



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής

Τίτλος πτυχιακής εργασίας:

«Μηχανισμοί Αυτοφαγίας που Ενεργοποιούνται λόγω Έλλειψης
Διατροφικών Παραγόντων»

Πτυχιακή Εργασία
Γάτσιου Αικατερίνη

Τριμελής Επιτροπή
Τέντα Ρωξάνη
Σκοπούλη Φωτεινή
Γιαννακούρης Νίκος

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2012

Κενή

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αυτοφαγία είναι η διαδικασία κατά την οποία συστατικά του ίδιου του κυττάρου αποδομούνται στο λυσόσωμα. Η μακροαυτοφαγία που είναι η πιο γνωστή μορφή αυτοφαγίας περιλαμβάνει την απομόνωση κυτταροπλασματικού υλικού σε κυστίδια διπλής μεμβράνης, τα αυτοφαγοσώματα, τα οποία συντήκονται με το λυσόσωμα για να ακολουθήσει η αποδόμηση του φορτίου τους. Τα συστατικά που προκύπτουν επιστρέφουν στο κυτοσόλιο για να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες πορείες. Σε κανονικές συνθήκες διεξάγεται σε ένα βασικό ρυθμό για να απομακρύνει μακρόβιες ή/και ελαττωματικές πρωτεΐνες και οργανίδια. Σε στρεσογόνες συνθήκες, όπως η έλλειψη θρεπτικών συστατικών ή αυξητικών παραγόντων, οξειδωτικό στρες κ.α. προάγεται ως κυτταροπροστατευτικός μηχανισμός που αποσκοπεί στην επιβίωση του κυττάρου. Η αυτοφαγία ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των θρεπτικών συστατικών, μέσω ποικίλων οδών μεταγωγής μηνύματος. Και η αυτοφαγία όμως ρυθμίζει το μεταβολισμό, ενώ συμμετέχει σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες όπως η ρύθμιση της όρεξης, η διαφοροποίηση των κυττάρων, η έκκριση ινσουλίνης. Η μη φυσιολογική ροή της αυτοφαγίας σχετίζεται με παθολογικές καταστάσεις, όπως νευροεκφυλιστικές ασθένειες, σακχαρώδη διαβήτη και παχυσαρκία. Δεδομένου ότι τα θρεπτικά συστατικά ρυθμίζουν την αυτοφαγία, υπάρχει προοπτική για τη διαμόρφωση διατροφικών σχημάτων με σκοπό την κατεύθυνση της πορείας στα πλαίσια της εφαρμογής της αυτοφαγίας σε στρατηγικές αντιμετώπισης των διάφορων ασθενειών.

Λέξεις κλειδιά: αυτοφαγία, αυτοφαγοσώματα, mTOR, νηστεία, PI3K (κινάση της 3 φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης)

ABSTRACT

Autophagy is a catabolic process in which cellular components are degraded in the lysosome. During macroautophagy which is the best characterized type of autophagy, double-membrane vesicles, the autophagosomes, sequester cytoplasmic material and fuse with the lysosome. Subsequently autophagosome's cargo is degraded and the products return to the cytoplasm to be used in various pathways. Under normal conditions autophagy is maintained in a basal rate eliminating long-lived and/or damaged proteins and organelles. Under stress conditions, like nutrient or growth factor deprivation, oxidative stress etc, autophagy is induced as a cytoprotective mechanism to ensure cell survival. Autophagy is regulated by various factors, including nutrients, through different signaling pathways. Autophagy also regulates metabolism and participates in physiological functions, such as regulation of food intake, cellular differentiation, insulin secretion. Defective autophagy is implicated to a variety of pathologies, including neurodegeneration, diabetes and obesity. Since nutrients regulate autophagy it is possible in the future to be evolved a dietetic strategy to achieve the manipulation of autophagy in treating diseases.

Key words: autophagy, autophagosomes, mTOR (mammalian target of rapamycin), starvation, PI3K (phosphatidylinositol 3kinase)

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	σελ. 3
Abstract.	σελ. 4
1 Εισαγωγή.....	σελ. 7
1.1: Τι είναι η αυτοφαγία	σελ. 8
1.2: Είδη αυτοφαγίας	σελ. 9
1.3: Λειτουργίες αυτοφαγίας.....	σελ. 14
1.4: Τα στάδια της αυτοφαγίας	σελ. 16
1.5: PAS	σελ. 17
1.6: Αυτοφαγία στα κύτταρα των θηλαστικών	σελ. 17
2 Μοριακός μηχανισμός της αυτοφαγίας	σελ. 18
2.1: Το σύμπλοκο της Class III PI3K.....	σελ. 22
2.1.1: Beclin 1	σελ. 22
2.2: ULK σύμπλοκο	σελ. 25
2.3: Τα δυο ubiquitin –like συστήματα σύζευξης	σελ. 27
2.3.1: Atg12-Atg5-Atg16L.....	σελ. 28
2.3.2: LC3 II- PE	σελ. 29
2.4: mAtg9 και VMP1.....	σελ. 31
2.5: Πρωτεΐνες WIPI	σελ. 32
2.6: Ωρίμανση των αυτοφαγοσωμάτων- σύντηξη με το λυσόσωμα.....	σελ. 32
3 Ρύθμιση της αυτοφαγίας.....	σελ. 35
3.1: mTOR.....	σελ. 35
3.1.1: Μηχανισμός επαγωγής της αυτοφαγίας από το mTORC1	σελ. 38
3.1.2: Ρύθμιση της mTOR- οδοί μεταγωγής μηνυμάτων προς την mTOR	σελ. 40
3.1.2.1: Αυξητικοί παράγοντες.....	σελ. 42
Η πορεία PI3K- Akt-mTORC1	σελ. 43
Ras.....	σελ. 45
S6K	σελ. 46
3.1.2.2: Επίπεδα ενέργειας – AMPK.....	σελ. 47
3.2: Γλυκόζη.....	σελ. 50
3.3: Αμινοξέα	σελ. 51
Οι Rag GTPάσες	σελ. 53
MAPK	σελ. 54
Vps34	σελ. 56
IPMK.....	σελ. 56
3.4: Υποξία.....	σελ. 58
REDD1	σελ. 58
Hif1.....	σελ. 58
AMPK	σελ. 59
3.5: Οξειδωτικό στρες.....	σελ. 59
3.6: ER stress.....	σελ. 62
3.7: Γενοτοξικό στρες- p53.....	σελ. 63
3.8: Vps 34.....	σελ. 63
3.9: Ρύθμιση της αυτοφαγίας με πορείες ανεξάρτητες από το mTORC1.....	σελ. 64
Η πορεία της φωσφοϊνοσιτόλης.....	σελ. 64
cAMP- Epav-PLCε-IP3 πορεία.....	σελ. 65
Ca ²⁺ - καλπαΐνη- Gsa πορεία.....	σελ. 65
3.10: Κυτοσολικό Ca.....	σελ. 66
3.11: FOXO3.....	σελ. 67

3.12: Μηχανισμοί ανατροφοδοτικής ρύθμισης.....σελ.	68
Αναστολή τελικών προϊόντων.....σελ.	68
S6K.....σελ.	68
DAP1.....σελ.	70
ULK.....σελ.	71
3.13: mTORC2.....σελ.	72
4 Νηστεία- έλλειψη θρεπτικών συστατικών..... σελ.	74
4.1: Οδοί μεταγωγής μηνύματος που ενεργοποιούνται κατά τη νηστεία	σελ. 75
4.2: Προσαρμογή του οργανισμού στη νηστεία-	
Οι μεταβολικές πορείες κατά τη νηστεία	σελ. 77
4.3: Διάσπαση πρωτεϊνών μέσω της αυτοφαγίας..... σελ.	80
4.4: Αυτοφαγία και μεταβολισμός λιπιδίων..... σελ.	81
Λιποφαγία στο ήπαρ..... σελ.	84
Λιποφαγία στο λιπώδη ιστό, Παχυσαρκία	σελ. 87
Ρύθμιση αυτοφαγίας από τα λιπίδια..... σελ.	91
Λιποφαγία στον υποθάλαμο- Έλεγχος λήψης τροφής	σελ. 95
4.5: Αυτοφαγία και μεταβολισμός υδατανθράκων	σελ. 98
Αυτοφαγία γλυκογόνου..... σελ.	98
Αυτοφαγία στα β- κύτταρα του παγκρέατος, επίδραση στην ινσουλίνη σελ.....	99
Αυτοφαγία στην ινσουλινοαντοχή και στο διαβήτη στα β- κύτταρα..... σελ.	101
5.1: Αυτοφαγία και μακροθρεπτικά συστατικά	σελ. 105
5.2: Συστατικά των τροφών που επιδρούν στην αυτοφαγία	σελ. 107
6 : Συμπεράσματα..... σελ.	112
7.1: Παράρτημα..... σελ.	113
7.2: Βιβλιογραφία..... σελ.	125

1 Εισαγωγή

Η αυτοφαγία είναι μια διαδικασία καταβολισμού κατά την οποία συστατικά του ίδιου του κυττάρου διασπώνται στο λυσόσωμα. Οι κύριες μορφές της αυτοφαγίας είναι η μακροαυτοφαγία, η μικροαυτοφαγία και η Chaperone Mediated Autophagy (CMA). Η μακροαυτοφαγία περιλαμβάνει το σχηματισμό κυστιδίων διπλής μεμβράνης τα οποία περικλείουν το προς αποδόμηση υλικό, των αυτοφαγοσωμάτων, τα οποία συντήκονται με το λυσόσωμα για να ακολουθήσει η αποδόμηση του φορτίου. Τα διάφορα συστατικά που παράγονται από τη διάσπαση του υλικού που περικλείεται στα αυτοφαγοσώματα επιστρέφουν στο κυτοσόλιο για να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες πορείες του κυττάρου, όπως η σύνθεση πρωτεϊνών ή η παραγωγή ενέργειας. Η μικροαυτοφαγία δεν περιλαμβάνει το σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων, αλλά το προς αποδόμηση υλικό εγκολπώνεται απευθείας στη μεμβράνη του λυσοσώματος, ενώ η CMA διεξάγεται με τη βοήθεια των συνοδών πρωτεϊνών. Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στη μακροαυτοφαγία που είναι και η πιο μελετημένη πορεία.

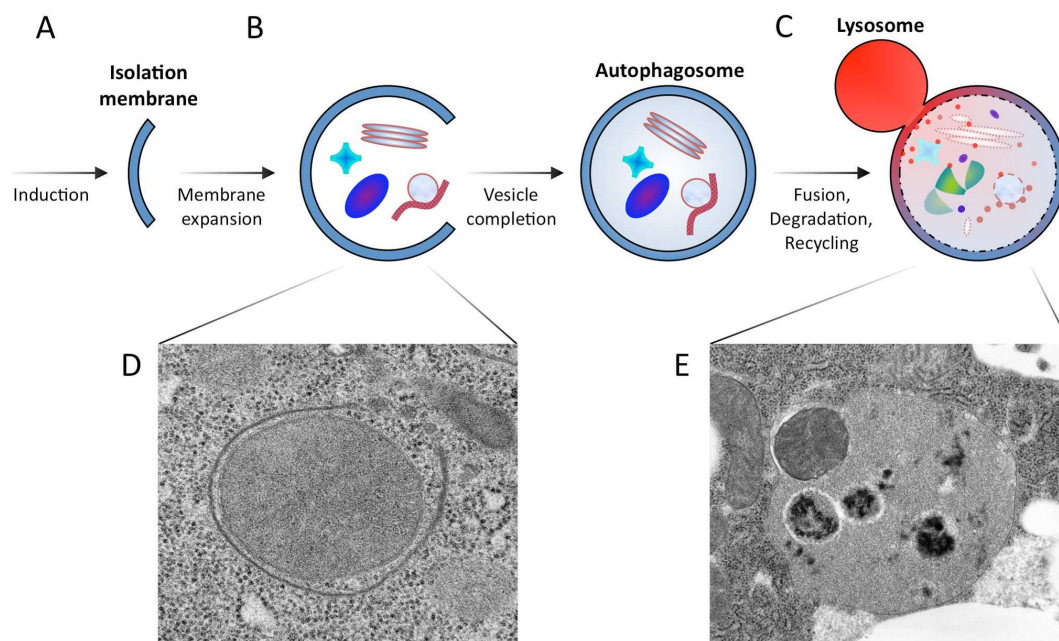
Η μακροαυτοφαγία (ή απλώς αυτοφαγία) μπορεί να είναι μη εκλεκτική, δηλαδή μια διαδικασία μαζικής αποδόμησης κυτταροπλασματικού υλικού, ή εκλεκτική κατά την οποία γίνεται κάποια διαλογή του φορτίου.

Η αυτοφαγία είναι μια διαδικασία που λαμβάνει χώρα σε όλους τους οργανισμούς και σε όλα τα είδη κυττάρων που έχουν μέχρι σήμερα εξεταστεί. Σε κανονικές συνθήκες διεξάγεται σε ένα βασικό ρυθμό και λειτουργεί ως ένας μηχανισμός «ποιοτικού ελέγχου»: απομακρύνει ελαττωματικές ή μακρόβιες πρωτεΐνες, κατεστραμμένα οργάνδια και γενικά συστατικά που μπορεί να είναι επιβλαβή για το κύτταρο. Οι ρυθμοί της αυτοφαγίας αυξάνονται από διάφορους παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν τη δυσλειτουργία του κυττάρου ή είναι απειλητικοί για την επιβίωσή του, όπως η έλλειψη θρεπτικών συστατικών, οξειδωτικό στρες κ.α. Επομένως είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του καλύτερου ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος σε κανονικές συνθήκες, αλλά και ένας μηχανισμός προσαρμογής σε στρεσογόνες συνθήκες.

Η αυτοφαγία έχει ρόλο σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες, όπως ο μεταβολισμός ή η ρύθμιση της όρεξης, ενώ η μη φυσιολογική αυτοφαγική ροή έχει συσχετιστεί με διάφορες ασθένειες, όπως ο διαβήτης, η παχυσαρκία και νευροεκφυλιστικά νοσήματα. Η διαδικασία της αυτοφαγίας υπόκειται στη ρύθμιση πολλών παραγόντων μεταξύ των οποίων σημαντικό ρόλο έχουν τα θρεπτικά συστατικά. Στην εργασία αυτή παρουσιάζονται η διαδικασία και η ρύθμιση της αυτοφαγίας με έμφαση στη ρύθμιση των θρεπτικών συστατικών καθώς και ο ρόλος της αυτοφαγίας σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις.

1.1 Τι είναι η αυτοφαγία

Αυτοφαγία είναι μια καταβολική διαδικασία του κυττάρου κατά την οποία διάφορα συστατικά του κυττάρου, όπως πρωτεΐνες ή και ολόκληρα οργανίδια, απομονώνονται μέσα σε κυστίδια διπλής μεμβράνης, τα αυτοφαγοσώματα, προκειμένου να μεταφερθούν στο λυσόσωμα στο εσωτερικό του οποίου διασπώνται με τη δράση των όξινων λυσοσωμικών υδρολασών. Τα μακρομόρια που προκύπτουν από την αποδόμηση των διάφορων συστατικών επιστρέφουν πίσω στο κυτοσόλιο για να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες πορείες.



Εικόνα 1. Πηγή: (1). Σχηματική απεικόνιση της αυτοφαγίας. D: Ένα σχεδόν ολοκληρωμένο αυτοφαγόσωμα που περικλείει ένα μιτοχόνδριο όπως φαίνεται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. E: Ένα αυτολυσόσωμα που περιέχει διάφορα οργανίδια σε αποδόμηση και ένα ανέπαφο μιτοχόνδριο.

Όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα η διαδικασία της αυτοφαγίας ξεκινά με το σχηματισμό μιας διπλής μεμβράνης, η οποία ονομάζεται φαγοφόρο ή απομονωτική μεμβράνη. Αυτή η διπλή μεμβράνη αναπτύσσεται γύρω από το υλικό που προορίζεται για αποδόμηση και το περικυκλώνει. Με το κλείσιμο της μεμβράνης σχηματίζεται ένα κυστίδιο, το απομονωτικό κυστίδιο ή αυτοφαγόσωμα. Το αυτοφαγόσωμα ακολούθως συντήκεται με το αποδομητικό οργανίδιο του κυττάρου, δηλαδή το λυσόσωμα ή αν αναφερόμαστε σε ζύμες το κενοτόπιο. Αποτέλεσμα της σύντηξης της εξωτερικής μεμβράνης του αυτοφαγοσώματος με τη μεμβράνη του λυσοσώματος είναι να απελευθερωθεί στο εσωτερικό του λυσοσώματος ένα κυστίδιο απλής μεμβράνης που ονομάζεται αυτοφαγικό σώμα (autophagic body). Το αυτοφαγικό σώμα λύεται και το περιεχόμενό του αποδομείται από τα υδρολυτικά ένζυμα του λυσοσώματος. Τα μακρομόρια που παράγονται από τη δράση των υδρολυτικών ενζύμων επιστρέφουν στο

κυτοσόλιο για να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες πορείες του κυττάρου, όπως μεταβολικές βιοσυνθετικές ή για την παραγωγή ενέργειας.

Η πορεία της αυτοφαγίας διατηρείται σε όλους τους οργανισμούς από τις ζύμες έως τον άνθρωπο. Ιδρυτής αυτού του τομέα έρευνας και «θεωρητικός πατέρας» της αυτοφαγίας είναι ο Christian de Duve ο οποίος εισήγαγε και τον όρο «αυτοφαγία» το 1963. Ο ίδιος άλλωστε έλαβε το βραβείο Nobel το 1974 κυρίως για την εργασία του πάνω στο λυσόσωμα το οποίο επίσης ονόμασε (114). Η αυτοφαγία αρχικά ανακαλύφθηκε και περιγράφηκε σε ανώτερα ευκαρυωτικά. Η έρευνα στον τομέα αυτό βασιζόταν κυρίως σε μορφολογικές αναλύσεις από μικροσκοπικές παρατηρήσεις μέχρι το 1992 όταν η ομάδα του Yoshinori Ohsumi επιβεβαίωσε ότι η αυτοφαγική πορεία λαμβάνει χώρα και στις ζύμες (114). Η ανακάλυψη αυτή έδωσε μεγάλη ώθηση στην έρευνα καθώς έδωσε τη δυνατότητα εφαρμογής της γενετικής μηχανικής για τη μελέτη της πορείας. Έτσι με τις έρευνες που ακολούθησαν κυρίως πάνω σε ζύμες αναγνωρίστηκαν τα γονίδια που κατευθύνουν την πορεία, τα οποία ονομάστηκαν ATG γονίδια (Autophagy related genes) και τα προϊόντα τους, δηλαδή οι πρωτεΐνες που διεκπεραιώνουν την πορεία Atg πρωτεΐνες (114). Στο παρελθόν έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι όροι για την αυτοφαγία και ανάλογη ήταν και η ονοματολογία των γονιδίων και πρωτεϊνών, όπως Aut (autophagocytosis), Apg (autophagy), Vps (vacuolar protein-sorting), αλλά τελικά επικράτησε η ονομασία Atg (15). Σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 32 ATG γονίδια τα περισσότερα από τα οποία αρχικά αναγνωρίστηκαν σε ζύμες και κατόπιν βρέθηκαν τα ομόλογά τους σε κύτταρα θηλαστικών.

Τα γονίδια και οι πρωτεΐνες της αυτοφαγίας συνοψίζονται σε πίνακες σε διάφορες ανασκοπήσεις (11,17-19,116), ενώ στη βάση δεδομένων <http://tp-apg.genes.nig.ac.jp/autophagy> παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες της αυτοφαγίας σε διάφορα είδη οργανισμών. Στη βάση δεδομένων <http://www.autophagy.lu/index.html> παρουσιάζονται τα γονίδια και οι πρωτεΐνες της αυτοφαγίας στον άνθρωπο.

1.2 Είδη αυτοφαγίας

Η αυτοφαγία μπορεί να διακριθεί σε διάφορα είδη ανάλογα με:

A. Το είδος του φορτίου των αυτοφαγοσωμάτων σε μη εκλεκτική (μαζική) και εκλεκτική.

Κατά τη μη εκλεκτική ή μαζική αυτοφαγία τα αυτοφαγοσώματα περικλείουν υλικό από το κυτταρόπλασμα που μπορεί να περιέχει διάφορα συστατικά του κυττάρου, όπως πρωτεΐνες ή διάφορα οργανίδια, χωρίς να υπάρχει διαλογή του υλικού που πρόκειται να αποδομηθεί.

Κατά την εκλεκτική αυτοφαγία γίνεται διαλογή του φορτίου που πρόκειται να αποδομηθεί. Η αυτοφαγία λοιπόν μπορεί να αποσκοπεί στην εκλεκτική αποδόμηση μιτοχονδρίων, υπεροξεισωμάτων, τμήματος του ενδοπλασματικού δικτύου κλπ, οπότε ονομάζεται αντίστοιχα μιτο-φαγία, υπεροξεισωματο-φαγία κοκ (89). Ενδεικτικά έχουν περιγραφεί μορφές εκλεκτικής αυτοφαγίας που αποσκοπούν στην αποδόμηση:

Υπεροξεισωματίων (pexophagy)

Μιτοχονδρίων (mitophagy)

Ενδοκυτταρικών βακτηρίων και ιών (xenophagy)

Συσσωματωμάτων πρωτεϊνών (aggrephagy)

Ενδοπλασματικού δικτύου (reticulophagy)

Ενδοσωμάτων (heterophagy)

Ριβοσωμάτων (ribophagy)

Στον πίνακα που ακολουθεί αναγράφονται τα είδη και το φορτίο της εκλεκτικής αυτοφαγίας.

Selective type of autophagy	Cargo	Organism
Aggrephagy	Protein aggregates	Mammals
Cytoplasm-to-vacuole targeting (Cvt) pathway	Pro-aminopeptidase 1 (prApe1), pro- α -mannosidase 1 (prAms1) and aspartyl aminopeptidase (Ape4)	Yeast
ER-phagy/reticulophagy	ER	Yeast and Mammals
Lipophagy	Lipids	Mammals
Lysophagy/Lysosomophagy	Vacuole/Lysosomal membrane	Yeast and Mammals
Mitophagy	Mitochondria	Yeast and Mammals
Nucleophagy	Nucleus	Yeast and Mammals
Pexophagy	Peroxisomes/peroxisome cluster	Yeast and Mammals
Piecemeal-microautophagy of the nucleus (PMN)	Portions of the nucleus	Yeast
Ribophagy	Ribosomes	Yeast
Secretophagy	Atg15 protein	Yeast
Vacuole import and degradation (Vid) pathway	Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase)	Yeast
Xenophagy	Pathogens (bacteria and viruses)	Plants and Mammals

Πηγή:(89) *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13 3621 Table 1. Selective types of autophagy

B. Σε μάκρο- και μικρο- αυτοφαγία.

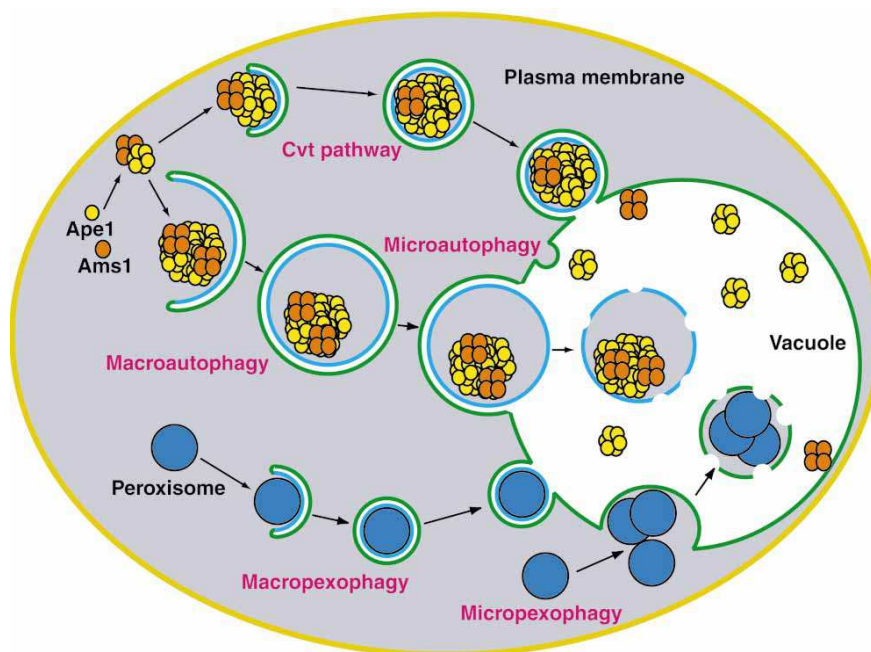
Η μακροαυτοφαγία είναι η διαδικασία εκείνη κατά την οποία σχηματίζονται τα αυτοφαγοσώματα τα οποία ακολούθως συντήκονται με το λυσόσωμα.

Κατά τη μικροαυτοφαγία ουσιαστικά δεν υπάρχει σχηματισμός αυτοφαγοσωμάτων, αλλά το υλικό που πρόκειται να αποδομηθεί εγκολώνεται απευθείας στη μεμβράνη του λυσοσώματος. Η εκλεκτική αυτοφαγία μπορεί να γίνει με τη διαδικασία της μακρο- ή μικρο- αυτοφαγίας, πχ. micro-/macro- pexophagy.

