nagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, Nara A, Funao J, Nakata M, Tsuda K, Hamada S, Yoshimori T (2004) Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science*. Nov 5; 306(5698): 1037-40.

Nedelsky N.B, Todd PK, Taylor JP (2008) Autophagy and the ubiquitin-proteasome system: collaborators in neuroprotection. *Biochim Biophys Acta*. Dec. 1782(12):691-9.

Ohsumi Y (2011) Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res*.

Rahman A & Heywhon R (2017) Therapeutic implication of autophagy in neurodegenerative diseases. *BMB Rep*. 50(7): 345-354.

Russel RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan KL (2013) ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating Vps34 lipid kinase. *Nat Cell Biol*. Jul;15(7): 741-750.

Simonsen A, Cumming RC, Brech A, Isakson P, Schubert DR, Finley KD (2008) Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult Drosophila. *Autophagy* Feb;4(2):176-84.

Singh R, Cuervo AM (2011) Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab*. May 4;13(5):495-504.

Suzuki K, Ohsumi Y (2007) Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 581(11):2156-61.

Taloczy Z, Virgin HW, Levine B (2006) PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy*. Jan-Mar; 2(1):24-29.

Toth ML, Sigmond T, Borsos E, Bama J, Erdelyi P, Takacs-Vellai K, Orosz L, Kovacs AL, Csikos G, Sass M, Vellai T (2008) Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* Apr;4(3):330-8.

Tsukada M ja Ohsumi Y (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. Oct 25;333(1-2):169-74.

Van Der Vaart A, Griffith J, Reggiori F (2010) Exit from the Golgi is required for the expansion of the autophagosomal phagophore in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. Jul 1;21(13):2270-84.