Γ. Cvt: cytoplasm-to-vacuole targeting

Η Cvt πορεία λαμβάνει χώρα στις ζύμες. Αρχικά θεωρήθηκε μια ξεχωριστή πορεία, αλλά σήμερα χαρακτηρίζεται συνήθως ως μια μορφή αυτοφαγίας. Χαρακτηριστικό της είναι ότι είναι μια βιοσυνθετική πορεία, σε αντίθεση με τον καταβολικό χαρακτήρα της κλασικής αυτοφαγίας. Αποσκοπεί στη μεταφορά των πρόδρομων υδρολασών αμινοπεπτιδάση I (Ape1) και α-μαννοσιδάσης (AMS1) στο κενοτόπιο. Αυτές οι κενοτοπικές υδρολάσες συνθέτονται στη μορφή πρόδρομων ενζύμων στο κυτοσόλιο όπου σχηματίζουν ολιγομερή σύμπλοκα. Εγκλείονται στα Cvt-κυστίδια τα οποία είναι όπως και τα αυτοφαγοσώματα κυστίδια διπλής μεμβράνης, αλλά μικρότερα σε μέγεθος (διαμέτρου 140-160nm) και μεταφέρονται στο κενοτόπιο. Η εξωτερική μεμβράνη του Cvt-κυστιδίου συντήκεται με τη μεμβράνη του κενοτοπίου για να απελευθερωθεί στο εσωτερικό του το Cvt-σώματιο. Στο εσωτερικό του κενοτοπίου με τη δράση διαφόρων ενζύμων γίνεται η ωρίμανση των υδρολασών με την απόσπαση του προπεπτιδίου τους. Είναι μια πολύ καλά μελετημένη διαδικασία από τη διερεύνηση της οποίας στα κύτταρα της ζύμης αποκομίσαμε πολλές πληροφορίες για το μηχανισμό της αυτοφαγίας.

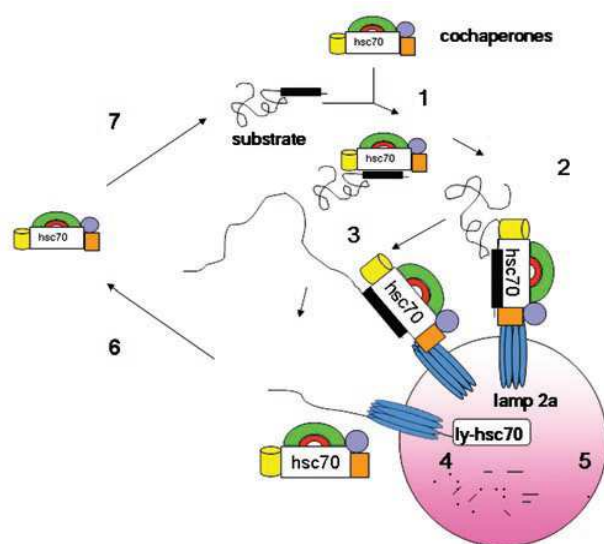
Στην εικόνα 2 απεικονίζονται τα είδη της αυτοφαγίας και η Cvt πορεία στη ζύμη. Η μακροαυτοφαγία, η macropexophagy και η Cvt πορεία περιλαμβάνουν το σχηματισμό απομονωτικών κυστιδίων στο κυτοσόλιο που εγκλείουν μαζικά κυτταρόπλασμα, υπεροξεισώματα ή prApe1 και Ams1 αντίστοιχα. Μετά την ολοκλήρωσή τους τα κυστίδια αυτά συντήκονται με το κενοτόπιο, οπότε στο εσωτερικό του απελευθερώνονται απλής μεμβράνης κυστίδια τα οποία λύνονται και το περιεχόμενό τους εκτίθεται στα ένζυμα του κενοτοπίου από τη δράση των οποίων παράγονται διάφορα μακρομόρια και οι ώριμες υδρολάσες. Κατά τη μικροαυτοφαγία και τη micropexophagy το κυτταρόπλασμα και τα υπεροξεισώματα αντίστοιχα παραλαμβάνονται απευθείας από την επιφάνεια του κενοτοπίου.



Εικόνα 2: Μορφολογία των ειδών της αυτοφαγίας στη ζύμη. Πηγή: (2)

Δ. CMA: chaperone-mediated autophagy

Πρόκειται για μια πορεία αποδόμησης πρωτεϊνών στο λυσόσωμα που έχει παρατηρηθεί σε θηλαστικά, αλλά όχι και στις ζύμες. Είναι μια ιδιαίτερη περίπτωση αυτοφαγίας καθώς δεν περιλαμβάνει τη δημιουργία κυστιδίων και τη μεταφορά τους στο λυσόσωμα. Οι πρωτεΐνες που αποδομούνται είναι κυτοσολικές πρωτεΐνες που έχουν εκτεθειμένη μια αλληλουχία αμινοξέων KFERQ (αλληλουχία Lys- Phe- Glu- Arg- Gln) και αναγνωρίζονται από ένα σύμπλοκο συνοδών-πρωτεϊνών (molecular chaperone complex). Το υπόστρωμα και οι συνοδοί-πρωτεΐνες δεσμεύονται στη μεμβράνη του λυσοσώματος, στον υποδοχέα Lamp2a (lysosome-associated membrane protein Lamp type 2a). Στη συνέχεια το πρωτεϊνικό υπόστρωμα «ξεδιπλώνεται» με τη δράση των συνοδών πρωτεϊνών και εισέρχεται στο λυσόσωμα με τη βοήθεια της πρωτεΐνης του λυσοσώματος hsc70. Η CMA απεικονίζεται στην εικόνα 3.



Εικόνα 3: Η CMA πορεία. Πηγή: (3)

Όπως αποδίδεται στο παραπάνω σχήμα το σύμπλοκο της συνοδού πρωτεΐνης Hsc70 αναγνωρίζει την πρωτεΐνη που πρόκειται να αποδομηθεί από το KFERQ μοτίβο που περιέχει και δεσμεύεται σε αυτή 1). Στη συνέχεια το σύμπλοκο δεσμεύεται σε μια υπομονάδα της λυσοσωμικής μεμβρανικής πρωτεΐνης Lamp2a 2). Το πρωτεϊνικό υπόστρωμα «ξεδιπλώνεται» 3) και εισέρχεται στο λυσόσωμα με τη βοήθεια της λυσοσωμικής πρωτεΐνης ly-hsc70 4). Με την είσοδό του στο λυσόσωμα το υπόστρωμα αποδομείται γρήγορα από πρωτεάσες 5). Το σύμπλοκο της hsc70 αποδεσμεύεται από τη λυσοσωμική μεμβράνη 6) και μπορεί να δεσμεύσει ένα άλλο πρωτεϊνικό υπόστρωμα για έναν καινούργιο κύκλο CMA.

Η CMA λαμβάνει χώρα στους περισσότερους τύπους κυττάρων, όπως βλαστοκύτταρα, και κύτταρα του ήπατος και των νεφρών. Σε παρατεταμένη νηστεία μπορεί να αποδομεί κυτοσολικές πρωτεΐνες που περιέχουν KFERQ μοτίβα. Αυτές οι πρωτεΐνες αποτελούν το 30% των κυτοσολικών πρωτεϊνών. Επιπλέον και άλλες πρωτεΐνες που αρχικά δεν διαθέτουν αυτό το μοτίβο μπορεί να το αποκτήσουν με διαδικασίες κατά τις οποίες τροποποιούνται τα αμινοξέα τους, όπως η αποαμίδωση. Με τον τρόπο αυτό μπορούν επομένως και αυτές οι πρωτεΐνες να ακολουθήσουν τη CMA πορεία. Η CMA ενεργοποιείται από διάφορους στρεσογόνους παράγοντες, όπως η παρατεταμένη έλλειψη θρεπτικών συστατικών και αυξητικών παραγόντων και το οξειδωτικό στρες. Κατά την παρατεταμένη έλλειψη θρεπτικών συστατικών είναι πιθανό να ενεργοποιείται μέσω των κετονικών σωμάτων, δηλαδή μέσω β-υδροξυβουτυρικού, ακετοξικού και ακετόνης που παράγονται (4). Πιστεύεται μάλιστα ότι κατά την έλλειψη θρεπτικών συστατικών αρχικά ενεργοποιείται η μακροαυτοφαγία η οποία γρήγορα κλιμακώνεται και στη συνέχεια αναλαμβάνει δράση η CMA. Επιπλέον φαίνεται ότι οι δύο πορείες δρουν συμπληρωματικά για την αποδόμηση πρωτεϊνών. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει

από πειράματα σε βλαστοκύτταρα ποντικών στα οποία είχε ανασταλεί η CMA. Με την αναστολή της μιας αποδομητικής πορείας το αναμενόμενο θα ήταν να μειωθεί και ο ρυθμός αποδόμησης των πρωτεϊνών. Εν τούτοις ο ρυθμός αποδόμησης των πρωτεϊνών δεν ελαττώθηκε γιατί αυξήθηκε η αποδόμηση των πρωτεϊνών μέσω της μακρο-αυτοφαγίας. Ωστόσο μέχρι στιγμής ο τρόπος με τον οποίο οι δύο αυτές πορείες επικοινωνούν και αλληλορυθμίζονται, αν υπάρχουν τέτοιοι, δεν έχουν βρεθεί. (3,113).

Η κύρια μορφή αυτοφαγίας που απαντά στα περισσότερα είδη κυττάρων, αλλά και η καλύτερα μελετημένη είναι η μακροαυτοφαγία. Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στη μακροαυτοφαγία και στη συνέχεια του κειμένου όπου αναγράφεται «αυτοφαγία» εννοείται η μακροαυτοφαγία, εκτός αν διευκρινίζεται ότι αναφέρεται σε κάποια άλλη μορφή.

1.3 Λειτουργίες της αυτοφαγίας

Ο πρώτος ρόλος που αναγνωρίστηκε ότι έχει η αυτοφαγία είναι η επιβίωση του κυττάρου σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών. Κατά την έλλειψη θρεπτικών συστατικών απομονώνεται στα αυτοφαγοσώματα υλικό από το κυτταρόπλασμα που περιέχει διάφορα συστατικά, όπως πρωτεΐνες ή και ολόκληρα οργανίδια που διασπώνται στο λυσόσωμα. Τα συστατικά που προκύπτουν επιστρέφουν στο κυτοσόλιο και χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενέργειας ή για τη σύνθεση πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την επιβίωση. Τα συστατικά αυτά μπορούν επίσης να εξέρχονται από το κύτταρο για να υποστηρίξουν μεταβολικά άλλους ιστούς, πχ τον εγκέφαλο, και για να διατηρηθεί σταθερό το εξωκυτταρικό περιβάλλον (1,125). Η αυτοφαγία μάλιστα ενεργοποιείται όχι μόνο ως απόκριση σε ακραίες συνθήκες νηστείας, αλλά ακόμα και στο χρονικό διάστημα μεταξύ των γευμάτων σε όργανα όπως το ήπαρ (125).

Η αυτοφαγία όμως διεξάγεται στα κύτταρα σε ένα βασικό επίπεδο χωρίς την επίδραση ερεθισμάτων όπως η νηστεία. Η λειτουργία της αυτοφαγίας σε κάποιους βασικούς ρυθμούς εξυπηρετεί στην απομάκρυνση ελαττωματικών ή μακρόβιων πρωτεϊνών και οργανιδίων. Η αυτοφαγική πορεία μάλιστα είναι και ο μοναδικός μηχανισμός που διαθέτει το κύτταρο για την αποδόμηση ολόκληρων οργανιδίων (1,124). Οι πρωτεΐνες και τα συσσωματώματα πρωτεϊνών αποδομούνται επίσης στο πρωτεόσωμα και τα δύο αυτά συστήματα καταβολισμού φαίνεται πως λειτουργούν συμπληρωματικά (1,124). Η αναγκαιότητα της αυτοφαγίας για τη διατήρηση καλού ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος φαίνεται από το γεγονός ότι κατά την αναστολή ή τη μη κανονική λειτουργία της αυτοφαγίας συσσωρεύονται στο κύτταρο συσσωματώματα πρωτεϊνών και κατεστραμμένων οργανιδίων που προοδευτικά οδηγούν στην εκδήλωση διάφορων

ασθενειών, όπως νευροεκφυλιστικά νοσήματα (1). Η αυτοφαγία έχει επίσης ρόλο στη διαφοροποίηση των κυττάρων και στην ανάπτυξη των ιστών (1,124). Για παράδειγμα κατά την ωρίμανση των λιποκυττάρων και των ερυθροκυττάρων τα μιτοχόνδρια εξαλείφονται μέσω της αυτοφαγίας (124).

Ο περιορισμός των προσλαμβανόμενων θερμίδων, εξάλλου όπως προκύπτει από έρευνες των τελευταίων ετών συμβάλλει στην παράταση του χρόνου ζωής και καθυστερεί την εκδήλωση νοσημάτων που σχετίζονται με τη γήρανση. Αυτές οι ευεργετικές επιδράσεις της μειωμένης πρόσληψης ενέργειας ίσως οφείλονται στη λειτουργία της αυτοφαγίας. Η σύνδεση αυτή προκύπτει από το γεγονός ότι η αυτοφαγία αυξάνεται κατά τη μειωμένη ενεργειακή πρόσληψη και με τη λειτουργία της αυτοφαγίας απομακρύνονται από το κύτταρο ανεπιθύμητα συστατικά (μακρόβιες πρωτεΐνες, κατεστραμμένα οργανίδια κλπ) η συσσώρευση των οποίων μπορεί να οδηγήσει σε διάφορα νοσήματα. Με τον τρόπο αυτό η αυτοφαγία «ανανεώνει» το κύτταρο περιορίζοντας την εκδήλωση εκφυλιστικών φαινομένων.

Η αυτοφαγία φαίνεται πως αποτελεί επίσης μέρος του αμυντικού μηχανισμού του οργανισμού καθώς μπορεί να εξολοθρεύσει ενδοκυτταρικά παθογόνα όπως βακτήρια και ιούς (124,125). Η αυτοφαγία γενικά αποτελεί έναν προστατευτικό μηχανισμό που λειτουργεί σε όλους τους ιστούς αφενός εξασφαλίζοντας καλές συνθήκες για το κύτταρο αφετέρου αντιμετωπίζοντας παράγοντες που μπορεί να είναι απειλητικοί για τη λειτουργία και την επιβίωση του κυττάρου. Για παράδειγμα είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της μυικής μάζας καθώς απομακρύνει κατεστραμμένα μιτοχόνδρια και συσσωματώματα πρωτεϊνών που μπορεί να οδηγήσουν σε μυική ατροφία (125,127), είναι απαραίτητη για τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα των β-παγκρεατικών κυττάρων (80), ενώ φαίνεται να προστατεύει τα καρδιακά κύτταρα από ισχαιμικά επεισόδια και την αυξημένη πίεση (125).

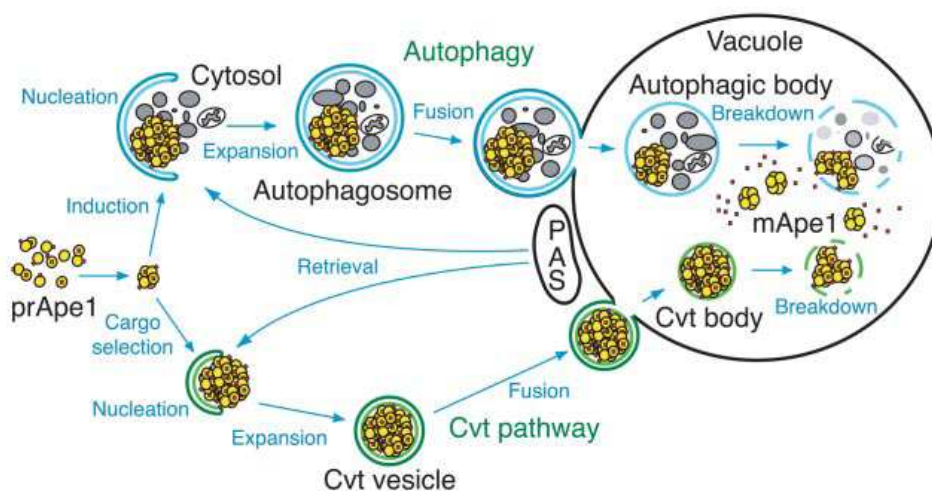
Γενικά η αυτοφαγία είναι μια κυτταροπροστατευτική διαδικασία που κινητοποιείται από διάφορους στρεσογόνους παράγοντες για να εξασφαλίσει την επιβίωση. Για παράδειγμα σε οξειδωτικό στρες μέσω της αυτοφαγίας εξαλείφονται τα κατεστραμμένα ή πλεονάζοντα μιτοχόνδρια που είναι η κύρια θέση παραγωγής των ROS που προκαλούν οξειδωτικό στρες. Σε κάποιες συνθήκες όμως μπορεί να οδηγήσει και σε κυτταρικό θάνατο. Για παράδειγμα στον καρκίνο η αυτοφαγία αφενός έχει ογκοκατασταλτική δράση απομακρύνοντας κατεστραμμένα οργανίδια και πρωτεΐνες, αλλά μπορεί να οδηγήσει και σε θάνατο των καρκινικών κυττάρων για την προστασία του οργανισμού. Η σχέση της αυτοφαγίας με τον καρκίνο όμως είναι πιο πολύπλοκη. Η λειτουργία της αυτοφαγίας μπορεί και να συμβάλλει στην επιβίωση των

καρκινικών κυττάρων ακόμα και σε συμπαγείς όγκους τροφοδοτώντας τα με θρεπτικά συστατικά. Έτσι σε αυτή την περίπτωση δεν είναι βέβαιο ότι η αναστολή ή η αύξηση της αυτοφαγίας είναι ωφέλιμη για την αντιμετώπιση του καρκίνου (125).

Η δράση της αυτοφαγίας εκτείνεται σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς και φαίνεται να είναι απαραίτητη για την εύρυθμη λειτουργία τους, αλλά και ένας προστατευτικός μηχανισμός έναντι ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών στρεσογόνων παραγόντων. Έτσι σε κανονικές συνθήκες η αυτοφαγία διεξάγεται σε ένα βασικό επίπεδο λειτουργώντας και ως ένας «ποιοτικός έλεγχος» για το κύτταρο, ενώ αυξάνεται από διάφορους παράγοντες που μπορεί να βλάψουν το κύτταρο δρώντας ως ένας μηχανισμός επιβίωσης του κυττάρου.

1.4 Τα στάδια της αυτοφαγίας

Η αυτοφαγία όπως προαναφέρεται είναι μια πορεία καταβολισμού που λαμβάνει χώρα σε οργανισμούς από τις ζύμες έως τα ανώτερα θηλαστικά. Η διαδικασία της αυτοφαγίας διεξάγεται σε διακριτά στάδια που κατά βάση είναι όμοια στους διάφορους οργανισμούς και αποδίδονται στην εικόνα 4.



Εικόνα 4: Τα στάδια της αυτοφαγίας και Cvt πορείας σε κύτταρο ζύμης. Πηγή: (5)

Με την έναρξη (Induction) αρχίζει ο σχηματισμός μιας διπλής μεμβράνης (Nucleation, πυρήνωση) η οποία αναπτύσσεται γύρω από το προς αποδόμηση κυτοσολικό υλικό (Expansion, επέκταση). Με το «σφράγισμα» της μεμβράνης έχει σχηματιστεί το ολοκληρωμένο αυτοφαγόσωμα που είναι ένα κυστίδιο διαμέτρου 300-900nm. Το επόμενο στάδιο είναι αυτό της σύντηξης (Fusion) κατά το οποίο η εξωτερική μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος συντήκεται με το κενοτόπιο (ή σε άλλα κύτταρα με το λυσόσωμα) για να απελευθερωθεί στο εσωτερικό του αποδομητικού οργανιδίου το αυτοφαγικό σώμα που διασπάται (Breakdown) από τα ένζυμα του

κενοτοπίου ή λυσοσώματος. Τα ίδια στάδια ακολουθεί και η βιοσυνθετική Cvt πορεία της ζύμης (5).

1.5 PAS

Όπως φαίνεται στην εικόνα 4 ο σχηματισμός των απομονωτικών κυστιδίων, δηλαδή των αυτοφαγοσωμάτων και των Cvt κυστιδίων ξεκινά σε μια θέση παρακείμενη στο κενοτόπιο, την PAS (pre-autophagosomal structure, phagophore assembly site) (6). Η PAS εμφανίζεται στα κύτταρα της ζύμης σαν μια στική δομή στην οποία εντοπίζονται οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων, δηλαδή οι Atg πρωτεΐνες. Όλα τα αυτοφαγοσώματα στα κύτταρα της ζύμης αρχίζουν να δημιουργούνται στην παρακείμενη στο κενοτόπιο PAS.

Στα κύτταρα των θηλαστικών όμως δεν έχει βρεθεί ανάλογη θέση (6) και τα αυτοφαγοσώματα φαίνεται ότι μπορούν να σχηματιστούν οπουδήποτε μέσα στο κυτοσόλιο (7,8,9). Συχνά για τη θέση σχηματισμού των αυτοφαγοσωμάτων στα κύτταρα των θηλαστικών χρησιμοποιείται ο όρος απομονωτική μεμβράνη (isolation membrane IM) ή προ-αυτοφαγοσωμική μεμβράνη.

Όταν αναφερόμαστε στην PAS ή IM δεν εννοούμε μια αρχική μεμβράνη η οποία επιμηκύνεται για να σχηματιστεί το αυτοφαγόσωμα, καθώς τα αυτοφαγοσώματα θεωρείται ότι συνθέτονται de novo, με την έννοια ότι δεν δημιουργούνται με εκβλάστηση από προϋπάρχον οργανίδιο (10). Πρόκειται για τη θέση στην οποία προσάγεται το μήνυμα για την έναρξη της αυτοφαγίας και στην οποία εντοπίζονται οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων (9,11).

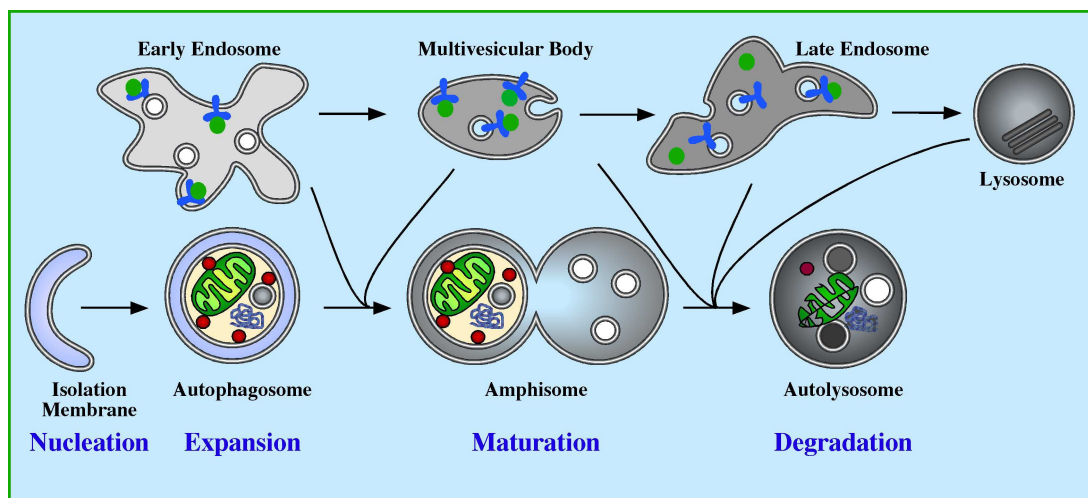
Ως πηγές της μεμβράνης έχουν προταθεί διάφορα οργανίδια, όπως η συσκευή Golgi, τα ενδοσώματα, τα μιτοχόνδρια, η κυτταροπλασματική μεμβράνη και το ενδοπλασματικό δίκτυο (7,12), ενώ σε πρόσφατη έρευνα σε κύτταρα θηλαστικών βρέθηκε ότι το εκκολαπτόμενο αυτοφαγόσωμα βρίσκεται ανάμεσα σε αναδιπλώσεις του ER (13).

Στο παρόν κείμενο με τον όρο PAS εννοείται η θέση σχηματισμού των αυτοφαγοσωμάτων στην οποία επιστρατεύονται οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη διαδικασία.

1.6 Αυτοφαγία στα κύτταρα των θηλαστικών

Στα κύτταρα των θηλαστικών η αυτοφαγία διεξάγεται όπως περιγράφεται παραπάνω ακολουθώντας τα ίδια βασικά στάδια με κάποιες διαφοροποιήσεις. Συγκεκριμένα στα κύτταρα των θηλαστικών το αυτοφαγόσωμα μπορεί να συντηχθεί με ένα ενδόσωμα σχηματίζοντας το αμφίσωμα το οποίο κατόπιν συντήκεται με το λυσόσωμα για να προκύψει το αυτολυσόσωμα. Κάποιοι ερευνητές μάλιστα υποστηρίζουν ότι η σύντηξη του αυτοφαγοσώματος με το ενδόσωμα είναι απαραίτητη για τη διαδικασία (7,9,13,14), αλλά αυτό δεν είναι ακόμα κοινά αποδεκτό. Είναι πάντως αποδεδειγμένο ότι το αυτοφαγόσωμα μπορεί να συντηχθεί με πρώιμο ή όψιμο

ενδοσωμάτιο ή με Mvb (multivesicular bodies) σχηματίζοντας ένα κυστίδιο που ονομάζεται αμφίσωμα, το οποίο ακολούθως συντήκεται με το λυσόσωμα για να προκύψει το αυτολυσόσωμα. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται και ωρίμανση του αυτοφαγοσώματος.



Εικόνα 5. Τα στάδια της αυτοφαγίας σε κύτταρα θηλαστικών. Πηγή: (7)

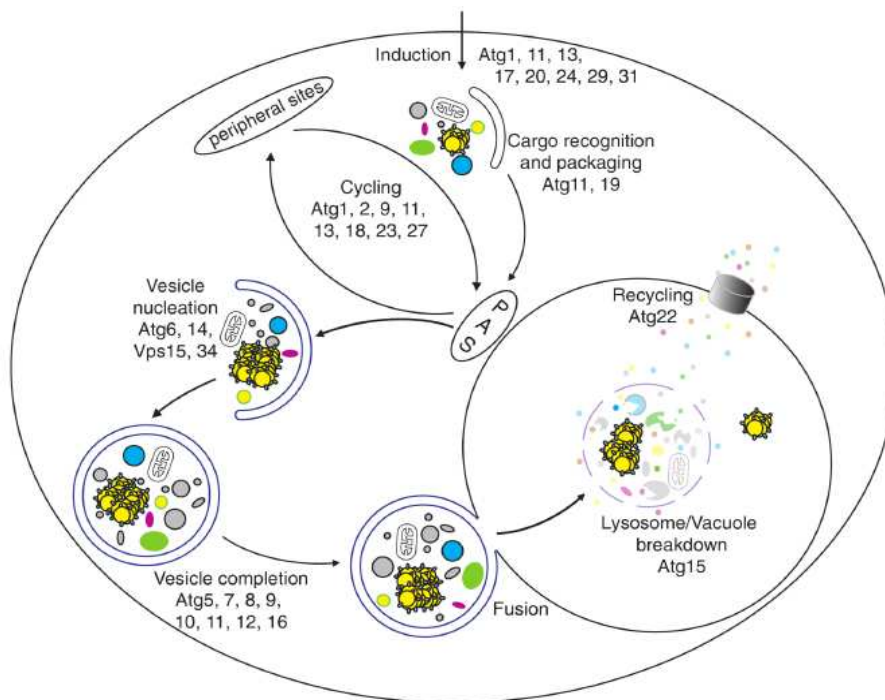
2 Μοριακός μηχανισμός της αυτοφαγίας

Η πορεία του καταβολισμού ενδοκυτταρικών συστατικών στο λυσόσωμα, δηλαδή η αυτοφαγία, χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό των απομονωτικών κυστιδίων, δηλαδή των αυτοφαγοσωμάτων. Η διαδικασία αυτή ελέγχεται από τα ATG γονίδια και διεκπεραιώνεται από τα προϊόντα τους, δηλαδή τις Atg πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές που συμμετέχουν στο σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων όπως ανακαλύφθηκαν σε ζύμες συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

ATG	Characteristics
1	Protein kinase
2	Interact with Atg9
3	Phosphatidylethanolamine (PE) conjugation enzyme to Atg8 like E2
4	Cysteine protease processing C-terminal end of Atg8 and phosphatidylethanolamine (PE) deconjugation enzyme from Atg8-II
5	E3 like activity for Atg8 conjugation system in corporation with Atg12
6 (Beclin)	Bcl-2 binding protein and a component of PI3 kinase complexes
7	Atg8 or atg12 activating enzyme like E1
8 (LC3, GABARAP, GATE-16)	Ubiquitin-like protein conjugated to PE and marker for autophagosome
9	Only membrane protein among atg genes
10	Atg5 conjugation enzyme to Atg12 like E2
12	Ubiquitin-like protein conjugated to Atg5
13	Activation of Atg1
14	Associate with PI3-Kinase complex I
16	Interact with Atg12-Atg5 complex
17	Activation of Atg1, dispensable for Cvt vesicle formation
18	Interact with Atg9
29	PAS organization via interaction with Atg17, dispensable for Cvt vesicle formation
31	PAS organization via interaction with Atg17

Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων. Πηγή: (116).

Η πορεία της αυτοφαγίας εξελίσσεται σε διακριτά στάδια: έναρξη και πυρήνωση του αυτοφαγοσώματος, επιμήκυνση ή επέκταση της αυτοφαγοσωμικής μεμβράνης, ολοκλήρωση του αυτοφαγοσώματος και σύντηξη με το λυσόσωμα για τη διάσπαση του φορτίου των αυτοφαγοσωμάτων. Κάθε στάδιο της πορείας πραγματοποιείται από τη δράση των ανάλογων Atg πρωτεϊνών που απεικονίζονται στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 6. Η συμμετοχή των Atg πρωτεϊνών στα στάδια της αυτοφαγίας. Πηγή: [(117) Figure 2]

Από τα 30 και πλέον γονίδια που γνωρίζουμε ότι συμμετέχουν στο σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων, τα 16 αποτελούν τον πυρήνα του μηχανισμού: Atg1-10, Atg12-14, Atg16-18 (16,20) και κατά τους A. Longatti και SA Tooze και τα Atg29, Atg31 (9).

Οι αντίστοιχες πρωτεΐνες που συνιστούν το μηχανισμό του σχηματισμού των αυτοφαγοσωμάτων στα κύτταρα των θηλαστικών συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Mammalian Atg gene	Functions
ULK1, ULK2	Protein kinase: Atg1-Atg13-Atg17-Atg29 complex
Atg2	Atg9/Atg2-Atg18 complex
Atg3	E2-like enzyme for Atg8s-lipidation
Atg4A, B, C, D	Cysteine protease: Atg8s-activation and delipidation
Atg5	Atg12-Atg5 conjugate: E3-like activity for Atg8s-lipidation
Beclin1	Subunit of Vps34 PI3K complex
Atg7	E1-like enzyme for Atg12-and LC3-conjugation
LC3,GATE-16, GABARAP	Modifier: Conjugates to PE to localize to autophagosome
Atg9L1, L2	Atg9 interacts Atg2-Atg18 complex: membrane-bound
Atg10	E2-like enzyme for Atg12-conjugation
Atg12	Modifier: Conjugates to Atg5
Atg13	mTor signaling: Atg1-Atg13-Atg17-Atg29 complex
Atg14	Subunit of Vps34 PI3K complex
Atg16L	Complex between Atg16 and Atg12-Atg5 conjugate
FIP200	Atg1-Atg13-Atg17-Atg29 complex
WIPI-1,2,3,4	Atg9/Atg2-Atg18 complex

Πηγή: (16)

Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να ομαδοποιηθούν ανάλογα με το στάδιο της αυτοφαγίας στο οποίο δρουν σε 6 γκρουπ:

- 1) Το σύμπλοκο της ULK1 κινάσης που αποτελείται από: ULK1-mAtg13-FIP200-Atg101 που δρα κατά την έναρξη
- 2) Το σύμπλοκο της class III PI3K (class III phosphatidylinositol 3 kinase) που αποτελείται από:
 - την class III PI3K ή hVps34
 - την πρωτεϊνική κινάση p150 ή hVps15 που είναι ρυθμιστική πρωτεΐνη
 - την Beclin1 που είναι το ομόλογο της Atg6 της ζύμης και
 - είτε την Atg14L ή Barkor (Beclin1-associated Atg key regulator) που είναι το ομόλογο της Atg14 της ζύμης
 - είτε το UVRAG (ultraviolet irradiation resistant-associated gene)

Το σύμπλοκο αυτό δρα κατά την πυρήνωση της αυτοφαγοσωμικής μεμβράνης. Ονομάζεται σύμπλοκο της class III PI3K ή σύμπλοκο της Vps34 ή σύμπλοκο της Beclin1.

3) Την Atg9 η λειτουργία της οποίας αφορά την ανακύκλωση μεμβρανών.

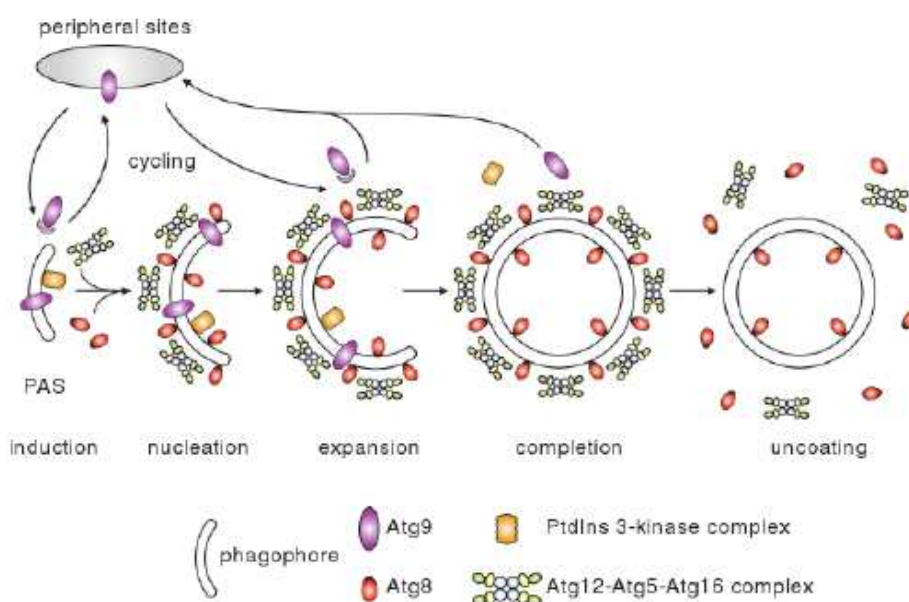
4) Τις WIPI 1/2 των θηλαστικών που είναι αντίστοιχες του συμπλόκου Atg2-Atg18 της ζύμης

5) Το σύστημα σύζευξης Atg12-Atg5-Atg16L

6) Το σύστημα σύζευξης της LC3 που είναι αντίστοιχο του Atg8-PE της ζύμης.

Οι πρωτεΐνες που αναφέρονται στα 4), 5) και 6) δρουν κατά την επέκταση της αυτοφαγοσωμικής μεμβράνης (16,117,118).

Τα στάδια του σχηματισμού των αυτοφαγοσωμάτων με τη συμμετοχή των πρωτεϊνών του μοριακού μηχανισμού της αυτοφαγίας απεικονίζονται στην εικόνα 7.



Εικόνα 7. Ο σχηματισμός του αυτοφαγοσώματος και οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε κάθε στάδιο. Πηγή: [(117) Figure 8].

Όπως φαίνεται στην εικόνα το σύμπλοκο της class III PI3K (στην εικόνα ως PtdIns3-kinase complex) έχει ρόλο από το στάδιο της έναρξης, ενώ η Atg9 ανακυκλώνεται μεταξύ της απομονωτικής μεμβράνης και περιφερικών θέσεων. Τα συστήματα σύζευξης Atg12-Atg5-Atg16 και Atg8 (που σε κύτταρα θηλαστικών είναι το σύστημα σύζευξης της LC3) συμμετέχουν κατά την επέκταση της μεμβράνης. Με την ολοκλήρωση του αυτοφαγοσώματος οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σχηματισμό του απομακρύνονται και παραμένει συνδεδεμένη μόνο η LC3 (στην εικόνα Atg8) της εσωτερικής μεμβράνης. Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται οι πρωτεΐνες που συνιστούν τον πυρήνα του σχηματισμού των αυτοφαγοσωμάτων στα κύτταρα των θηλαστικών.

2.1 Το σύμπλοκο της Class III PI3K

Η class III PI3K (class III phosphatidylinositol 3 Kinase) ή Vps34 είναι λιπιδική κινάση που σχηματίζει σύμπλοκο με την Beclin 1, την p150, την Atg14L ή Barkor και το πρόσφατα αναγνωρισμένο UVRAG (ultraviolet irradiation resistant-associated gene). Το σύμπλοκο αυτό δρα κατά το αρχικό στάδιο της πυρήνωσης της απομονωτικής μεμβράνης και είναι απαραίτητο για το σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος. Προϊόν της Vps34 είναι η τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PI3P, phosphatidylinositol-3-phosphate). Η σύνδεση της Beclin1 στο σύμπλοκο είναι απαραίτητη για τη δράση της Vps34 και αυξάνει τα επίπεδα PI3P στο κύτταρο. Ο ρόλος του συμπλόκου της class III PI3K φαίνεται πως είναι η επιστράτευση στην PAS άλλων πρωτεϊνικών συστατικών του μηχανισμού σχηματισμού των αυτοφαγοσωμάτων, όπως οι πρωτεΐνες WIPI και τα συστήματα σύζευξης της ULK και LC3 που συμμετέχουν στην επέκταση της μεμβράνης (8,12,13,16,20,117-119). Πέρα από τον απαραίτητο ρόλο της στο σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων η Vps34 έχει ρόλο και στη ρύθμιση της αυτοφαγίας από τα αμινοξέα. Όπως περιγράφεται στην ενότητα της ρύθμισης της αυτοφαγίας, παρουσία αμινοξέων η class III PI3K αναστέλλει την αυτοφαγία (117), αν και αυτή η ρυθμιστική λειτουργία αποδίδεται σε ξεχωριστό πληθυσμό class III PI3 κινάσης από αυτόν που εντοπίζεται στην PAS.

Όπως αναφέρεται ο πιο πιθανός ρόλος του συμπλόκου είναι η επιστράτευση στην PAS πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο σχηματισμό της αυτοφαγοσωμικής μεμβράνης. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να δεσμεύονται στο προϊόν της class III PI3K, δηλαδή στην PI3P, και μέσω αυτής της σύνδεσης να εντοπίζονται στην PAS (15,117). Η class III PI3K επιπλέον ίσως έχει ρόλο και στη μορφοποίηση του αυτοφαγοσώματος: η παρουσία της PI3P στην PAS μπορεί να δημιουργεί τις κατάλληλες ασυμμετρίες ώστε να αποκτήσει η μεμβράνη την επιθυμητή καμπυλότητα για το σχηματισμό του σφαιρικού κυστιδίου. Η PI3P επίσης είναι πιθανό να μετατρέπεται σε ανώτερους φωσφοϊνοσιτίτες που λαμβάνουν μέρος σε οδούς μεταγωγής μηνύματος (15). Τέλος το γεγονός ότι η Vps34 είναι απαραίτητη για την πορεία της αυτοφαγίας επιβεβαιώνεται από το ότι με την αναστολή της με 3-μεθυλαδενίνη (3-MA) ή wortmannin αναστέλλεται και ο σχηματισμός των αυτοφαγοσωμάτων (15).

2.1.1 Beclin1

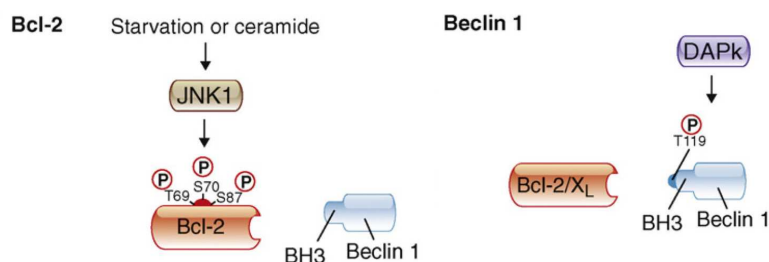
Η Beclin1 προάγει τη δράση της κινάσης Vps34 και είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του συμπλόκου της class III PI3K. Έχει ρυθμιστικό ρόλο στην αυτοφαγία καθώς αλληλεπιδρά και συνδέεται με διάφορες πρωτεΐνες σχηματίζοντας έτσι διαφορετικού τύπου class III PI3K σύμπλοκα που προάγουν ή αναστέλλουν το σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων (8,12,13,16,20,117,119).

Η Beclin1 αποτελείται από τρεις δομικές περιοχές: την BH3 (Bcl-2-homology domain) περιοχή στο αμινοτελικό άκρο, την CCD (central coiled-coil domain) μια κεντρική εσπειραμένη περιοχή και την ECD, μια εξελικτικά διατηρημένη περιοχή. Σε κανονικές συνθήκες η Beclin1 δεσμεύεται μέσω της BH3 περιοχής της με την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 ή την Bcl-XL. Σε συνθήκες όπως η έλλειψη θρεπτικών συστατικών ή οξυγόνου η Beclin1 αποδεσμεύεται από την Bcl-2 (ή την Bcl-XL) και μπορεί να σχηματίσει με τη Vps34 το σύμπλοκο της classIII PI3K με αποτέλεσμα την έναρξη της αυτοφαγίας (12,119). Αυτή η ρύθμιση της αυτοφαγίας αποδίδεται στην εικόνα 8.



Εικόνα 8. Πηγή: (119)

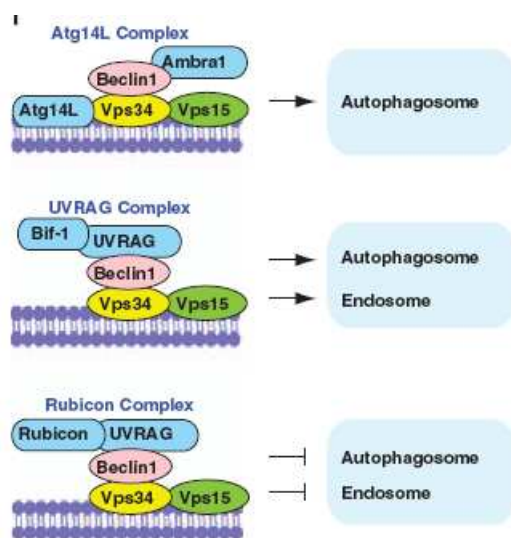
Η έλλειψη θρεπτικών συστατικών ενεργοποιεί την αυτοφαγία με αυτό τον τρόπο μέσω δύο πρωτεϊνών: του NAF-1 και της JNK1. Ο NAF-1 (nutrient-deprivation autophagy factor-1) είναι συστατικό του υποδοχέα της 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3R) και σταθεροποιεί τη δέσμευση της Beclin1 με την Bcl-2. Απουσία του NAF-1 μειώνεται η συνάφεια της Beclin1 για την Bcl-2, οπότε η Beclin1 αποδεσμεύεται για να σχηματίσει το σύμπλοκο της Vps34. Παρομοίως η ενεργοποίηση της JNK1 (c-Jun NH₂-terminal kinase-1) κατά τη νηστεία προκαλεί τη φωσφορυλίωση της Bcl-2 ή της Bcl-XL και την αποδέσμευση της Beclin1 (12,13). Η αποδέσμευση της Beclin1 ρυθμίζεται και από πολλούς άλλους παράγοντες (12,119).



Εικόνα 9. Η αποδέσμευση της Beclin1 από την Bcl-2 ή την Bcl-XL σε συνθήκες νηστείας ή με το ερέθισμα κηραμιδίων ή της DAPK. Πηγή: [(119) Figure 2].

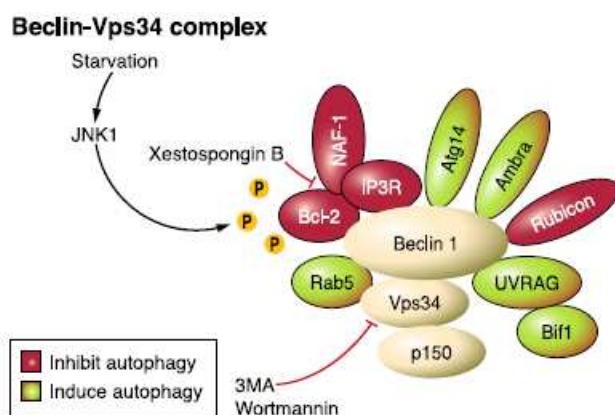
Όπως αναφέρεται και πιο πάνω η Beclin1 αλληλεπιδρά με διάφορους παράγοντες και σχηματίζει διαφορετικού τύπου σύμπλοκα που οδηγούν στο σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων ή όχι. Για παράδειγμα στην εικόνα 10 το πρώτο σύμπλοκο στο οποίο η Beclin1 δεσμεύεται με την

Ambra1 οδηγεί στο σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων. Το δεύτερο σύμπλοκο στο οποίο η Beclin1 δεσμεύει τον Bif-1 μέσω του UVRAG επίσης οδηγεί στη δημιουργία αυτοφαγοσώματος, ενώ το τρίτο σύμπλοκο με το Rubicon δεν σχηματίζει αυτοφαγοσώματα. Όπως φαίνεται στην εικόνα το σύμπλοκο της Beclin1 περιέχει είτε την Atg14L (Barkor) είτε το UVRAG. Αυτό είναι ένα παράδειγμα τριών διαφορετικών τύπων συμπλόκου της class III PI3K (12,119).

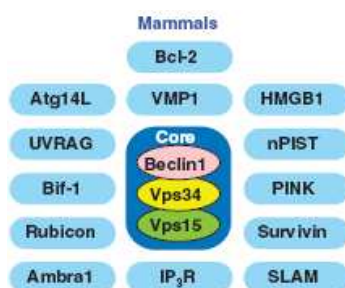


Εικόνα 10. Πηγή [(12) Figure 2]

Με άλλα λόγια η Beclin1 έχει θετικούς και αρνητικούς τροποποιητές οι οποίοι αποτελούν αντίστοιχα θετικούς ή αρνητικούς ρυθμιστές της αυτοφαγίας. Οι παράγοντες αυτοί αποδίδονται στις εικόνες 11 και 12.



Εικόνα 11. Πηγή: [(13) Figure 1]



Εικόνα 12. Πηγή: [(12) Figure 2]

Στην εικόνα 11 με λευκό χρώμα παριστάνεται ο «πυρήνας» του συμπλόκου της class III PI3K, με κόκκινο χρώμα οι αναστολείς της αυτοφαγίας και με πράσινο οι παράγοντες που προάγουν το

σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων. Στην εικόνα 12 απεικονίζεται επίσης το σύμπλοκο της class III PI3K και διάφοροι παράγοντες που δεσμεύονται στην Beclin1 και τροποποιούν τη δράση του. Η Beclin1 εκτός από το αρχικό στάδιο του σχηματισμού του αυτοφαγοσώματος φαίνεται να έχει ρόλο και στο στάδιο της ωρίμανσης, δηλαδή κατά τη σύντηξη του αυτοφαγοσώματος με το λυσόσωμα (12,13,119).

Τέλος η μείωση των επιπέδων της Beclin1 ή η ελάττωση της δραστηριότητάς της έχουν συσχετιστεί με ευαισθησία στον καρκίνο, τη νόσο Alzheimer και τη νόσο Huntington, αλλά δεν είναι γνωστό αν αυτό οφείλεται σε μη κανονική λειτουργία της αυτοφαγίας ή σε άλλες δράσεις της πρωτεΐνης (119).

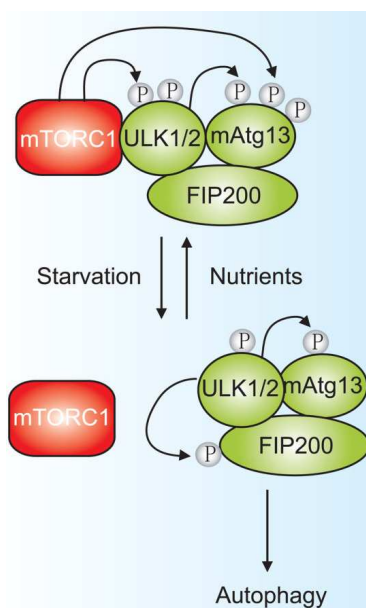
2.2 ULK σύμπλοκο

Στο στάδιο της έναρξης της αυτοφαγίας είναι απαραίτητη η δράση του ULK συμπλόκου το οποίο εντοπίζεται στην PAS. Στα κύτταρα των θηλαστικών υπάρχουν τρεις ULK (unc-51-like kinase) πρωτεΐνες: οι ULK1, ULK2 και ULK3. Όταν αναφερόμαστε σε ULK σύμπλοκο συνήθως αναφερόμαστε στην ULK1 (επειδή παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ομοιότητα με την Atg1 της ζύμης), αν και η ULK2 φαίνεται ότι έχει παρόμοια δράση και επίσης συμμετέχει σε σχηματισμό συμπλόκων. Το ULK σύμπλοκο, δηλαδή το ULK1-mAtg13-FIP200-Atg101, είναι το αντίστοιχο του συμπλόκου Atg1-Atg13-Atg17 της ζύμης, με την ULK1 να είναι το ομόλογο της Atg1, την mAtg13 το ομόλογο της Atg13 και την FIP200 (200kDa focal adhesion kinase family-interacting protein) το ομόλογο της Atg17 (20,35,118).

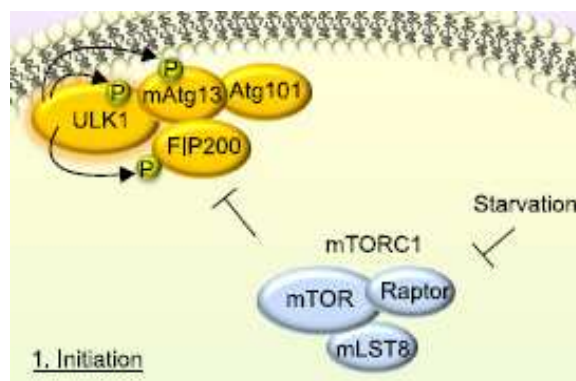
Στη ζύμη το σύμπλοκο αυτό ρυθμίζει την εναλλαγή μεταξύ Cnt πορείας και αυτοφαγίας ανάλογα με την επάρκεια θρεπτικών συστατικών (15). Σε συνθήκες επάρκειας θρεπτικών συστατικών που ευνοούν την ανάπτυξη λαμβάνει χώρα η Cnt πορεία, η οποία άλλωστε είναι βιοσυνθετική πορεία, ενώ κατά τη νηστεία αναλαμβάνει δράση η αυτοφαγία. Η ρύθμιση αυτή μεσολαβείται από τον κύριο ρυθμιστή της αυτοφαγίας που είναι η TORC1 η οποία φωσφορυλιώνει την Atg13. Σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών το TORC1 απενεργοποιείται και η Atg13 αποφωσφορυλιώνεται με αποτέλεσμα την αύξηση της συνάφειάς της για τις Atg1 και Atg17 που οδηγεί στο σχηματισμό του Atg1-Atg13-Atg17 συμπλόκου και το σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων. Αντίθετα σε επάρκεια θρεπτικών συστατικών η ενεργοποιημένη TORC1 φωσφορυλιώνει την Atg13 με αποτέλεσμα την ελάττωση της αλληλεπίδρασής της με τις Atg1 και Atg17 (20). Δηλαδή στις ζύμες ο σχηματισμός ή όχι του Atg1-Atg13-Atg17 συμπλόκου καθορίζεται από τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών. Αντίθετα στα κύτταρα των θηλαστικών ο σχηματισμός του ULK1-mAtg13-FIP200-Atg101

συμπλόκου δεν εξαρτάται από την κατάσταση θρέψης και το σύμπλοκο υφίσταται ανεξάρτητα από την επάρκεια ή την έλλειψη θρεπτικών συστατικών (16,118). Η δράση όμως του συμπλόκου ρυθμίζεται από τις συνθήκες θρέψης μέσω του mTORC1 (το ομόλογο του TORC1 της ζύμης) που είναι ο κύριος ρυθμιστής της αυτοφαγίας και στα κύτταρα των θηλαστικών. Σε συνθήκες επάρκειας θρεπτικών συστατικών το mTORC1 είναι ενεργοποιημένο και αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο ULK: φωσφορυλιώνει την ULK1 και την mAtg13 με αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης του συμπλόκου. Σε συνθήκες νηστείας το mTORC1 απενεργοποιείται και αποδεσμεύεται από το σύμπλοκο της ULK. Έτσι δημιουργείται ένα σύμπλοκο στο οποίο η ULK1 εκδηλώνει τη δράση της ως κινάση και φωσφορυλιώνει τα συστατικά του, δηλαδή τις mAtg13 και FIP200, με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή του και την έναρξη της αυτοφαγίας. Στα κύτταρα των θηλαστικών δηλαδή ανεξάρτητα από τις συνθήκες θρέψης υπάρχει το σύμπλοκο ULK1-mAtg13-FIP200-Atg101, το οποίο σε επάρκεια θρεπτικών συστατικών είναι δεσμευμένο στο mTORC1, ενώ κατά την έλλειψη θρεπτικών συστατικών αποδεσμεύεται από το mTORC1. Η αποδέσμευση του mTORC1 οδηγεί στην ενεργοποίηση του ULK συμπλόκου και στην επιστράτευσή του στην PAS για το σχηματισμό της αυτοφαγοσωμικής μεμβράνης (8,16,20,21,23-27,117,118). Η ρύθμιση του ULK από το mTORC1 ανάλογα με την επάρκεια θρεπτικών συστατικών αποδίδεται στις εικόνες 13 και 14.

Η ενεργοποίηση του ULK συμπλόκου από το mTORC1, όπως περιγράφεται και σε επόμενες ενότητες, υπόκειται στον έλεγχο και πολλών άλλων παραγόντων πέρα από τα θρεπτικά συστατικά και αποτελεί απαραίτητο στάδιο για την έναρξη της αυτοφαγίας σε κάθε περίπτωση.

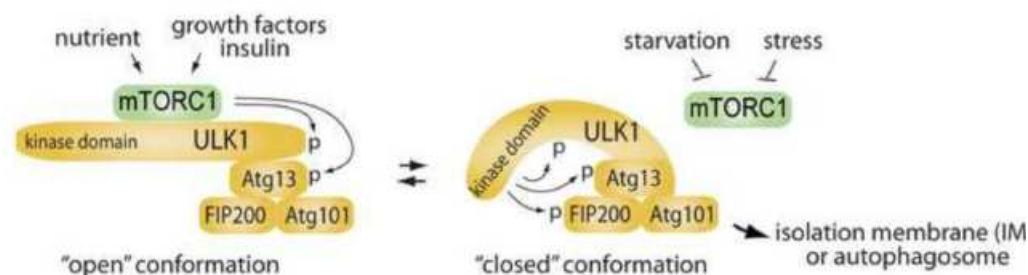


Εικόνα 13. Πηγή (20)



Εικόνα 14. Πηγή (20)

Μια ενδιαφέρουσα θεωρία σχετικά με τη ρύθμιση του ULK συμπλόκου από το mTORC1 είναι η “two-state hypothesis” σύμφωνα με την οποία το ULK σύμπλοκο αλλάζει διαμόρφωση ανάλογα με το εάν είναι συνδεδεμένο με το mTORC1 ή όχι. Όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα, σε συνθήκες επάρκειας θρεπτικών συστατικών το ενεργό mTORC1 είναι συνδεδεμένο με το ULK σύμπλοκο το οποίο έχει μια «ανοιχτή» διαμόρφωση. Σε συνθήκες νηστείας (ή υπό την επίδραση άλλων στρεσογόνων παραγόντων) το mTORC1 αποσυνδέεται από το ULK σύμπλοκο και τότε η καταλυτική περιοχή του ULK1 μπορεί να φωσφορυλιώνει την ίδια την ULK1, την Atg13 και την FIP200 με αποτέλεσμα το ULK σύμπλοκο να αποκτά την «κλειστή» διαμόρφωση που είναι και η ενεργή του μορφή που πυροδοτεί την έναρξη της αυτοφαγίας (27). Η θεωρία αυτή αποδίδεται στην εικόνα 15.

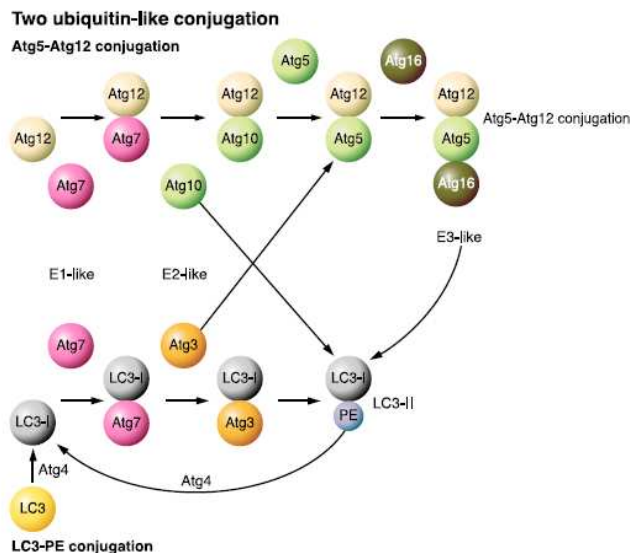


Εικόνα 15. Πηγή (27)

2.3 Τα δύο ubiquitin-like συστήματα σύζευξης

Κατά την επέκταση της αυτοφαγοσωμικής μεμβράνης δρουν δύο πρωτεϊνικά συστήματα σύζευξης που χαρακτηρίζονται ubiquitin-like επειδή ο τρόπος με τον οποίο σχηματίζονται μοιάζει με το ενζυμικό σύστημα της ουβικουιτίνης. Και τα δύο συστήματα σύζευξης είναι απαραίτητα για την αυτοφαγία.

Τα δύο αυτά συστήματα σύζευξης είναι το Atg12-Atg5-Atg16L και το σύστημα σύζευξης της LC3-II με τη φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE). Αν και δεν είναι γνωστό μα ποιο τρόπο, πιστεύεται ότι τα συστήματα σύζευξης έχουν ρόλο στην επιστράτευση νέων μεμβρανών κατά την επιμήκυνση της αυτοφαγοσωμικής μεμβράνης (16).



Εικόνα 16. Τα δύο ubiquitin-like συστήματα σύζευξης. Πηγή: (13)

2.3.1 Atg12-Atg5-Atg16L

Για το σχηματισμό αυτού του πρωτεϊνικού συστήματος σύζευξης η Atg12, μια πρωτεΐνη 186 αμινοξέων, συζευγνύεται στην Atg5 με μία αντίδραση που απαιτεί τη δράση των Atg7 και Atg10.

Η Atg7 δρα σαν ένζυμο ενεργοποίησης της ουβικουιτίνης και γι αυτό ονομάζεται και E1-like, ενώ η Atg10 δρα σαν το ένζυμο σύζευξης της ουβικουιτίνης και χαρακτηρίζεται και E2-like (21).

Στο καρβοξυτελικό άκρο της Atg12 υπάρχει ένα κατάλοιπο γλυκίνης που ενεργοποιείται από το E1-like Atg7 μέσω υψηλής ενέργειας θειεστερικού δεσμού κατά έναν ATP-εξαρτώμενο τρόπο. Ακολούθως η ενεργοποιημένη Atg12 μεταφέρεται στο E2-like Atg10 και τελικά δεσμεύεται στη λυσίνη 149 της Atg5 μέσω ισοπεπτιδικού δεσμού. Το σύστημα σύζευξης Atg12-Atg5 αλληλεπιδρά με την Atg16L (το ομόλογο της Atg16 της ζύμης) για να σχηματιστεί το πολυμερές πρωτεϊνικό σύμπλοκο ~800kDa, Atg12-Atg5-Atg16L, μέσω ομο-ολιγομερισμού της Atg16L (16).

Το σύστημα σύζευξης Atg12-Atg5-Atg16L είναι απαραίτητο για το σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων και πιθανόν επιστρατεύεται στην PAS μέσω της δράσης του συμπλόκου της Beclin1 (15,16,21). Σχεδόν όλη η ποσότητα των Atg12 και Atg5 που συνθέτονται στο κύτταρο συμμετέχουν στο σχηματισμό του συμπλόκου, καθώς οι πρωτεΐνες αυτές δύσκολα ανιχνεύονται στην ελεύθερη μορφή τους (15). Αμέσως μετά την ολοκλήρωση του αυτοφαγοσώματος το πρωτεϊνικό σύστημα σύζευξης αποδεσμεύεται από την αυτοφαγοσωμική μεμβράνη και

επιστρέφει στο κυτοσόλιο με μηχανισμό που μας είναι ακόμα άγνωστος (16,21). Έτσι το σύστημα σύζευξης Atg12-Atg5-Atg16L δεν εντοπίζεται στο ώριμο αυτοφαγόσωμα (15,16,21).

2.3.2 LC3II-PE

Το δεύτερο ubiquitin-like σύστημα σύζευξης είναι αυτό ανάμεσα στην πρωτεΐνη LC3 και το λιπίδιο φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE). Η πρωτεΐνη LC3 είναι η microtubule-associated protein 1 light chain 3 (ονομάζεται και MAP1-LC3) και είναι το ομόλογο στα θηλαστικά της Atg8 της ζύμης.

Αρχικά από το καρβοξυτελικό άκρο της LC3 αποσπάται μια σειρά αμινοξέων με τη δράση της κυστεϊνικής πρωτεάσης Atg4 που στα θηλαστικά ονομάζεται και autophagin (15). Έτσι σχηματίζεται στο κυτοσόλιο η LC3-I η οποία έχει στο C-τελικό της άκρο εκτεθειμένο ένα κατάλοιπο γλυκίνης. Ακολούθως η LC3-I συζευγνύεται ομοιοπολικά με τη PE για να σχηματιστεί η μεμβρανοδεσμευόμενη LC3-II με μια αντίδραση που μεσολαβείται από την Atg7 που δρα σαν E1-like ένζυμο και την Atg3 που δρα σαν E2-like ένζυμο. Ενώ η LC3-I είναι κυτοσολική πρωτεΐνη, η LC3-II δεσμεύεται και στις δύο πλευρές της μεμβράνης του σχηματιζόμενου αυτοφαγοσώματος και παραμένει δεσμευμένη ακόμα και μετά την ολοκλήρωσή του (13,20). Κατά τη σύντηξη με το λυσόσωμα η LC3-II που είναι δεσμευμένη στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης του αυτοφαγοσώματος απολιπιδιώνεται και αποδεσμεύεται με τη δράση της Atg4. Έτσι επιστρέφει στο κυτοσόλιο ως LC3-I και ανακυκλώνεται. Η LC3-II που βρίσκεται στην εσωτερική πλευρά της αυτοφαγοσωμικής μεμβράνης παραμένει δεσμευμένη και μετά τη σύντηξη με το λυσόσωμα και διασπάται από τα υδρολυτικά ένζυμα (13,15,20,21).

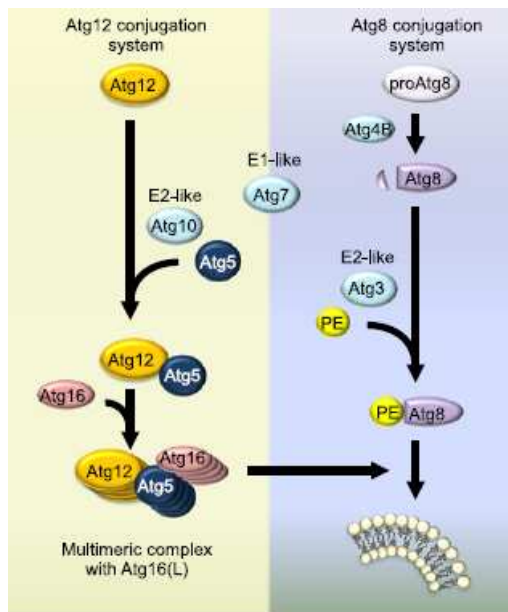
Η LC3 είναι πρωτεΐνη που συνδέεται ειδικά με τα αυτοφαγόσωμα και όχι με άλλα μεταφορικά κυστίδια (21) και μάλιστα παραμένει συνδεδεμένη στις μεμβράνες τους ακόμα και μετά την ολοκλήρωση του σχηματισμού τους. Έτσι τα επίπεδα της LC3-II είναι ανάλογα με τον αριθμό των αυτοφαγοσωμάτων και ο αριθμός των αυτοφαγοσωμικών κυστιδίων μπορεί να υπολογιστεί με προσδιορισμό των LC3-θετικών κυστιδίων (21). Γι αυτό και η LC3, και ειδικότερα η LC3-II, χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης της αυτοφαγίας (13,16,21). Ωστόσο η αύξηση των επιπέδων LC3-II και μόνο ίσως δεν είναι επαρκές κριτήριο για να δείξει την αύξηση των ρυθμών της αυτοφαγίας, καθώς η αύξηση αυτή μπορεί να οφείλεται σε συσσώρευση των αυτοφαγοσωμάτων λόγω πχ της μη σύντηξής τους με το λυσόσωμα (16). Με άλλα λόγια η LC3-II μπορεί να είναι καλός δείκτης για το σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων, αλλά δεν είναι ασφαλής δείκτης και για τη ροή της αυτοφαγίας.

Η LC3 εξάλλου ίσως παίζει ρόλο στο κλείσιμο των μεμβρανών κατά την ολοκλήρωση των κυστιδίων και στο στάδιο της σύντηξης των αυτοφαγοσωμάτων με το λυσόσωμα (16,20,21). Ενδιαφέρον εξάλλου είναι ότι η παραγωγή ROS (και ιδιαίτερα H_2O_2) που αυξάνεται κατά τη νηστεία έχει αποτέλεσμα την οξειδωση και απενεργοποίηση της Atg4. Έτσι αναστέλλεται η απολιπιδίωση της LC3-II με αποτέλεσμα αυτή να παραμένει στην αυτοφαγοσωμική μεμβράνη και να εξακολουθούν να σχηματίζονται αυτοφαγοσώματα με αυξημένο ρυθμό (21).

Τα δύο συστήματα σύζευξης αλληλεπιδρούν και διασταυρώνονται μεταξύ τους. Το Atg12-Atg5 ίσως δρα ως E3-like ένζυμο για τη σύζευξη της LC3 με τη PE. Εξάλλου η LC3 δεσμεύεται μόνο σε αυτοφαγοσωμικές μεμβράνες οι οποίες περιέχουν Atg12-Atg5 (21) και τα δύο συστήματα σύζευξης εντοπίζονται σε κοινή θέση (118). Άλλο παράδειγμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο συστημάτων είναι ότι η σύζευξη της LC3 με τη PE μπορεί να πραγματοποιηθεί και από την Atg10 (που αποτελεί το E2-like ένζυμο στο σύστημα σύζευξης Atg12-Atg5-Atg16L), ενώ η αύξηση της δραστηριότητας της Atg3 (η οποία αποτελεί το E2-like ένζυμο για το σύστημα σύζευξης LC3II-PE) αυξάνει και το σχηματισμό του άλλου πρωτεϊνικού συστήματος, δηλαδή του Atg12-Atg5 (21). Τέλος η παρουσία της LC3 φαίνεται να είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του Atg12-Atg5-Atg16L συμπλόκου (20).

Στα κύτταρα των θηλαστικών εκτός από την LC3 έχουν βρεθεί άλλα δύο ορθόλογα της Atg8 της ζύμης: η GABARAP (γ -aminobutyric acid type A receptor-associated protein) και η GATE-16 (Golgi-associated ATPase enhancer of 16kDa). Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες μετατρέπονται σε μορφές που μπορούν να δεσμεύονται σε μεμβράνες (μορφήII), όπως η LC3 και εντοπίζονται σε μεμβρανικά κλάσματα, αλλά οι λειτουργίες τους και ο τρόπος με τον οποίο μετατρέπονται στη μορφή-II δεν είναι γνωστά (15).

Τα δύο συστήματα σύζευξης αποδίδονται στις εικόνες 16 και 17.



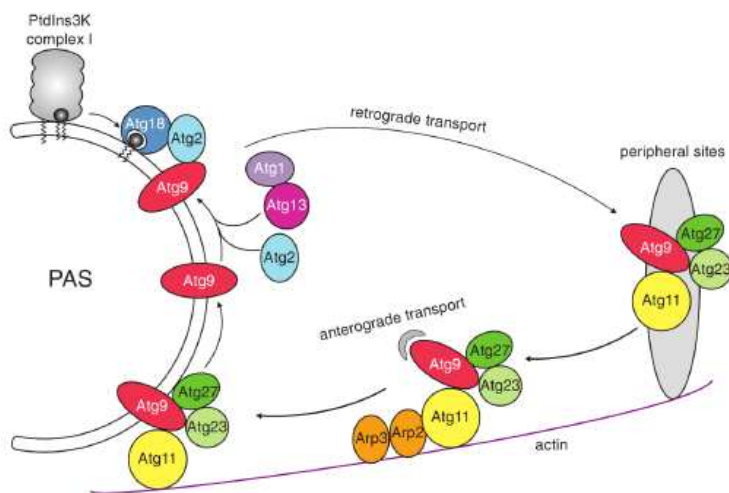
Εικόνα 17. Τα ubiquitin-like συστήματα σύζευξης. Πηγή: (16)

2.4 mAtg9 και VMP1

Η mAtg9 (το ομόλογο της Atg9 της ζύμης) και η VMP1 (vacuole membrane protein1) είναι οι μοναδικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που έχουν βρεθεί στα αυτοφαγοσώματα (20). Χαρακτηριστικό των αυτοφαγοσωμάτων, όπως άλλωστε και των άλλων μεταφορικών κυστιδίων, είναι η έλλειψη διαμεμβρανικών πρωτεϊνών με εξαίρεση την mAtg9 και την VMP1 που ανακαλύφθηκε πρόσφατα (9,20).

Η mAtg9 είναι πρωτεΐνη που διαπερνά τη μεμβράνη έξι φορές (20) και εντοπίζεται στην PAS, αλλά όχι στο ώριμο αυτοφαγόσωμα (15). Σε συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη του κυττάρου και δεν λαμβάνει χώρα η αυτοφαγία, η mAtg9 εντοπίζεται στο trans-Golgi δίκτυο και στο ώριμο ενδόσωμα, ενώ όταν οι ρυθμοί της αυτοφαγίας αυξάνονται εντοπίζεται στα αυτοφαγοσώματα (6). Φαίνεται λοιπόν ότι η Atg9 μετακινείται μεταξύ αυτοφαγοσωμικής μεμβράνης και περιφερικών θέσεων (πιθανόν συσκευή Golgi και ενδοσώματα) ανάλογα με τη διεξαγωγή της αυτοφαγικής πορείας. Αυτή η μετακίνηση της mAtg9 μεταξύ αυτοφαγοσωμικής μεμβράνης και περιφερικών θέσεων γίνεται με τη συμβολή των ULK1, Atg13 και της Vps34 (6,20). Η ανακύκλωση της Atg9 σε κύτταρα ζύμης παρουσιάζεται στην εικόνα 18. Αν και ο ρόλος της Atg9 δεν είναι διευκρινισμένος έχει προταθεί ότι ίσως είναι η μεταφορά μεμβρανών για την επέκταση του φαγοφόρου (13,20).

Η VMP1 ανακαλύφθηκε πρόσφατα, ενώ δεν υπάρχει κάποιο γνωστό ομόλογό της στη ζύμη. Ο ρόλος της ίσως είναι να επιστρατεύει τις πρωτεΐνες για να σχηματιστεί το σύμπλοκο της class III PI3K στην αυτοφαγοσωμική μεμβράνη (9,20).



Εικόνα 18. Η ανακύκλωση της Atg9. Πηγή: (117)

2.5 Πρωτεΐνες WIPI

Η οικογένεια των πρωτεϊνών WIPI (WD-repeat protein interacting with phosphoinositides) περιλαμβάνει τέσσερις πρωτεΐνες: WIPI-1 έως WIPI-4. Οι πρωτεΐνες αυτές δεσμεύονται στην αυτοφαγοσωμική μεμβράνη μέσω του προϊόντος της class III PI3K, δηλαδή της PI3P. Αποτελούν το ορθόλογο της Atg18 της ζύμης στα κύτταρα των θηλαστικών. Στη ζύμη η Atg18 σχηματίζει σύμπλοκο με την Atg2, το σύμπλοκο Atg18-Atg2. Το σύμπλοκο αυτό στη ζύμη συμμετέχει στην ανακύκλωση της Atg9 μεταξύ PAS και περιφερικών θέσεων. Στα κύτταρα των θηλαστικών οι πρωτεΐνες WIPI ίσως επιτελούν την αντίστοιχη λειτουργία για την mAtg9. Η παρουσία τους πάντως φαίνεται πως είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος (6,7).

2.6 Ωρίμανση των αυτοφαγοσωμάτων - σύντηξη με το λυσόσωμα

Το ολοκληρωμένο αυτοφαγόσωμα μπορεί να συντηχθεί με ένα πρώιμο ή όψιμο ενδόσωμα ή και με Μνbs σχηματίζοντας ένα αμφίσωμα το οποίο ακολούθως αποδομείται στο λυσόσωμα. Όπως προαναφέρεται ορισμένοι ερευνητές θεωρούν ότι στα κύτταρα των θηλαστικών ο σχηματισμός του αμφισώματος είναι απαραίτητος για τη διαδικασία της αυτοφαγίας. Στα κύτταρα των θηλαστικών εξάλλου τα αυτοφαγοσώματα μπορεί να σχηματιστούν οπουδήποτε μέσα στο κυττόςόλιο. Έτσι προκύπτει η ανάγκη της μεταφοράς τους στο λυσόσωμα. Τα αυτοφαγοσώματα λοιπόν κινούνται προς το λυσόσωμα κατά μήκος των μικροσωληνίσκων με τη βοήθεια της πρωτεΐνης δυνείνη (13,89,118).

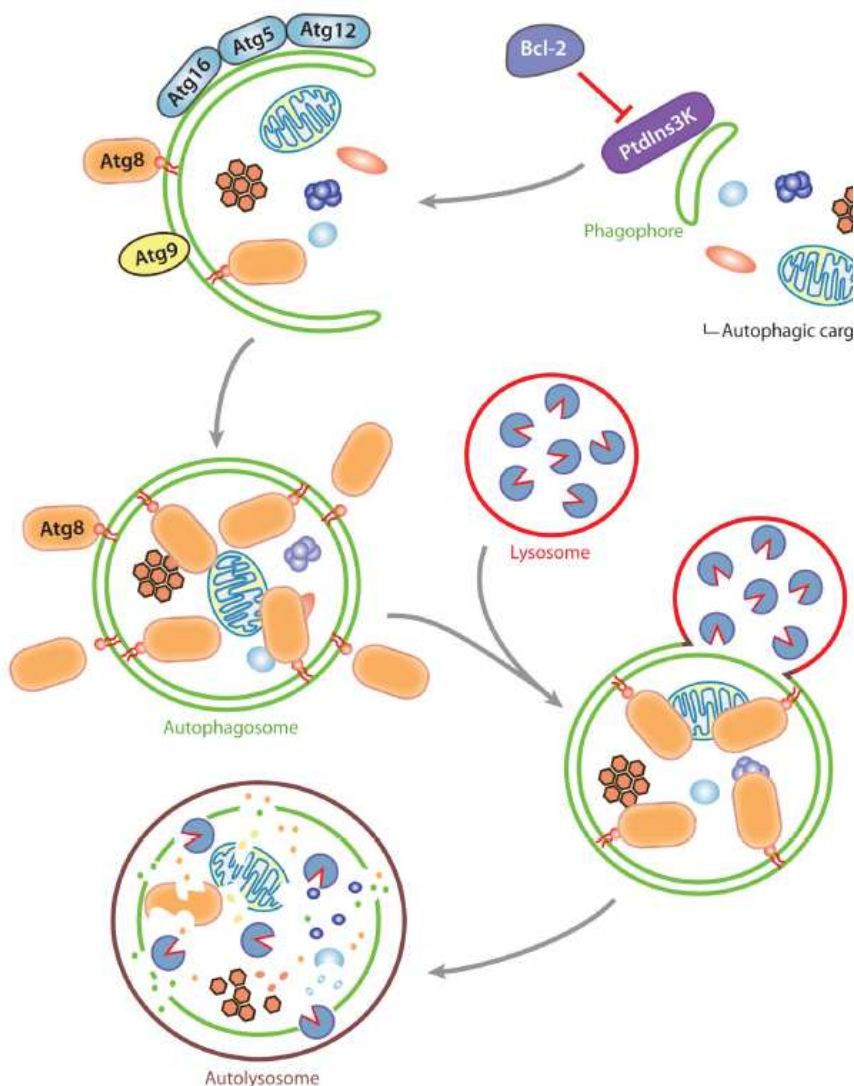
Η σύντηξη του αυτοφαγοσώματος με το λυσόσωμα πραγματοποιείται με τη βοήθεια διάφορων πρωτεϊνών. Για τη σύντηξη αυτή είναι απαραίτητος ο τύπος του συμπλόκου της class

III PI3K που περιέχει το UVRAG. Αυτός ο τύπος class III PI3K συμπλόκου φαίνεται ότι επιστρατεύει στα αυτοφαγοσώματα το ολόκληρο το μηχανισμό της σύντηξης (13). Αντίθετα το σύμπλοκο της class III PI3K που περιέχει Rubicon αναστέλλει τη σύντηξη με το λυσόσωμα (13,89,118). Άλλες πρωτεΐνες που φέρουν εις πέρας τη διαδικασία της σύντηξης είναι:

- ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) που συμμετέχει στη δημιουργία των Mnbs, στην ενδοκυττάρωση και στη σύντηξη του αυτοφαγοσώματος με ενδοσώματα ή λυσοσώματα.
- Class C Vps πρωτεΐνες που επιστρατεύονται στα αυτοφαγοσώματα μέσω του UVRAG
- Rab7 που ενεργοποιείται από τις class C Vps και UVRAG
- SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) που είναι τα βασικά συστατικά του μηχανισμού σύντηξης όλων των ενδοκυτταρικών κυστιδίων
- LAMP (Lysosomal-associated membrane proteins) που είναι λυσοσωμικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες
- DRAM (Damage-regulated autophagy modulator) που είναι λυσοσωμική διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη αυτή έχει ευρύτερο ρυθμιστικό ρόλο στην αυτοφαγική πορεία, ενώ είναι στόχος του p53 που ρυθμίζει την αυτοφαγία ως απόκριση σε γενοτοξικό στρες.

Η σύντηξη του αυτοφαγοσώματος με το λυσόσωμα τέλος επηρεάζεται και από μεταβολές του pH του λυσοσώματος καθώς και του λιπιδικού περιεχομένου των αυτοφαγοσωμάτων (13,89,118).

Τα συστατικά που παράγονται από τη διάσπαση του φορτίου των αυτοφαγοσωμάτων στο λυσόσωμα επιστρέφουν στο κυτοσόλιο μέσω πρωτεϊνικών μεμβρανικών μεταφορέων του λυσοσώματος που συνολικά ονομάζονται περμεάσες.

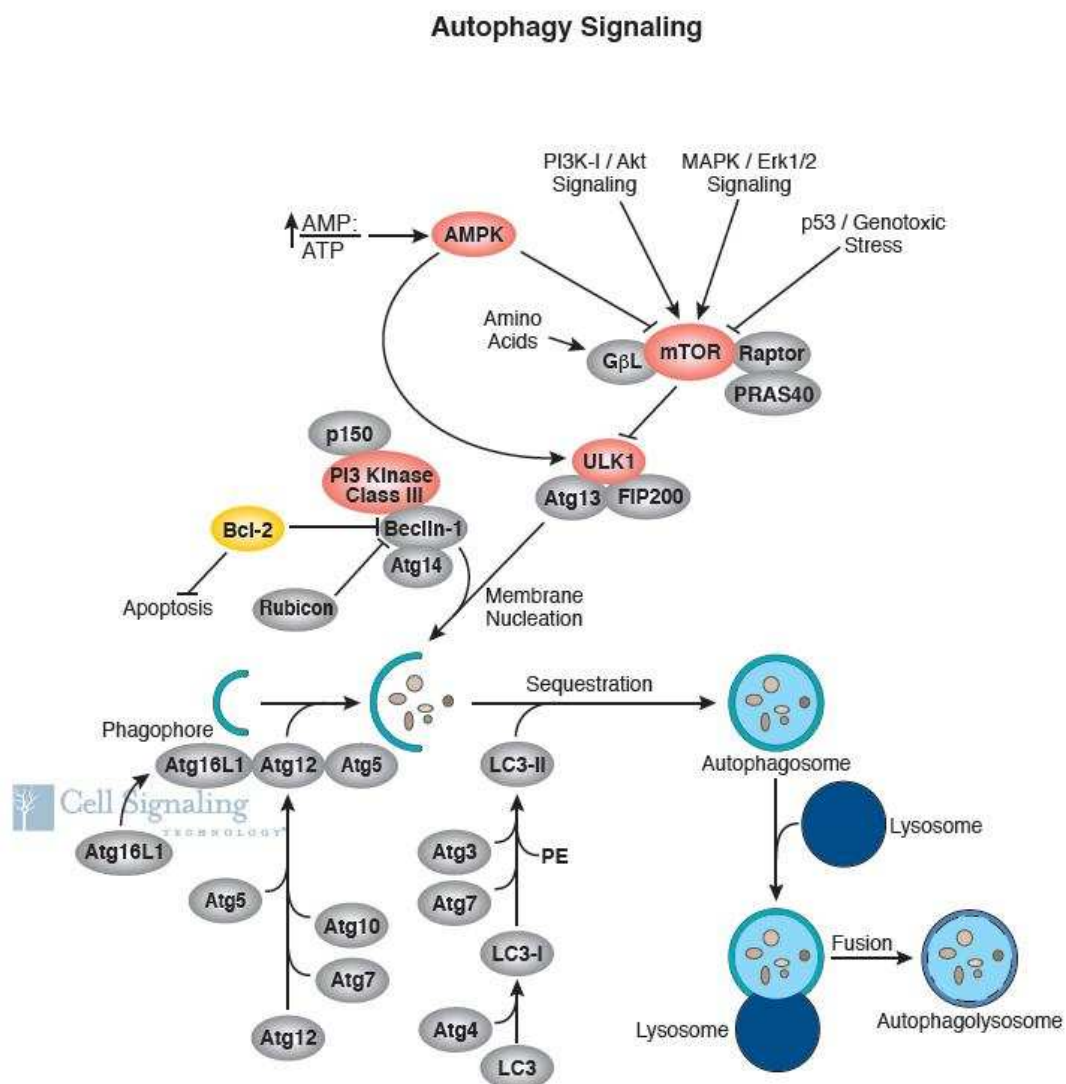


Εικόνα 19. Σχηματισμός του αυτοφαγοσώματος και σύντηξη με το λυσόσωμα. Πηγή: (8)

Η αυτοφαγία συνοπτικά είναι μια πορεία καταβολισμού ενδοκυτταρικών συστατικών στο λυσόσωμα που χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό απομονωτικών κυστιδίων, των αυτοφαγοσωμάτων. Τα αυτοφαγοσώματα σχηματίζονται με τη συμβολή των πρωτεϊνικών συμπλόκων της class III PI3K και της ULK που δρουν στο στάδιο της έναρξης, των πρωτεϊνικών συστημάτων σύζευξης, καθώς και διαμεμβρανικών και άλλων πρωτεϊνών που δρουν κατά την επέκταση της αυτοφαγοσωμικής μεμβράνης. Αμέσως μετά ή λίγο πριν την ολοκλήρωση του αυτοφαγοσώματος οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σχηματισμό του αποδεσμεύονται και επιστρέφουν στο κυτοσόλιο για να ακολουθήσει η σύντηξη με το λυσόσωμα. Στο λυσόσωμα το φορτίο των αυτοφαγοσωμάτων διασπάται με τη δράση των όξινων υδρολασών και παράγονται διάφορα μακρομόρια που επιστρέφουν στο κυτοσόλιο για να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες πορείες του κυττάρου.

3 Ρύθμιση της αυτοφαγίας

Η αυτοφαγία είναι μια διαδικασία που σε κανονικές συνθήκες εξελίσσεται στα περισσότερα κύτταρα σε ένα βασικό ρυθμό, αλλά αυξάνεται σημαντικά με την επίδραση διάφορων παραγόντων, όπως η έλλειψη θρεπτικών συστατικών και ιδιαίτερα αμινοξέων. Οι παράγοντες αυτοί ρυθμίζουν την αυτοφαγία κυρίως στο στάδιο της έναρξης. Με άλλα λόγια διάφοροι παράγοντες προκαλούν την αύξηση της δημιουργίας αυτοφαγοσωμάτων και επομένως της αυτοφαγικής πορείας. Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται οι ρυθμιστικοί παράγοντες της πορείας και οι οδοί μεταγωγής μηνύματος που ακολουθούν.



Εικόνα 20. Η πορεία και η ρύθμιση της αυτοφαγίας. Πηγή: cellsignal.com

3.1 mTOR

Η πρωτεΐνη TOR (target of rapamycin) είναι ο κύριος ρυθμιστής της αυτοφαγίας και η οδός μεταγωγής μηνύματος της TOR είναι ο πιο μελετημένος μηχανισμός ελέγχου της αυτοφαγίας,

αλλά και ο πρώτος που ανακαλύφθηκε (16,20,21). Η δραστηριότητα της TOR ρυθμίζει αρνητικά την πορεία της αυτοφαγίας, ενώ η αναστολή της TOR πυροδοτεί την αυτοφαγία. Από τις πρώτες μελέτες της πορείας της αυτοφαγίας παρατηρήθηκε ότι η πορεία πυροδοτείται από την έλλειψη θρεπτικών συστατικών και μάλιστα χαρακτηρίζεται ως προσαρμοστική απόκριση του κυττάρου στη νηστεία. Αυτή η απόκριση του κυττάρου βρέθηκε ότι μεσολαβείται από την TOR: σε επάρκεια θρεπτικών συστατικών η TOR είναι ενεργοποιημένη και αναστέλλει την πορεία της αυτοφαγίας. Αντίθετα κατά την έλλειψη θρεπτικών συστατικών η TOR απενεργοποιείται με αποτέλεσμα την πυροδότηση της αυτοφαγίας. Η TOR πέρα από τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών ενσωματώνει και άλλα ερεθίσματα για να ρυθμίσει την αυτοφαγία, αλλά και άλλες ζωτικές λειτουργίες του κυττάρου (16,20,21,31,56).

Η TOR ονομάστηκε έτσι γιατί αποτελεί στόχο της ραπαμυκίνης, μιας μυκητοκτόνου ουσίας. Η ραπαμυκίνη είναι ισχυρός αναστολέας της κυτταρικής ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού. Στις αρχές του '90 βρέθηκε ότι οι ραπαμυκίνη ασκεί αυτές τις δράσεις στη ζύμη μέσω της TOR. Σύντομα βρέθηκε το ομόλογό της στα κύτταρα των θηλαστικών (mTOR, mammalian TOR), ενώ η επίσημη ονομασία της σήμερα είναι mechanistic TOR (mTOR) (22).

Η TOR είναι κινάση θρεονίνης/σερίνης 289-kDa που ανήκει στην οικογένεια phosphatidylinositol kinase-related kinase (PIKK). Διατηρείται σε όλα τα είδη οργανισμών από τις ζύμες ως τον άνθρωπο και απαντά σε δύο διακριτά σύμπλοκα: TORC1 και TORC2.

Το mTORC1 είναι ευαίσθητο στη ραπαμυκίνη και αποτελείται από πέντε συστατικά:

- mTOR που είναι η καταλυτική υπομονάδα
- Raptor (regulatory-associated protein of mTOR)
- GβL ή mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein8)
- PRAS40 (proline-rich Akt substrate 40kDa)
- Deptor (DEP-domain-containing mTOR-interacting protein)

Το mTORC1 είναι το κύριο στοιχείο στη ρύθμιση της αυτοφαγικής πορείας.

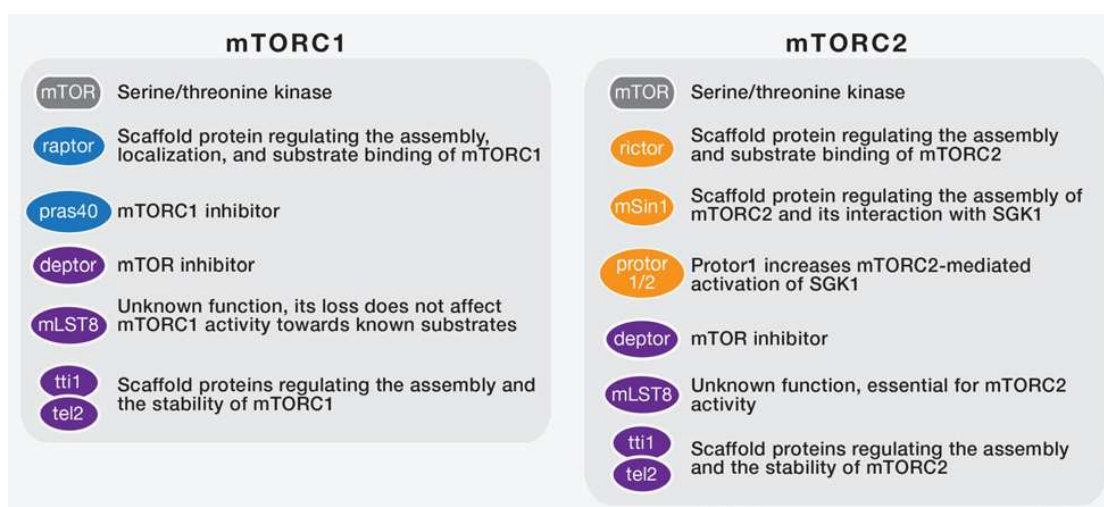
Το mTORC2 δεν είναι ευαίσθητο στη ραπαμυκίνη και αποτελείται από έξι πρωτεΐνες:

- mTOR
- Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR)
- mSIN1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein)
- Protor-1 (protein observed with Rictor-1)
- GβL ή mLST8
- Deptor

Το mTORC2 έχει έμμεσο ρόλο στη ρύθμιση της αυτοφαγίας, ενώ λίγα είναι γνωστά για τις λειτουργίες και τη ρύθμισή του. Φαίνεται να συμμετέχει στην οργάνωση του κυτταρικού σκελετού. Όσο αφορά την αυτοφαγία έχει ρυθμιστικό ρόλο τον οποίο εκδηλώνει μέσω της επίδρασής του στην Akt. Η πρωτεΐνη Akt συμμετέχει σε μια πορεία αρνητικής ρύθμισης της αυτοφαγίας και το mTORC2 συμβάλλει στην πλήρη ενεργοποίηση της Akt (13,20,21,23,24).



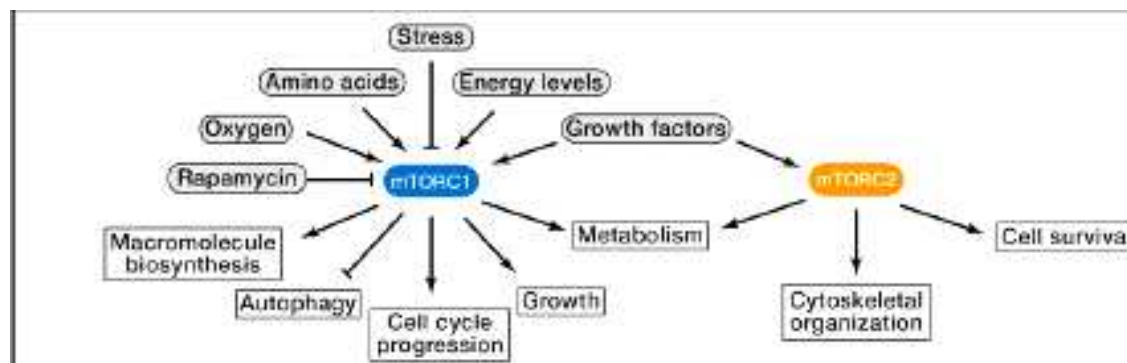
Εικόνα 21. Τα δύο σύμπλοκα της mTOR. Πηγή: (31)



Εικόνα 21^α. Τα συστατικά των συμπλόκων mTORC1 και mTORC2. Πηγή: (29)

Η mTOR εκτός από κυρίαρχος ρυθμιστής της αυτοφαγίας είναι και κομβικό μόριο για την ανάπτυξη και επιβίωση του κυττάρου και ολόκληρου του οργανισμού. Ρυθμίζει πολλές ζωτικές λειτουργίες όπως την έναρξη της μετάφρασης του mRNA, την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό, τη βιογένεση ριβοσωμάτων, τη μεταγραφή, την οργάνωση του κυτταρικού σκελετού και την αυτοφαγία (13). Η mTOR δηλαδή εκτός από την αυτοφαγία ρυθμίζει επίσης τη σύνθεση πρωτεϊνών, το μεταβολισμό, την ανάπτυξη του κυττάρου και ολόκληρου του οργανισμού. Με μία πρόταση: «η mTOR ρυθμίζει την ομοιόσταση του κυττάρου και του οργανισμού συντονίζοντας τις αναβολικές και καταβολικές διαδικασίες ανάλογα με τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, ενέργειας και οξυγόνου και τα μηνύματα των αυξητικών παραγόντων» (28). Πρόκειται λοιπόν για ένα πολύ σημαντικό μόριο που ενσωματώνει μια ποικιλία εισερχόμενων μηνυμάτων και ρυθμίζει ανάλογα τις ζωτικές λειτουργίες του κυττάρου. Όπως αποδίδεται και στην εικόνα 22 η mTOR εκτός από την αυτοφαγία ρυθμίζει τη βιοσύνθεση μακρομορίων, την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, την ανάπτυξη, το μεταβολισμό, την οργάνωση του κυτταρικού σκελετού και τελικά την ίδια την επιβίωση του κυττάρου, ενώ

ρυθμίζεται από το οξυγόνο, τα αμινοξέα, το στρες, τα επίπεδα ενέργειας και τους αυξητικούς παράγοντες (22,24,28,29,31,56). Οι Sabatini και Laplante έχουν δημιουργήσει ένα πολύ αναλυτικό διάγραμμα της ρύθμισης της mTOR (22,24) και οι Caron et.al έχουν δημιουργήσει έναν πλήρη χάρτη της πορείας μεταγωγής μηνυμάτων της mTOR (120).

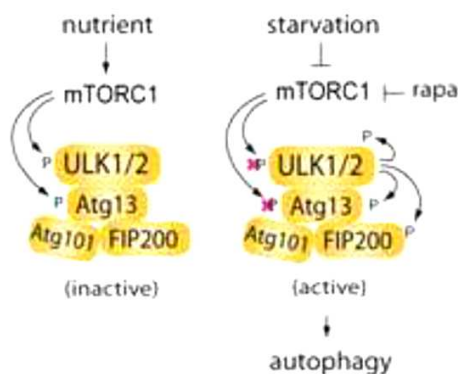


Εικόνα 22. Πηγή: (29)

Όπως φαίνεται και στο σχήμα η mTOR έχει γενικά αναβολική δράση καθώς προάγει διαδικασίες όπως η σύνθεση πρωτεϊνών και γενικά μακρομορίων. Αυτό αντανakλά άλλωστε και στον τρόπο με τον οποίο ρυθμίζει την αυτοφαγία η οποία θεωρείται μια καταβολική πορεία: η ενεργοποιημένη mTOR καταστέλλει την αυτοφαγία, ενώ η αναστολή της mTOR έχει αποτέλεσμα την πυροδότηση της αυτοφαγίας.

3.1.1 Ο μηχανισμός επαγωγής της αυτοφαγίας από το mTORC1

Αν και είναι εδώ και χρόνια γνωστό ότι η mTOR και ειδικότερα το mTORC1, ρυθμίζει την αυτοφαγία ο τρόπος με τον οποίο εκδηλώνει τη δράση της αποκαλύφθηκε σχετικά πρόσφατα. Το mTORC1 λοιπόν βρέθηκε ότι επιδρά άμεσα στο ULK σύμπλοκο καθώς τα συστατικά του mAtg13 και ULK1/ULK2 είναι στόχοι του mTORC1. Μέσω των πρωτεϊνών αυτών το mTORC1 ρυθμίζει την ενεργοποίηση και πρόσδεση του συμπλόκου ULK1-mAtg13-FIP200-Atg101 (το οποίο μπορεί να σχηματίζεται και με την ULK2) στη μεμβράνη του φαγοφόρου ανάλογα με τις συνθήκες θρέψης και γενικότερα ανάλογα με τις συνθήκες που επηρεάζουν την αυτοφαγία. Σε συνθήκες επάρκειας θρεπτικών συστατικών το ενεργοποιημένο mTORC1 συνδέεται στο ULK σύμπλοκο και αναστέλλει την ενεργοποίησή του και την πρόσδεσή του στην PAS. Σε συνθήκες νηστείας από την άλλη το mTORC1 απενεργοποιείται και αποσυνδέεται από το ULK σύμπλοκο. Έτσι το ULK σύμπλοκο ενεργοποιείται και επιστρατεύεται στην PAS όπου ξεκινά ο σχηματισμός των αυτοφαγοσωμάτων (16). Με τον τρόπο αυτό το mTORC1 κινητοποιεί το μηχανισμό για το σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων όπως αποδίδεται και στις εικόνες 13,14 και 23.



Εικόνα 23. Πηγή (27)

Όπως περιγράφεται σε προηγούμενη ενότητα το ενεργοποιημένο mTORC1 φωσφορυλιώνει τις ULK1/2 και Atg13 και αναστέλλει τη δραστηριότητα των ULK1/2 κινασών. Με την απενεργοποίηση του mTORC1 σε συνθήκες νηστείας ή υπό την επίδραση άλλων παραγόντων, η φωσφορυλίωση του ULK συμπλόκου από το mTORC1 αναστέλλεται και έτσι αίρεται η αναστολή του ULK από το mTORC1. Τότε το ULK δρώντας ως κινάση φωσφορυλιώνει τον εαυτό του, την Atg13 και τη FIP200 με αποτέλεσμα την επαγωγή της αυτοφαγίας (16,20,21,23-27).

Πέρα από την απευθείας επίδρασή του στο ULK σύμπλοκο το mTORC1 ρυθμίζει την αυτοφαγία και μέσω άλλων πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες S6K1 και 4E-BP1 που έχουν ρόλο σε πορείες σύνθεσης πρωτεϊνών και ρυθμίζονται από το mTORC1 επηρεάζουν επίσης την αυτοφαγία.

Η 4E-BP1(translation initiation factor 4E binding protein-1 ή PHAS-1) είναι μια πρωτεΐνη που αναστέλλει τη σύνθεση πρωτεϊνών, αλλά όταν φωσφορυλιώνεται από το ενεργοποιημένο mTORC1 προάγει την πρωτεϊνοσύνθεση (28).

Η S6K1 (ribosomal protein S6 Kinase-1 ή p70S6K) επίσης προάγει την πρωτεϊνοσύνθεση μέσω διάφορων μηχανισμών και ρυθμίζεται θετικά από το mTORC1 (23,24,29). Η S6K1 σε διάφορες έρευνες έχει χαρακτηριστεί ως θετικός και απαραίτητος ρυθμιστής της αυτοφαγίας (13), ενώ φαίνεται πως συμμετέχει και σε ένα μηχανισμό θετικής ανατροφοδότησης της αυτοφαγίας (13,28). Ο διπλός ρόλος της S6K1 στη ρύθμιση της αυτοφαγίας αναλύεται σε αντίστοιχη παράγραφο στη συνέχεια. Η S6K1 είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και όπως έχει βρεθεί σε έρευνες σε ποντίκια η απουσία της S6K1 έχει αποτέλεσμα τη μειωμένη ανάπτυξη και το μικρό σωματικό μέγεθος, αλλά και την αντοχή στην παχυσαρκία και βελτίωση της ινσουλινοαντοχής (23). Αυτές οι δράσεις της S6K1 ίσως οφείλονται εν μέρει και στην επίδρασή της στην αυτοφαγία.

Η mTOR λοιπόν επιδρά (μεταξύ άλλων) άμεσα στις ULK και S6K1 μέσω των οποίων ρυθμίζει την πορεία της αυτοφαγίας. Ποιοι παράγοντες όμως ενεργοποιούν ή αναστέλλουν τη δράση της mTOR για να κατευθύνει ανάλογα την πορεία της αυτοφαγίας; Οι παράγοντες αυτοί και ο τρόπος με τον οποίο ρυθμίζουν την mTOR παρουσιάζονται στη συνέχεια με την περιγραφή των οδών μεταγωγής μηνυμάτων προς την mTOR.

3.1.2 Ρύθμιση της mTOR – Οδοί μεταγωγής μηνυμάτων προς την mTOR

Το mTORC1 ενσωματώνει μια ποικιλία μηνυμάτων ώστε να ρυθμίσει πολλές διαδικασίες που εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό καθώς και την αυτοφαγία. Στα μηνύματα αυτά περιλαμβάνονται οι αυξητικοί παράγοντες, όπως ινσουλίνη και ινσουλινομιμητικός παράγοντας 1, το γενotoξικό στρες, τα επίπεδα ενέργειας, το οξυγόνο και τα αμινοξέα. Με την εξαίρεση των αμινοξέων τα παραπάνω εισερχόμενα μηνύματα ρυθμίζουν τη δραστηριότητα του mTORC1 τροποποιώντας τη δραστηριότητα του συμπλόκου TSC1-TSC2. Τα ερεθίσματα αυτά λοιπόν ρυθμίζουν το mTORC1 και την αυτοφαγία με μια πορεία μεταγωγής μηνύματος που περιλαμβάνει το TSC1-TSC2 το οποίο επιδρά σε μια GTPάση, την Rheb, που με τη σειρά της μεταβάλλει τη δραστηριότητα του mTORC1 (εικόνα 24).

Το TSC1-TSC2 (tuberous sclerosis complex) είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από το TSC1 (tuberous sclerosis 1 ή hamartin) και το TSC2 (tuberous sclerosis 2 ή tuberin). Δρα ως πρωτεΐνη ενεργοποίησης της GTPάσης (GAP) για τη μικρή GTPάση Rheb (Ras homolog enriched in brain). Δηλαδή το TSC1-TSC2 μετατρέπει την Rheb από την ενεργή GTP-δεσμευμένη μορφή της στην ανενεργή GDP-δεσμευμένη κατάστασή της. Η ενεργή GTP-δεσμευμένη μορφή της Rheb αλληλεπιδρά απευθείας με το mTORC1, με άγνωστο προς το παρόν μηχανισμό, και διεγείρει τη δράση του. Δηλαδή το TSC1-TSC2 με τη δράση του ως GAP της Rheb ρυθμίζει αρνητικά το mTORC1 (22,24,29) και επομένως προάγει την αυτοφαγία. Σημειώνεται ότι παρόλο που το TSC1-TSC2 δρα ως GAP για την Rheb, μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί αντίστοιχα κάποιος παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEF) για την Rheb (29), δηλαδή ένας GEF που να μετατρέπει την Rheb στην ενεργή GTP-δεσμευμένη μορφή της.

Από τα εισερχόμενα μηνύματα που αναφέρονται παραπάνω, οι αυξητικοί παράγοντες μπλοκάρουν τη δραστηριότητα του TSC1-TSC2 και ενεργοποιούν το mTORC1 (επομένως αναστέλλουν την αυτοφαγία), ενώ το γενotoξικό στρες και τα χαμηλά επίπεδα ενέργειας και

οξυγόνου προάγουν τη δράση του TSC1-TSC2 και αναστέλλουν το mTORC1 (με αποτέλεσμα την επαγωγή της αυτοφαγίας) (22).

Τα παραπάνω θα μπορούσαν να διατυπωθούν με τις εξής σχέσεις:

$\uparrow \text{TSC1/2} \rightarrow \downarrow \text{Rheb (GDP-bound Rheb)} \rightarrow \downarrow \text{mTORC1} \rightarrow \uparrow \text{αυτοφαγίας}$

$\downarrow \text{TSC1/2} \rightarrow \uparrow \text{Rheb (GTP-bound Rheb)} \rightarrow \uparrow \text{mTORC1} \rightarrow \downarrow \text{αυτοφαγίας}$

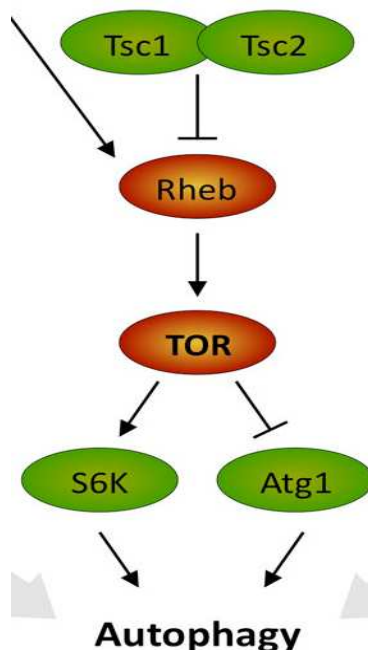
Αυξητικοί παράγοντες $\rightarrow \downarrow \text{TSC1/2} \rightarrow \uparrow \text{Rheb} \rightarrow \uparrow \text{mTORC1} \rightarrow \downarrow \text{αυτοφαγίας}$

γενετοξικό στρες

$\downarrow \text{επίπεδα ενέργειας} \rightarrow \uparrow \text{TSC1/2} \rightarrow \downarrow \text{Rheb} \rightarrow \downarrow \text{mTORC1} \rightarrow \uparrow \text{αυτοφαγίας}$

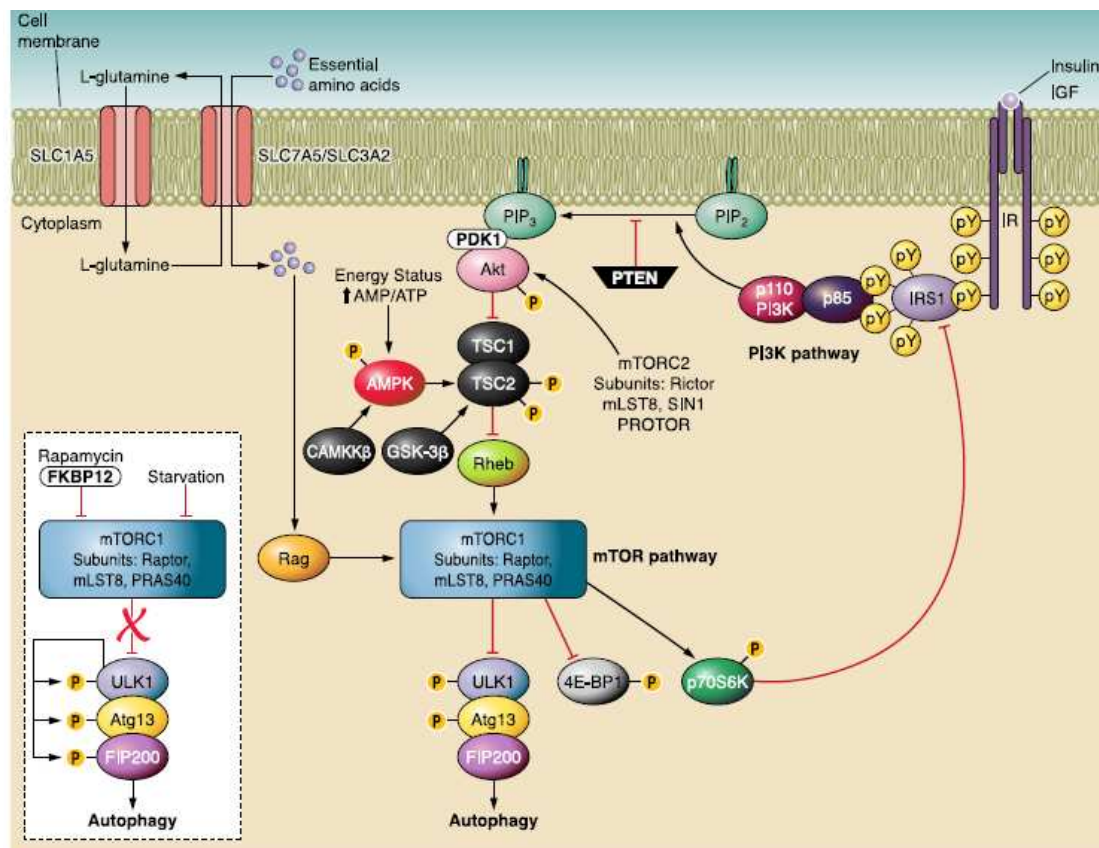
$\downarrow \text{επίπεδα οξυγόνου}$

Όπως φαίνεται και από τις παραπάνω σχέσεις και στην εικόνα 24 σε συνθήκες που ευνοείται η ανάπτυξη του κυττάρου, πχ με την επίδραση αυξητικών παραγόντων ή σε συνθήκες επάρκειας θρεπτικών συστατικών η mTOR ρυθμίζεται θετικά με τη μεσολάβηση του TSC1-TSC2 και το αποτέλεσμα ως προς την αυτοφαγία είναι κατασταλτικό. Αντίστροφα σε συνθήκες που δεν ευνοείται η ανάπτυξη ή και σε συνθήκες που απειλούν την επιβίωση, η δράση της mTOR αναστέλλεται με αποτέλεσμα την επαγωγή της αυτοφαγίας.



Εικόνα 24. Πηγή: (1)

Ποιες οδούς όμως ακολουθούν τα αρχικά ερεθίσματα για τη ρύθμιση του TSC1-TSC2 και μέσω αυτού του mTORC1 και της αυτοφαγίας; Ποιες άλλες πορείες ρύθμισης του mTORC1 υπάρχουν, εκτός από αυτή που περιλαμβάνει το TSC1-TSC2. Στη συνέχεια περιγράφονται οι διάφοροι ρυθμιστικοί παράγοντες και οι πορείες που ακολουθούν.

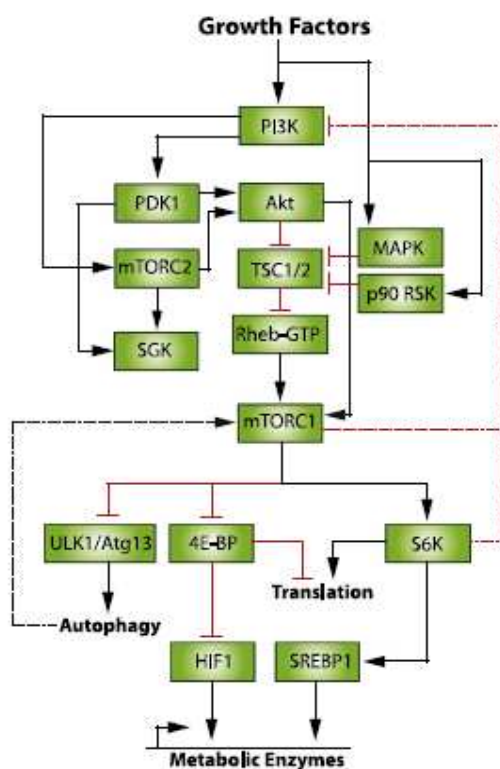


Εικόνα 25. Οι πορείες ρύθμισης της αυτοφαγίας μέσω του mTORC1. Πηγή: (13)

3.1.2.1 Αυξητικοί παράγοντες

Στους πολυκύτταρους οργανισμούς υπάρχει η ανάγκη συντονισμού των διάφορων λειτουργιών και της ανάπτυξης των ιστών ανάλογα με τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών και γενικότερα των περιβαλλοντικών συνθηκών. Το ρόλο αυτό εξυπηρετούν οι αυξητικοί παράγοντες μεταξύ των οποίων είναι η ινσουλίνη και ο ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1) (23). Τα επίπεδα αυτών των αυξητικών παραγόντων αντανακλούν και την κατάσταση θρέψης του οργανισμού. Όταν τα θρεπτικά συστατικά υπάρχουν σε αφθονία τα επίπεδα αυτών των αυξητικών παραγόντων διατηρούνται υψηλά και προάγουν αναβολικές διαδικασίες, όπως η σύνθεση πρωτεϊνών και λιπιδίων και η αποθήκευση θρεπτικών συστατικών μέσω του mTORC1 (28). Αντίθετα κατά την έλλειψη θρεπτικών συστατικών τα επίπεδα των αυξητικών παραγόντων μειώνονται και οι αναβολικές πορείες αναστέλλονται. Επιπλέον ακόμα και σε επάρκεια θρεπτικών συστατικών αν οι αυξητικοί παράγοντες απομακρυνθούν από το

εξωκυτταρικό περιβάλλον, πυροδοτείται η αυτοφαγία. Στην περίπτωση αυτή μάλιστα είναι απαραίτητη για την παραγωγή ενέργειας και τη διατήρηση των λειτουργιών του κυττάρου (8). Στα θηλαστικά οι πορείες μέσω των οποίων οι αυξητικοί παράγοντες ρυθμίζουν την αυτοφαγία είναι διαφορετικές από αυτές των θρεπτικών συστατικών, αλλά και οι δύο συγκλίνουν στην mTOR (8). Οι αυξητικοί παράγοντες στα θηλαστικά ρυθμίζουν την αυτοφαγία μέσω της πορείας της PI3K.



Εικόνα 26. Η ρύθμιση του mTORC1 και της αυτοφαγίας από τους αυξητικούς παράγοντες. Οι μαύρες γραμμές δείχνουν πορεία ενεργοποίησης, ενώ οι κόκκινες δείχνουν ανασταλτική πορεία. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν ότι δεν υπάρχει κάποια γνωστή απευθείας αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών. Πηγή: (28)

Η πορεία PI3K-Akt-mTORC1

Στα κύτταρα των θηλαστικών στην πορεία της αυτοφαγίας συμμετέχουν δύο κινάσες φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης: η class III PI3K η οποία είναι συστατικό του μηχανισμού του σχηματισμού των αυτοφαγοσωμάτων και η class I PI3K η οποία έχει ρυθμιστικό ρόλο στην αυτοφαγία και συμμετέχει σε πορείες μεταγωγής μηνυμάτων. Ενώ η class III PI3K είναι απαραίτητη για το σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων και επομένως επιδρά θετικά στην αυτοφαγία, η class I PI3K ρυθμίζει αρνητικά την αυτοφαγική πορεία. Στη συνέχεια του κειμένου η class I PI3K γράφεται ως PI3K.

Η πορεία της PI3K (συχνά ονομάζεται πορεία PI3K-Akt-mTORC1) ξεκινά με τη δέσμευση της ινσουλίνης ή του IGF-1 στον αντίστοιχο μεμβρανικό υποδοχέα (IR). Με τη δέσμευση της

ινσουλίνης ο IR ενεργοποιείται και μπορεί να δεσμεύει και να φωσφορυλιώνει το IRS (insulin receptor substrate). Αυτό έχει αποτέλεσμα τη δέσμευση της PI3K στο IRS και την ενεργοποίησή της. Η ενεργοποιημένη PI3K μετατρέπει το λιπίδιο της μεμβράνης PIP2 (4,5-διφωσφο-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη) σε PIP3 (3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη). Μέσω του PIP3 που παράγεται επιστρατεύονται στη μεμβράνη η Akt (ονομάζεται και PKB, protein kinase B), αλλά και ο ενεργοποιητής της PDK1 (phosphoinositide-dependent protein kinase 1). Με τον τρόπο αυτό η Akt ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει το TSC2. Η φωσφορυλίωση του TSC2 προκαλεί την αποσταθεροποίηση του συμπλόκου TSC1-TSC2 και την αναστολή του σχηματισμού του. Αυτό έχει αποτέλεσμα η Rheb να διατηρείται στην ενεργή GTP-δεσμευμένη μορφή της η οποία δεσμεύεται στο mTORC1 και το ενεργοποιεί. Το ενεργοποιημένο mTORC1 προάγει αναβολικές διαδικασίες και αναστέλλει την αυτοφαγία. Συνολικά λοιπόν η ενεργοποίηση της PI3K-Akt-mTORC1 πορείας από αυξητικούς παράγοντες όπως η ινσουλίνη και ο IGF-1 έχει αποτέλεσμα την αναστολή της αυτοφαγίας (8).

Αναλυτικότερα οι υποδοχείς ινσουλίνης και IGF-1 στην επιφάνεια του κυττάρου είναι τυροσινικές κινάσες που με τη δέσμευση του υποστρώματος αυτοφωσφορυλιώνονται και ενεργοποιούνται (20). Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς επιστρατεύουν και φωσφορυλιώνουν τα υποστρώματα υποδοχέων ινσουλίνης 1 και 2 (IRS1, IRS2) και έτσι δημιουργείται μια «θέση ελλιμενισμού» στην οποία προσδένεται η PI3K μέσω της υπομονάδας της p85 (8). Οι υποδοχείς τυροσινικής κινάσης μπορούν επίσης να δεσμεύουν και απευθείας την class I PI3K (30). Η PI3K φωσφορυλιώνει το λιπίδιο της μεμβράνης 4,5-διφωσφο-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP2) προς 3,4,5-τριφωσφο-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP3). Η αντίδραση αυτή αντιστρέφεται από τη φωσφατάση PTEN (3'-phosphoinositide phosphatase). Έτσι η δράση της PTEN ελαττώνει τη δράση της πορείας μεταγωγής μηνύματος της Akt και ρυθμίζει θετικά την αυτοφαγία (8). Το PIP3 που σχηματίζεται με τη δράση της PI3K επιστρατεύει στη μεμβράνη τόσο την κινάση Akt όσο και τον ενεργοποιητή της PDK1 με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της Akt. Η ενεργοποιημένη Akt φωσφορυλιώνει το TSC2 και αναστέλλει την αλληλεπίδρασή του με το TSC1 για το σχηματισμό του συμπλόκου TSC1-TSC2, γεγονός που έχει αποτέλεσμα την παρουσία της Rheb στην ενεργή GTP-δεσμευμένη μορφή της που οδηγεί σε ενεργοποίηση του mTORC1 και αναστολή της αυτοφαγίας. Αντίθετα, απουσία αυξητικών παραγόντων αίρεται η ανασταλτική δράση της mTORC1 και πυροδοτείται η αυτοφαγία (8).

Η πλήρης ενεργοποίηση του Akt απαιτεί και τη δράση του mTORC2 (20). Το mTORC2 ενεργοποιείται με έναν άγνωστο μηχανισμό από τους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης και φωσφορυλιώνει την Akt σε μία θέση διαφορετική (στη Ser473) από τη θέση φωσφορυλίωσης

από τον ενεργοποιητή της PDK1(Ser308) (30). Δηλαδή το mTORC2 αναστέλλει την αυτοφαγία μέσω της ενεργοποίησης της Akt. Η Akt συνεχίζει να είναι ενεργή και χωρίς τη δράση του mTORC2, αλλά δεν είναι πλήρως ενεργοποιημένη.

Η ενεργοποιημένη Akt ρυθμίζει επίσης το mTORC1 άμεσα (χωρίς τη μεσολάβηση του TSC1-TSC2 συμπλόκου) φωσφορυλιώνοντας την υπομονάδα του PRAS40 (28, 29). Η PRAS40 είναι αναστολέας του mTORC1. Η ενεργοποιημένη Akt φωσφορυλιώνει την PRAS40, γεγονός που προκαλεί την αποσύνδεσή της από το mTORC1 και την άρση της αναστολής που ασκείται. Συνολικά δηλαδή η ενεργοποίηση της Akt από τους αυξητικούς παράγοντες έχει αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του mTORC1 μέσω της αποσύνδεσης του PRAS40 και επομένως αναστολή της αυτοφαγίας (24,27,30).

Η πορεία της PI3K λοιπόν ενεργοποιείται από τους αυξητικούς παράγοντες και αναστέλλει την αυτοφαγία μέσω του mTORC1. Η πορεία της PI3K ρυθμίζεται αρνητικά από την PTEN, ενώ ενισχύεται από τη δράση του mTORC2. Κατά την πορεία αυτή τέλος το mTORC1 ενεργοποιείται είτε μέσω του TSC1-TSC2 συμπλόκου, είτε μέσω της αποσύνδεσης της ανασταλτικής υπομονάδας PRAS40.

Ras

Οι Ras είναι μικρές GTPάσες που μεταβιβάζουν μηνύματα από μεμβρανικούς υποδοχείς τυροσινικής κινάσης των αυξητικών παραγόντων προς ενδοκυτταρικούς τροποποιητές. Όσο αφορά την αυτοφαγία συμμετέχουν σε δύο πορείες μεταγωγής μηνύματος: στην πορεία της PI3K και στην πορεία Ras-Raf-1-ERK1/2 (8,28,31).

Οι Ras ενεργοποιούνται από αυξητικούς παράγοντες και ενισχύουν την PI3K πορεία επιδρώντας στην PI3K. Επομένως κατά την πορεία αυτή οι Ras υπό την επίδραση των αυξητικών παραγόντων ρυθμίζουν αρνητικά την αυτοφαγία. Η πορεία αυτή βρέθηκε σε MEFs (mouse embryonic fibroblasts). Στην περίπτωση αυτή βρέθηκε ότι οι Ras ρυθμίζουν την αυτοφαγία μόνο μέσω της PI3K πορείας και όχι μέσω της Ras-Raf-1-ERK1/2 πορείας (8).

Η Ras-Raf-1-ERK1/2 είναι μια πορεία που ρυθμίζει θετικά την αυτοφαγία ως απόκριση στην έλλειψη αμινοξέων. Στην περίπτωση αυτή ο Raf-1 λειτουργεί ως αισθητήρας αμινοξέων και κατά την έλλειψη αμινοξέων πυροδοτεί την αυτοφαγία μέσω της πορείας αυτής. Η συγκεκριμένη πορεία (περιγράφεται πιο αναλυτικά στην ενότητα της ρύθμισης των αμινοξέων) βρέθηκε σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του κόλον (8).

Οι Ras επομένως είναι πιθανό να έχουν διπλό ρόλο στη ρύθμιση της αυτοφαγίας: α) να αναστέλλουν την αυτοφαγία ως απόκριση στους αυξητικούς παράγοντες και β) να πυροδοτούν την αυτοφαγία ως απόκριση στα χαμηλά επίπεδα αμινοξέων. Στη δεύτερη περίπτωση ωστόσο η κινητοποίηση της αντίστοιχης πορείας διαπιστώθηκε σε καρκινικά κύτταρα. Σε καρκινικά κύτταρα συχνά διάφορες αποκρίσεις είναι τροποποιημένες καθώς στα κύτταρα αυτά επιδρούν διάφοροι στρεσογόνοι παράγοντες και το γενετικό τους υλικό έχει μεταβληθεί.

S6K

Η ενεργοποίηση του mTORC1 από τους αυξητικούς παράγοντες έχει αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της S6K η οποία είναι μια κινάση που προάγει την πρωτεϊνσύνθεση. Η S6K όπως φαίνεται και στην εικόνα 26 συμμετέχει σε μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης της PI3K. Η S6K επομένως ρυθμίζοντας αρνητικά την PI3K πορεία είναι δυνατό να ασκεί μια θετική ανατροφοδότηση στην αυτοφαγία υπό την επίδραση των αυξητικών παραγόντων. Ο τρόπος δράσης της S6K και οι επιδράσεις της στην αυτοφαγία περιγράφονται πιο αναλυτικά και στην ενότητα της ανατροφοδοτικής ρύθμισης της αυτοφαγίας.

Συνολικά επομένως τα υψηλά επίπεδα αυξητικών παραγόντων, που είναι ενδεικτικό της επάρκειας θρεπτικών συστατικών, ενεργοποιούν το mTORC1 με αποτέλεσμα την προαγωγή αναβολικών διαδικασιών και την αναστολή της αυτοφαγίας. Αντίθετα σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών τα επίπεδα των αυξητικών παραγόντων μειώνονται με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του mTORC1 και την πυροδότηση της αυτοφαγίας. Τα επίπεδα των αυξητικών παραγόντων (ινσουλίνης και IGF-1) είναι πολύ σημαντικός παράγοντας στη ρύθμιση της αυτοφαγίας, ίσως σημαντικότερος και από τα θρεπτικά συστατικά: απουσία των αυξητικών παραγόντων πυροδοτείται στο κύτταρο η πορεία της αυτοφαγίας ακόμα και αν το περιβάλλον του κυττάρου είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά.

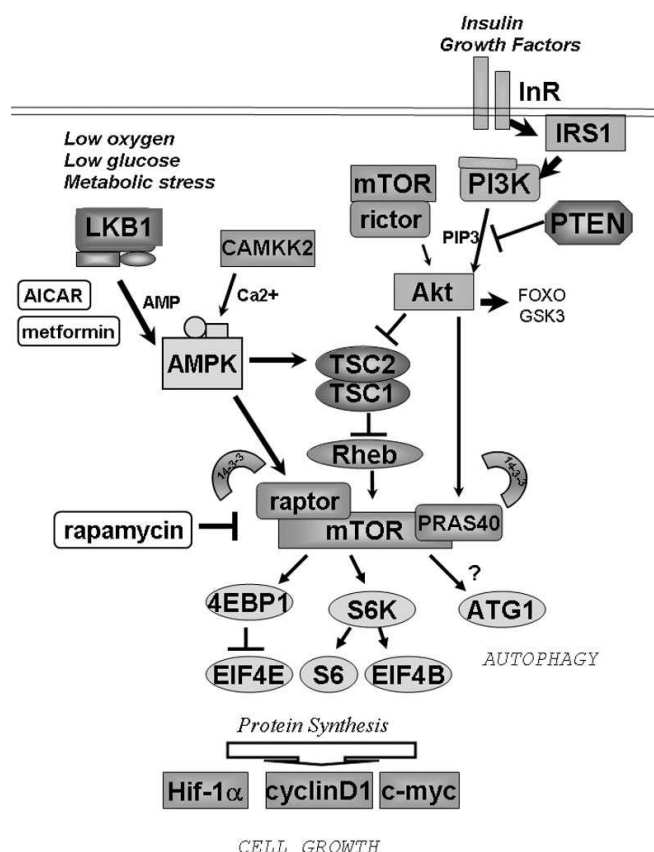
Οι αυξητικοί παράγοντες επιδρούν στην αυτοφαγία μέσω της PI3K πορείας και πιθανόν μέσω των MAP κινασών (Ras-Raf-1-ERK1/2 πορεία). Η PI3K πορεία ρυθμίζει αρνητικά την αυτοφαγία μέσω του mTORC1. Η δράση της PI3K ενισχύεται από το mTORC2, ενώ ρυθμίζεται αρνητικά από τη φωσφατάση PTEN και την S6K. Η κινητοποίηση της PI3K πορείας ως απόκριση στους αυξητικούς παράγοντες είναι επίσης πιθανό να ενισχύεται από τις Ras GTPάσες.

3.1.2.2 Επίπεδα ενέργειας – AMPK

Από τους κύριους ρόλους της αυτοφαγίας είναι η προσαρμογή του κυττάρου και ολόκληρου του οργανισμού σε συνθήκες έλλειψης ενέργειας και θρεπτικών συστατικών. Όπως παρατηρήθηκε από τις αρχικές ακόμα μελέτες για την αυτοφαγία, σε συνθήκες έλλειψης ενέργειας οι αναβολικές διαδικασίες του κυττάρου αναστέλλονται, ενώ διάφορα συστατικά του κυττάρου αποδομούνται μέσω της αυτοφαγίας ώστε τα προϊόντα που προκύπτουν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ενέργειας στη μορφή του ATP. Και αυτή η ρυθμιστική πορεία εξελίσσεται μέσω του mTORC1.

Η ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου αποτυπώνεται από το λόγο ATP/AMP. Η κινάση AMPK (AMP-activated protein kinase) δρα ως αισθητήρας της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου και ενεργοποιείται με την μείωση του λόγου ATP/AMP. Έτσι τα χαμηλά επίπεδα ενέργειας είτε οφείλονται σε μειωμένη παραγωγή ATP λόγω πχ εξάντλησης της γλυκόζης και γενικότερα των θρεπτικών συστατικών, είτε οφείλονται σε αυξημένη κατανάλωση ATP, όπως συμβαίνει πχ σε μυικές συστολές, ενεργοποιούν την AMPK.

Η ενεργοποιημένη AMPK αναστέλλει τη δράση του mTORC1 με δύο τρόπους: α) φωσφορυλιώνει το TSC2 και ενεργοποιεί το σύμπλοκο TSC1-TSC2, β) φωσφορυλιώνει την υπομονάδα του mTORC1 Raptor. Το αποτέλεσμα και στις δύο περιπτώσεις είναι η αναστολή του mTORC1 και συνεπώς η επαγωγή της αυτοφαγίας. Η ενεργοποίηση της AMPK με την μείωση του λόγου ATP/AMP γίνεται μέσω της φωσφορυλίωσής της από την κινάση LKB1, η οποία είναι πρωτεΐνη με ογκοκατασταλτική δράση. Η AMPK μάλιστα είναι απαραίτητη για την αυτοφαγία καθώς έχει βρεθεί πως η αναστολή της καταστέλλει ισχυρά την αυτοφαγία (8,13,20,22-24,29,31).

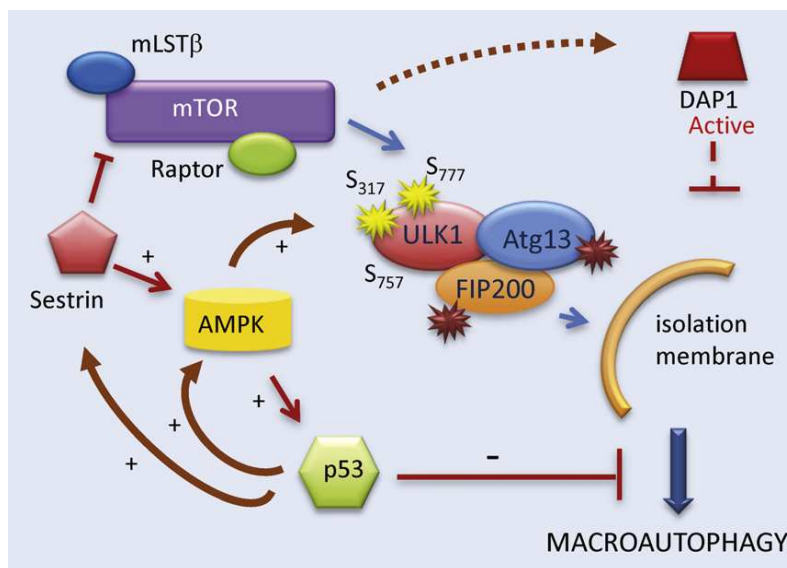


Εικόνα 27. Η πορεία της AMPK και της PI3K στη ρύθμιση του mTORC1 και της αυτοφαγίας. Πηγή: (90)

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 27 η AMPK ενεργοποιείται από την LKB1 όχι μόνο από τα χαμηλά επίπεδα γλυκόζης, αλλά γενικότερα σε μεταβολικό στρες και σε συνθήκες υποξίας. Έτσι για παράδειγμα όταν τα επίπεδα οξυγόνου στα κύτταρα είναι χαμηλά, μειώνεται και η αναπνοή στα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα την ελάττωση της παραγωγής ATP που οδηγεί στην ενεργοποίηση της AMPK. Η AMPK εξάλλου ενεργοποιείται και από την CaMKKβ (Ca/calmodulin-dependent kinase kinase-β) όταν αυξάνεται η συγκέντρωση του ελεύθερου ασβεστίου στο κυττόςόλιο. Η αύξηση του κυττοσολικού ασβεστίου μπορεί να προκληθεί από διάφορους παράγοντες, πχ στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, με αποτέλεσμα την αύξηση της αυτοφαγίας. Η κυτταροκίνη TRAIL η οποία προκαλεί απόπτωση επίσης έχει βρεθεί ότι προάγει την αυτοφαγία μέσω της AMPK την οποία ενεργοποιεί μέσω της κινάσης TAK1 (transforming growth factor-β-activating kinase 1). Επιπλέον η AMPK πυροδοτεί την αυτοφαγία και μέσω μηχανισμών που δεν περιλαμβάνουν το mTORC1. Σε στρεσογόνες συνθήκες η AMPK ενεργοποιείται από την LKB1 και φωσφορυλιώνει και σταθεροποιεί έναν αναστολέα του κυτταρικού κύκλου, τον p27^{kip1}, ο οποίος πυροδοτεί την αυτοφαγία (8,13,20,22-24,29,31,38). Η πιο σημαντική οδός ενεργοποίησης της αυτοφαγίας από την AMPK που δεν μεσολαβείται από το mTORC1 περιγράφεται στη συνέχεια.

Πρόσφατα βρέθηκε ότι η AMPK μπορεί να προάγει την αυτοφαγία και με πιο άμεσο τρόπο επιδρώντας απευθείας στην ULK1 παρακάμπτοντας το mTORC1 (32-36). Σε συνθήκες νηστείας η AMPK φωσφορυλιώνει τη ULK1 στη Ser317 και στη Ser777 με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή της και την αποσύνδεσή της από το mTORC1 που οδηγεί στην έναρξη του σχηματισμού αυτοφαγοσωμάτων. Αντίθετα σε επάρκεια θρεπτικών συστατικών το ενεργό mTORC1 φωσφορυλιώνει την ULK1 στη Ser757 και διακόπτει αυτή την αλληλεπίδραση μεταξύ AMPK και ULK1 (32,35). Έχει προταθεί μάλιστα ότι η φωσφορυλίωση του ULK1 από την AMPK είναι απαραίτητη για την εκλεκτική αυτοφαγία μιτοχονδρίων που θεωρείται μια απόκριση του κυττάρου στη νηστεία που είναι απαραίτητη για την επιβίωση (32).

Ο διπλός έλεγχος της φωσφορυλίωσης του ULK1 από την AMPK, (αφενός η άμεση ενεργοποίηση, αφετέρου η ενεργοποίηση μέσω της αναστολής του mTORC1) εξασφαλίζει ότι η διαδικασία της αυτοφαγίας εκκινείται μόνο όταν οι συνθήκες το απαιτούν (32,35).



Εικόνα 28. Πηγή: (36)

Και η ULK1 όμως ρυθμίζει την AMPK και μάλιστα με αρνητικό τρόπο (35). Η ULK1 φωσφορυλιώνει την AMPK και στις τρεις υπομονάδες της και αναστέλλει τη δράση της. Έτσι δημιουργείται ένας μηχανισμός αρνητικής ανατροφοδότησης για την αυτοφαγία κατά τον οποίο ένα απαραίτητο συστατικό του μηχανισμού των αυτοφαγοσωμάτων (δηλαδή η ULK1) ασκεί ταυτόχρονα και μια ανασταλτική δράση στην πορεία (37).

Η εξάντληση των ενεργειακών αποθεμάτων του κυττάρου λοιπόν πυροδοτεί την αυτοφαγία μέσω της AMPK. Τα χαμηλά επίπεδα ATP προκαλούν την ενεργοποίηση της AMPK από την

LKB1. Η AMPK ακολουθώς αναστέλλει τη δράση του mTORC1 είτε επιδρώντας άμεσα στην υπομονάδα του Raptor, είτε μέσω του συμπλόκου TSC1-TSC2 με αποτέλεσμα την επαγωγή της αυτοφαγίας. Η AMPK εκτός από τα χαμηλά επίπεδα ενέργειας ενεργοποιείται και από άλλους παράγοντες, όπως η υποξία, αλλά και από την αύξηση του κυτοσολικού ασβεστίου μέσω της CaMKKβ. Επιπλέον η AMPK μπορεί να ενεργοποιεί την αυτοφαγία επιδρώντας άμεσα στη ULK1, από την οποία και αναστέλλεται.

Η AMPK είναι ένα ετεροτριμερές που αποτελείται από τρεις υπομονάδες: την υπομονάδα α που είναι η καταλυτική υπομονάδα, την β που περιλαμβάνει μια περιοχή αισθητήρα γλυκογόνου και την γ υπομονάδα που περιέχει δύο θέσεις δέσμευσης για τους αλλοστερικούς τροποποιητές της ATP και AMP. Με την ενεργοποίησή της διεγείρει καταβολικές πορείες προκειμένου να παραχθεί ATP και παράλληλα αναστέλλει διαδικασίες στις οποίες καταναλώνεται ATP όπως βιοσυνθετικές πορείες, την κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό. Πέρα από τη δράση της ως αισθητήρας της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου φαίνεται ότι έχει ευρύτερο ρόλο στη διατήρηση του ενεργειακού ισοζυγίου ολόκληρου του σώματος καθώς αλληλεπιδρά με ορμόνες και κυτταροκίνες όπως η ινσουλίνη, η λεπτίνη και η αδιπονεκτίνη. Συμμετέχει στη ρύθμιση πολλών διαδικασιών του κυττάρου και ίσως να ευθύνεται εν μέρει για τις θετικές επιδράσεις της σωματικής άσκησης στην υγεία και στην αντιδιαβητική δράση της μετορμίνης, ενώ εξετάζεται η συμμετοχή της σε νέα θεραπευτικά σχήματα για την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας, του ΣΔ II και του μεταβολικού συνδρόμου (121). Οι επιδράσεις αυτές ενδεχομένως οφείλονται τουλάχιστον εν μέρει και στην αύξηση των ρυθμών της αυτοφαγίας. Δεδομένου ότι η AMPK ρυθμίζει την αυτοφαγία των κυττάρων όπως περιγράφεται πιο πάνω, δυνητικά οι ρυθμιστές της AMPK ίσως είναι ρυθμιστές και της αυτοφαγίας. Ωστόσο δεν έχει επιβεβαιωθεί ότι όλοι οι παράγοντες που ενεργοποιούν την AMPK κινητοποιούν και την αυτοφαγία.

3.2 Γλυκόζη

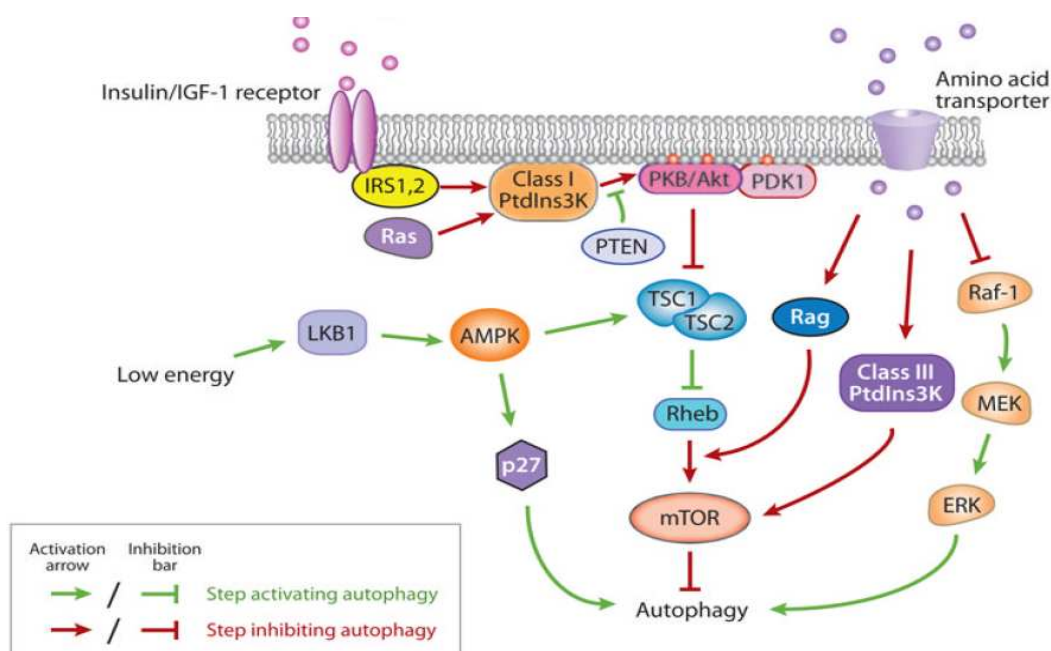
Η ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τα αποθέματα γλυκόζης. Η έλλειψη γλυκόζης πυροδοτεί την αυτοφαγία μέσω του mTORC1. Η αναστολή του mTORC1 σε έλλειψη γλυκόζης γίνεται μέσω δύο οδών: α) μέσω της AMPK και β) μέσω της αφυδρογονάσης GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

Με την εξάντληση της γλυκόζης στο κύτταρο μειώνονται γρήγορα τα επίπεδα ATP με αποτέλεσμα τη μείωση του λόγου ATP/AMP και την ενεργοποίηση της AMPK με τη φωσφορυλίωσή της από την LKB1. Η ενεργοποιημένη AMPK όπως περιγράφεται παραπάνω

αναστέλλει το mTORC1 είτε μέσω του TSC1-TSC2, είτε μέσω του Raptor με αποτέλεσμα την επαγωγή της αυτοφαγίας.

Η δεύτερη οδός ενεργοποίησης της αυτοφαγίας σε χαμηλά επίπεδα γλυκόζης περιλαμβάνει την αφυδρογονάση GAPDH. Η GAPDH ρυθμίζει αρνητικά το mTORC1 μέσω της Rheb με τρόπο που δεν περιλαμβάνει το TSC1-TSC2. Ενδιαφέρον είναι ότι αυτή η οδός επαγωγής της αυτοφαγίας φαίνεται να ενεργοποιείται από την ελάττωση της γλυκολυτικής πορείας παρά από τα μειωμένα επίπεδα γλυκόζης.

Είναι πιθανό λοιπόν η πορεία AMPK-mTORC1 να ρυθμίζει την αυτοφαγία ανάλογα με την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου και την επίδραση στρεσογόνων παραγόντων, ενώ η πορεία GAPDH-mTORC1 να ρυθμίζει την αυτοφαγία ανάλογα με το μεταβολισμό της γλυκόζης. Και οι δύο πορείες συγκλίνουν στο mTORC1 το οποίο σε χαμηλά επίπεδα ενέργειας ή γλυκόζης πυροδοτεί την αυτοφαγία και κατευθύνει τις διάφορες διαδικασίες του κυττάρου προς την παραγωγή ενέργειας αναστέλλοντας ταυτόχρονα διαδικασίες στις οποίες καταναλώνεται ATP (27).



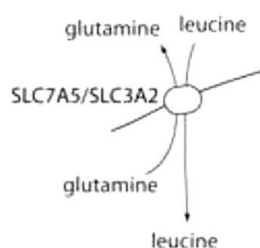
Εικόνα 29. Η ρύθμιση της αυτοφαγίας. Πηγή: (8)

3.3 Αμινοξέα

Η απουσία των αμινοξέων αποτελεί ισχυρό αναστολέα του mTORC1 και πυροδοτεί άμεσα την αυτοφαγία στα κύτταρα. Η απουσία των αμινοξέων μάλιστα αναστέλλει τη δράση του mTORC1 ακόμα και αν υπάρχει διέγερση από τους αυξητικούς παράγοντες (23). Η αναστολή του

mTORC1 γίνεται τόσο με την ολική απομάκρυνση των αμινοξέων όσο και με την έλλειψη κάποιων μεμονωμένων αμινοξέων, όπως η λευκίνη και η αργινίνη. Έτσι για παράδειγμα η απομάκρυνση την λευκίνης είναι ικανή να εκκινήσει τη διαδικασία της αυτοφαγίας ακόμα και αν υπάρχουν άλλα διαθέσιμα αμινοξέα και επιπλέον ακόμα και αν επιδρούν στο κύτταρο αυξητικοί παράγοντες (23,27). Εξάλλου τα επίπεδα των απαραίτητων αμινοξέων και ιδιαίτερα των διακλαδισμένων (όπως η λευκίνη) ενδοκυτταρικά ελαττώνονται πολύ γρήγορα με την απομάκρυνση των αμινοξέων από το περιβάλλον του κυττάρου. Γι αυτό ίσως τα αμινοξέα αυτά ίσως είναι και τα πρώτα που επιδρούν στο mTORC1 (43).

Η πρόσληψη αμινοξέων από τα κύτταρα γίνεται μέσω μιας ομάδας μεμβρανικών μεταφορέων που ονομάζονται SLC (solute-linked carrier) πρωτεΐνες (27). Η λευκίνη που έχει βρεθεί ότι έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του mTORC1 και της αυτοφαγίας εισέρχεται στο κύτταρο με την αντιμεταφορά της με L-γλουταμίνη: η L-γλουταμίνη εισέρχεται στο κύτταρο μέσω του SLC1A5 (solute carrier family1 member5) και σχεδόν ταυτόχρονα εξέρχεται από το κύτταρο μέσω του αντιμεταφορέα SLC7A5/SLC3A2 ανταλλασσόμενη με λευκίνη (27,28).



Εικόνα 30. Αντιμεταφορά γλουταμίνης-λευκίνης. Πηγή: (27)

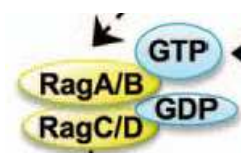
Η απώλεια της λειτουργίας της SLC1A5 η οποία εισάγει στο κύτταρο τη γλουταμίνη έχει βρεθεί ότι πυροδοτεί την αυτοφαγία. Το γεγονός αυτό ερμηνεύει και την ικανότητα της λευκίνης να πυροδοτεί την αυτοφαγία: η μη κανονική λειτουργία της SLC1A5 μειώνει τα επίπεδα γλουταμίνης στο κύτταρο με αποτέλεσμα και την αδυναμία λειτουργίας της SLC7A5/SLC3A2 για την είσοδο της λευκίνης στο κύτταρο που οδηγεί σε αναστολή του mTORC1 και την επαγωγή της αυτοφαγίας (27,39).

Παρόλο που η επίδραση των αμινοξέων στην αυτοφαγία και στη δράση του mTORC1 είναι γνωστή εδώ και αρκετά χρόνια, ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα αμινοξέα ενεργοποιούν το mTORC1 και αναστέλλουν την αυτοφαγία δεν είναι ακόμα διευκρινισμένος. Αυτό που έχει αποδειχτεί είναι ότι η πορεία ενεργοποίησης του mTORC1 από τα αμινοξέα δεν περιλαμβάνει το TSC1-TSC2, καθώς σε κύτταρα με έλλειψη του συμπλόκου αυτού το mTORC1 εξακολουθεί να αποκρίνεται στη ρύθμιση των αμινοξέων (24). Επομένως το mTORC1 ενεργοποιείται από τα αμινοξέα μέσω κάποιων άλλων πρωτεϊνών. Για τη ρύθμιση του mTORC1 και της αυτοφαγίας

από τα αμινοξέα έχουν προταθεί διάφορες πορείες, όπως: οι Rag GTPάσες, η πορεία των MAPK, η Vps34 και η IPMK (8,29).

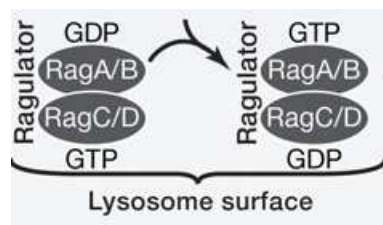
Οι Rag GTPάσες

Η πορεία ρύθμισης του mTORC1 από τα αμινοξέα μέσω των Rag GTPασών φαίνεται να είναι ο πιο πιθανός μηχανισμός με τον οποίο τα αμινοξέα ρυθμίζουν τη δράση του mTORC1 και την αυτοφαγία καθώς έχει περιγραφεί από δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες (24). Στα κύτταρα των θηλαστικών υπάρχουν 4 Rag πρωτεΐνες: RagA, RagB, RagC, RagD. Αυτές οι μικρές GTPάσες σχηματίζουν ετεροδιμερή που αποτελούνται από RagA ή RagB και RagC ή RagD.



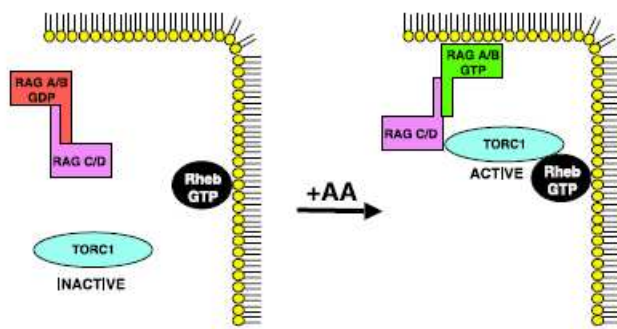
Εικόνα 31. Το ετεροδιμερές των Rag στην ενεργή διαμόρφωσή του. Πηγή: (41)

Σε συνθήκες έλλειψης αμινοξέων οι RagA/B δεσμεύουν GDP και οι RagC/D δεσμεύουν GTP. Με την παροχή αμινοξέων στο κύτταρο γίνεται μια αναστροφή της δέσμευσης νουκλεοτιδίων από τις Rag και τότε οι RagA/B δεσμεύουν GTP και οι RagC/D δεσμεύουν GDP. Αυτή είναι και η ενεργή κατάσταση του Rag ετεροδιμερούς.



Εικόνα 32. Το ετεροδιμερές των Rag στην ανενεργή (αριστερά) και στην ενεργή (δεξιά) διαμόρφωσή του. Πηγή: (29)

Στην ενεργή διαμόρφωσή του, η οποία υφίσταται παρουσία αμινοξέων, το Rag ετεροδιμερές αλληλεπιδρά με το Raptor μέσω του οποίου συνδέεται με το mTORC1. Το mTORC1 όταν συνδεθεί με το Rag ετεροδιμερές μετατοπίζεται από το κυτοσόλιο σε μια θέση στην οποία εντοπίζεται ο ενεργοποιητής του, δηλαδή η Rheb. Το αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση του mTORC1 και η αύξηση της δραστηριότητάς του που οδηγεί στην αναστολή της αυτοφαγίας (23,24,28,29,31,40).



Εικόνα 33. Η ενεργοποίηση του mTORC1 από τα αμινοξέα μέσω των Rag. Πηγή: (40)

Παρουσία αμινοξέων λοιπόν το ετεροδιμερές των Rag αποκτά την ενεργοποιημένη μορφή του στην οποία μπορεί και συνδέεται στο mTORC1. Το σύμπλοκο των Rag οδηγεί το mTORC1 σε μια θέση στην οποία βρίσκεται ο ενεργοποιητής του, δηλαδή η Rheb, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του mTORC1 και την αναστολή της αυτοφαγίας.

Έχει προταθεί ότι η θέση στην οποία μεταφέρεται το mTORC1 μέσω των Rag για την ενεργοποίησή του είναι η λυσοσωμική μεμβράνη. Στη μεμβράνη του λυσοσώματος υπάρχει ένα σύμπλοκο που ονομάζεται Ragulator (αποτελείται από MP1, p14, p18) και λειτουργεί ως θέση ελλιμενισμού για το ετεροδιμερές των Rag. Με την πρόσδεση του Rag ετεροδιμερούς στο Ragulator το mTORC1 αποκτά πρόσβαση σε μια λυσοσωμική δεξαμενή Rheb με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή του (28,29,40).

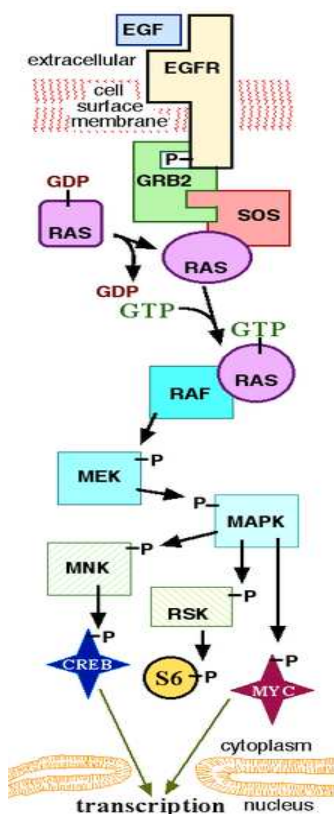
Ο μηχανισμός ενεργοποίησης του mTORC1 μέσω των Rag δίνει και μια πιθανή ερμηνεία στο γεγονός ότι απουσία αμινοξέων οι υπόλοιποι ενεργοποιητές της Rheb, όπως οι αυξητικοί παράγοντες, αποτυγχάνουν να ενεργοποιήσουν το mTORC1: απουσία αμινοξέων οι Rag είναι ανενεργές και δεν μπορούν να μεσολαβήσουν τη μεταφορά του mTORC1 στη θέση στην οποία βρίσκεται η Rheb (24,28). Έτσι για παράδειγμα απουσία της λευκίνης ενεργοποιείται η αυτοφαγία ακόμα και αν υφίσταται το ερέθισμα των αυξητικών παραγόντων. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή η αυτοφαγία προάγεται γιατί το mTORC1 και ο ενεργοποιητής της Rheb βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις μέσα στο κύτταρο.

MAPK

Τα αμινοξέα είναι πιθανό να ρυθμίζουν το mTORC1 και την αυτοφαγία μέσω της MAP4K3 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3), αν και δεν είναι απόλυτα βεβαιωμένο ότι αυτό γίνεται στα κύτταρα των θηλαστικών (27-29,31). Σε έρευνα στη *Drosophila* βρέθηκε ότι τα αμινοξέα ενεργοποιούν το mTORC1 μέσω της MAP4K3 χωρίς να διευκρινίζεται η πορεία

μεταγωγής μηνύματος στο mTORC1 (42), ενώ σε μεταγενέστερη έρευνα προτείνεται ότι ίσως η MAP4K3 είναι ρυθμιστής των Rag πρωτεϊνών (28).

Οι MAPKs (mitogen-activated protein kinases) είναι πρωτεϊνικές κινάσες οι οποίες συνιστούν μια αλυσίδα πρωτεϊνών στο κύτταρο για τη μεταγωγή μηνυμάτων από την επιφάνεια του κυττάρου προς τον πυρήνα ή προς συστατικά του κυτοσολίου. Αποκρίνονται σε μια ποικιλία ερεθισμάτων, όπως μιτογόνα, κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες, ωσμωτικό στρες, θερμικό σοκ κ.α. για να ρυθμίσουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών του κυττάρου όπως η έκφραση γονιδίων, η μίτωση, η διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός. Η MAPK/ERK πορεία είναι μια πορεία διαδοχικών φωσφορυλιώσεων και ενεργοποιήσεων πρωτεϊνικών κινάσων που ξεκινά με τη δέσμευση ενός μηνυματοφόρου μορίου (πχ ενός αυξητικού παράγοντα) στον μεμβρανικό υποδοχέα του που προκαλεί την ενεργοποίηση μιας GTPάσης, της Ras με τη δέσμευση GTP. Η Ras ακολούθως ενεργοποιεί μια MAP3K (πχ μια Raf) η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί μια MAP2K που με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί μια MAPK η οποία ενεργοποιεί ένα συστατικό του κυττάρου που θα επάγει την απόκριση του κυττάρου, πχ έναν μεταγραφικό παράγοντα. Τα συστατικά του καταρράκτη μεταγωγής σήματος των MAPK ανακαλύφθηκαν αρχικά σε καρκινικά κύτταρα, ενώ η αρχική ονομασία της MAPK ήταν ERK(extracellular signal-regulated kinases). Μία MAPK/ERK πορεία που ενεργοποιείται από τους αυξητικούς παράγοντες είναι: Ras-Raf-MEK1/2-MAPK.



Εικόνα 34. Ένα παράδειγμα MAPK/ERK πορείας. Πηγή: Wikipedia

Όσο αφορά την αυτοφαγία η MAPK πορεία έχει προταθεί ότι διαμεσολαβεί στην ενεργοποίηση του mTORC1 και την αναστολή της αυτοφαγίας από τους αυξητικούς παράγοντες καθώς και την επαγωγή της αυτοφαγίας κατά την έλλειψη αμινοξέων.

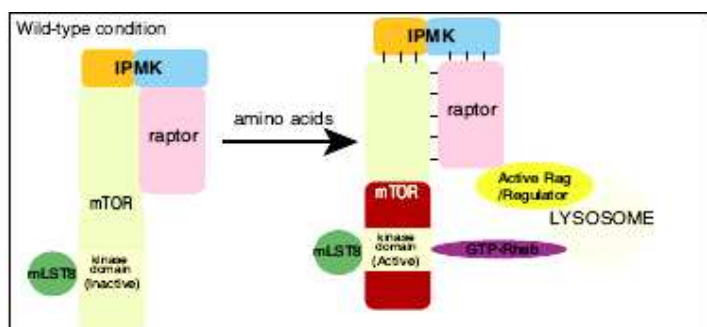
Vps34

Τα αμινοξέα έχει επίσης προταθεί ότι ρυθμίζουν το mTORC1 και την αυτοφαγία μέσω της Vps34. Η Vps34 υπενθυμίζεται ότι είναι συστατικό του συμπλόκου της class III PI3K που έχει απαραίτητο ρόλο στο σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων. Προτείνεται όμως ότι έχει και ρυθμιστικό ρόλο: τα αμινοξέα ενεργοποιούν την Vps34 και αυτή με τη σειρά της ενεργοποιεί το mTORC1 με αποτέλεσμα την αναστολή της αυτοφαγίας (8,43). Τα αμινοξέα στην περίπτωση αυτή είναι πιθανό να ρυθμίζουν τη Vps34 μέσω της JKN η οποία επιδρά στη σύνδεση της Beclin1 με τις Bcl-2/Bcl-XL (51).

Σε αυτόν το μηχανισμό δηλαδή η Vps34 ρυθμίζει αρνητικά την αυτοφαγία, κάτι που έρχεται σε αντίθεση με το ρόλο της στο σύμπλοκο της class III PI3K. Μια πιθανή εξήγηση για τους αντιφατικούς ρόλους της Vps34 είναι ότι η πρωτεΐνη υπάρχει σε διαφορετικούς πληθυσμούς μέσα στο κύτταρο οι οποίοι ενδεχομένως επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες ή δρουν σε διαφορετικές χρονικές περιόδους (8,43,117).

IPMK

Άλλος ένας πιθανός μηχανισμός για τη ρύθμιση του mTORC1 και της αυτοφαγίας από τα αμινοξέα είναι μέσω της IPMK (inositol polyphosphate multikinase). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό παρουσία αμινοξέων η IPMK δεσμεύεται στο mTORC1 και το σταθεροποιεί με αποτέλεσμα την αναστολή της αυτοφαγίας (111).

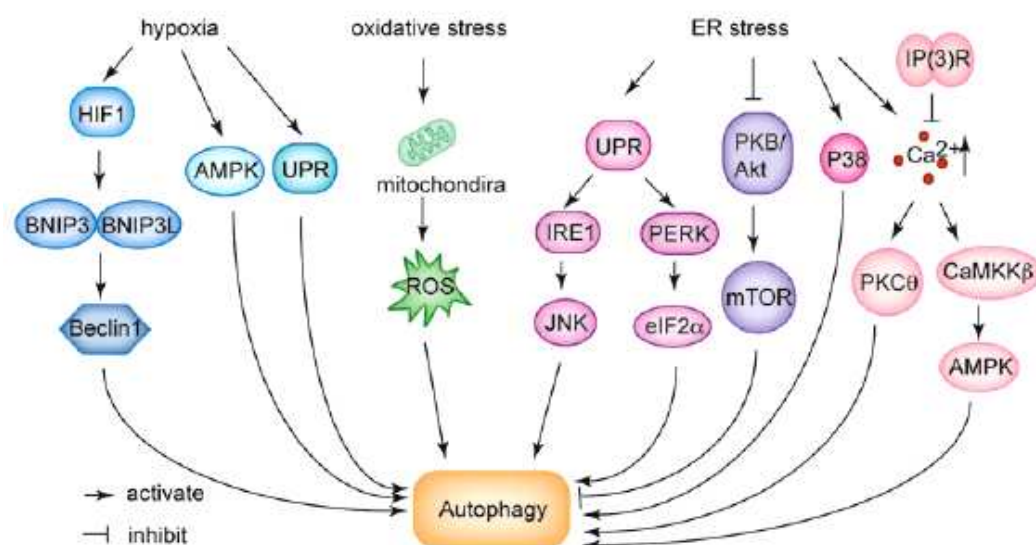


Εικόνα 35: Η ρύθμιση του mTORC1 από την IPMK. Πηγή: (111)

Όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα, απουσία αμινοξέων η IPMK έχει υψηλή συνάφεια για το mTORC1 και το N-τελικό άκρο της IPMK δεσμεύεται στο mTOR, ενώ το C-τελικό της άκρο δεσμεύεται στο Raptor. Παρουσία αμινοξέων η IPMK έχει μικρή συνάφεια για το mTORC1 και το σύμπλοκο μετατοπίζεται προς την επιφάνεια του λυσοσώματος όπου ενεργοποιείται από την Rheb (111).

Οι πρωτεΐνες είναι το κλασικό υπόστρωμα της αυτοφαγίας και μάλιστα ο ρυθμός της αποδόμησης των πρωτεϊνών στο λυσόσωμα έχει χρησιμοποιηθεί και ως δείκτης της αυτοφαγίας. Με τη διάσπαση των πρωτεϊνών στο λυσόσωμα παράγονται αμινοξέα που επιστρέφουν στο κυτοσόλιο μέσω των περμεασών. Έτσι το κυτοσόλιο εμπλουτίζεται με αμινοξέα τα οποία αναστέλλουν την αυτοφαγική πορεία. Έτσι τα αμινοξέα δημιουργούν ένα μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης στην πορεία της αυτοφαγίας (36,40,51). Με τον καταβολισμό των αμινοξέων παράγεται αμμωνία η οποία επίσης ρυθμίζει αρνητικά την αυτοφαγία. Η αμμωνία μεταβάλλει το pH στο λυσόσωμα με αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηριότητας των όξινων υδρολασών του λυσοσώματος και την κλιμάκωση της αυτοφαγίας (51).

Τα αμινοξέα λοιπόν είναι ισχυροί αναστολείς της αυτοφαγίας. Η απουσία αμινοξέων είναι ικανό ερέθισμα να διεγείρει την αυτοφαγική πορεία, ενώ αντίστροφα σε ηπατοκύτταρα το ερέθισμα της ινσουλίνης δεν είναι ικανό να πυροδοτήσει την αυτοφαγία σε υψηλές συγκεντρώσεις αμινοξέων (51). Ο πιο πιθανός μηχανισμός με τον οποίο τα αμινοξέα ρυθμίζουν το mTORC1 και την αυτοφαγία φαίνεται να είναι μέσω των Rag GTPασών, ενώ έχουν προταθεί και άλλοι μηχανισμοί, όπως μέσω των MAPK, της Vps34 και της IPMK.



Εικόνα 36. Η ρύθμιση της αυτοφαγίας από την υποξία, το οξειδωτικό στρες και το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου. Πηγή: (45)

3.4 Υποξία

Τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου αναστέλλουν τη δράση του mTORC1 και προάγουν την αυτοφαγία μέσω ποικίλων μηχανισμών. Υποξία (επίπεδα οξυγόνου στο κύτταρο <1%) παρατηρείται στο φυσιολογικά αναπτυσσόμενο έμβρυο, αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως σε συμπαγείς όγκους, καρδιαγγειακή ισχαιμία και τραυματισμούς του εγκεφάλου. Η αυτοφαγία που εκκινείται από την υποξία είναι γενικά μια προσαρμοστική απόκριση του κυττάρου στα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου. Για παράδειγμα η εκλεκτική αυτοφαγία μιτοχονδρίων που επάγεται κατά την υποξία αποσκοπεί στη μείωση των επιπέδων ROS και την προστασία της ακεραιότητας του κυττάρου. Επίσης η αυτοφαγία μπορεί να επιφέρει τον κυτταρικό θάνατο σε παρατεταμένη υποξία σε καρκινικά κύτταρα (8). Τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου είναι πολύ ισχυρός παράγοντας για την πυροδότηση της αυτοφαγίας, ισχυρότερος μάλιστα και από τα θρεπτικά συστατικά και τους αυξητικούς παράγοντες (44). Για την επαγωγή της αυτοφαγίας από την υποξία έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί που περιλαμβάνουν την REDD1, την BNIP3 και την πορεία της AMPK.

REDD1

Ένας μηχανισμός που μεσολαβεί την έναρξη της αυτοφαγίας σε συνθήκες υποξίας μεσολαβείται από την πρωτεΐνη REDD1. Η REDD1 είναι κυτοσολική πρωτεΐνη που αποτελείται από 232 αμινοξέα και κωδικοποιείται από το γονίδιο Redd1/RTP801. Η REDD1 εκκινεί την αυτοφαγία μέσω της αναστολής του mTORC1, αλλά ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει διευκρινιστεί (44). Πιθανόν η αναστολή του mTORC1 να γίνεται μέσω της αλληλεπίδρασης της REDD1 με το TSC2 (28). Η REDD1 εκτός από την υποξία διεγείρεται και από άλλους στρεσογόνους παράγοντες, όπως η καταστροφή του DNA, το θερμικό σοκ, τον p53, οξειδωτικούς παράγοντες, γλυκοκορτικοειδή καθώς και από το κάπνισμα (28,44). Η κινητοποίηση της αυτοφαγίας από τη REDD1 σε συνθήκες υποξίας εξελίσσεται ανεξάρτητα από τον Hif-1 (44).

Hif-1

Ο Hif-1 (hypoxia-inducible factor) είναι ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιείται σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου και οδηγεί στη μεταγραφή εκατοντάδων γονιδίων για την προαγωγή της ερυθροποίησης και αγγειογένεσης και τη μείωση της αναπνοής και βιογένεσης των μιτοχονδρίων ώστε να περιοριστούν οι επιβλαβείς επιδράσεις των χαμηλών επιπέδων οξυγόνου (44). Μια προσαρμοστική απόκριση του κυττάρου στα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου είναι η εκλεκτική αυτοφαγία των μιτοχονδρίων. Στην ενεργοποίηση της πορείας αυτής συμμετέχει ο Hif-1. Ο Hif-1, όπως φαίνεται στην εικόνα 36, επιδρά στις πρωτεΐνες BNIP3 και

BNIP3L(BNIP3-like) οι οποίες είναι μέλη της οικογένειας των προαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2. Η BNIP3 ανταγωνίζεται την beclin1 για τη δέσμευση στην Bcl-2 με αποτέλεσμα την αποδέσμευση της Beclin1 από την Bcl-2 και την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας (8,45). Τέλος έχει βρεθεί ότι και ο Hif-1 ρυθμίζεται από το mTORC1, καθώς η αύξηση της δραστηριότητας του mTORC1 προκαλεί αύξηση των επιπέδων του Hif-1(51).

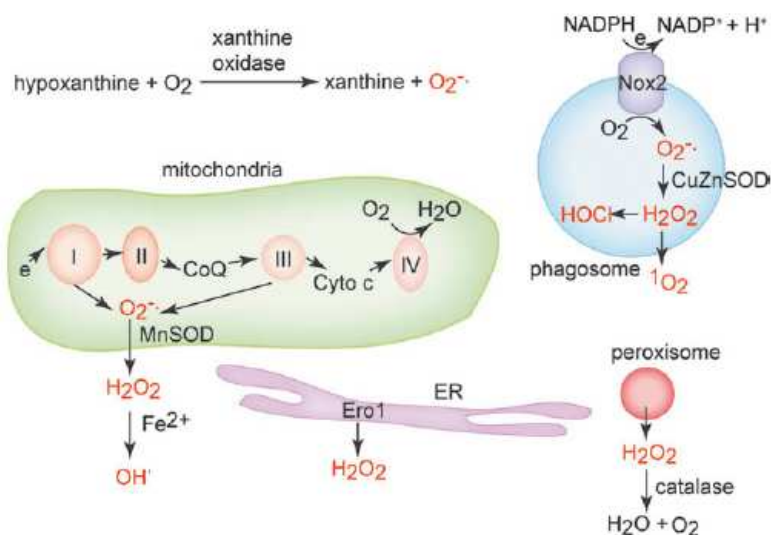
AMPK

Ένας εναλλακτικός μηχανισμός επαγωγής της αυτοφαγίας σε συνθήκες υποξίας περιλαμβάνει την AMPK. Όταν τα επίπεδα οξυγόνου στο κύτταρο είναι χαμηλά, τα επίπεδα ATP μειώνονται επειδή αναστέλλονται μεταβολικές διαδικασίες όπως η οξειδωτική φωσφορυλίωση με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η οδός της AMPK. Η AMPK όπως περιγράφεται πιο πάνω προάγει την αυτοφαγία αναστέλλοντας το mTORC1 μέσω της επίδρασής του είτε στο TSC1-TSC2 είτε στο Raptor (8,28,29).

3.5 Οξειδωτικό στρες

Τα ROS αποτελούν έναν ενδοκυτταρικό στρεσογόνο παράγοντα και η παραγωγή τους με μεγαλύτερο ρυθμό από το ρυθμό εξάλειψής τους προκαλεί το οξειδωτικό στρες που οδηγεί στην αυτοφαγία. Η κύρια θέση παραγωγής των ROS είναι τα μιτοχόνδρια των οποίων η λειτουργία αναστέλλεται και τελικά καταστρέφονται από τα ROS. Σημαντικές ποσότητες υπεροξειδίου του υδρογόνου παράγονται επίσης κατά την οξείδωση λιπαρών οξέων στα υπεροξεισώματα.

Στα βιολογικά συστήματα τα πιο συνηθισμένα ROS είναι το ανιόν υπεροξειδίου (O_2^-), οι ρίζες υδροξυλίου (OH^-) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) που σχηματίζονται κυρίως από τη δράση των NADPH οξειδασών (NOXs), της οξειδάσης ξανθίνης που συμμετέχει στον καταβολισμό των πουρινών(XO) και την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) στα μιτοχόνδρια (45).

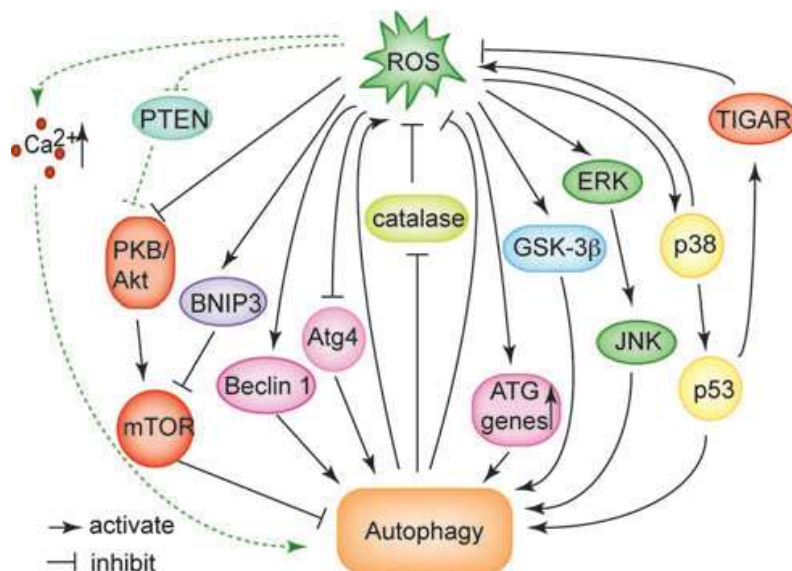


Εικόνα 37. Η παραγωγή ROS στο κύτταρο γίνεται κυρίως με τη δράση της XO, NADPH οξειδάσης, στην αναπνευστική αλυσίδα στα μιτοχόνδρια, στα υπεροξεισώματα και στο ενδοπλασματικό δίκτυο σε συνθήκες στρες. Πηγή: (45)

Η εγγύτητα του mTORC1 με τα μιτοχόνδρια και το γεγονός ότι η δράση του αναστέλλεται σε δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και οξειδωτικό στρες υποδεικνύει ότι ίσως υπάρχει μια οδός μεταγωγής μηνύματος μέσω του οποίου τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια επάγουν την αυτοφαγία (27). Η επαγωγή της αυτοφαγίας από τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια ίσως γίνεται μέσω της Atg4 η οποία συμμετέχει στην απομάκρυνση της LC3-II από την εξωτερική μεμβράνη των αυτοφαγοσωμάτων λίγο πριν ή αμέσως μετά τη σύντηξή τους με το λυσόσωμα (8,46).

Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός επαγωγής της αυτοφαγίας σε οξειδωτικό στρες είναι η διέγερση της LKB1-AMPK πορείας από την PARP-1 [poly(ADP-ribose) polymerase-1] η οποία ενεργοποιείται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η αυτοφαγία που επάγεται από την καταστροφή του DNA λόγω οξειδωτικού στρες ίσως μεσολαβείται από την PARP-1 (8).

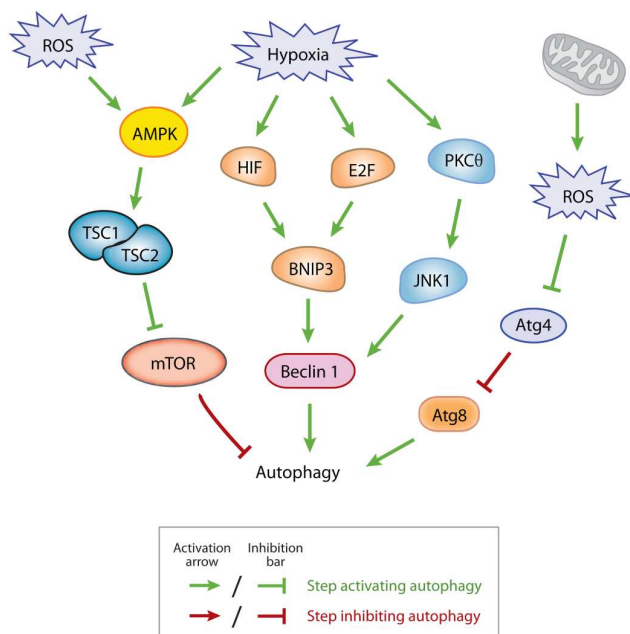
Ωστόσο η στρατηγική που εφαρμόζει το κύτταρο κατά κύριο λόγο για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες από την αύξηση των ROS είναι η ελάττωση της παραγωγής τους με την εξάλειψη των μιτοχονδρίων μέσω της εκλεκτικής αυτοφαγίας (8,27). Παρομοίως μπορούν να αποδομηθούν τμήματα του ενδοπλασματικού δικτύου για τον περιορισμό της παραγωγής ROS που αυξάνεται σε ER-stress (45).



Εικόνα 38. Οι μηχανισμοί ρύθμισης της αυτοφαγίας από τα ROS. Πηγή: (45)

Τα υγιή κύτταρα πάντως φαίνεται να αξιοποιούν πρωτίστως άλλους μηχανισμούς για τη διατήρηση των ROS σε ανεκτά επίπεδα, όπως η δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD), η καταλάση, η γλουταθειόνη και η θειορεδοξίνη, η γλουταθειονική υπεροξειδάση και διάφορα αντιοξειδωτικά όπως οι βιταμίνες C και E , παρά την αυτοφαγία. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι διάφοροι παράγοντες που προκαλούν τη δημιουργία ROS προάγουν την αυτοφαγία σε καρκινικά κύτταρα, αλλά δεν έχουν την ίδια επίδραση σε υγιή κύτταρα (8,45).

Η αυτοφαγία προάγεται από τα ROS ως μια κυτταροπροστατευτική διαδικασία για την αντιμετώπιση των συνθηκών που προκαλούν την αύξηση της παραγωγής τους και τον περιορισμό των τοξικών τους επιδράσεων. Για παράδειγμα σε συνθήκες νηστείας ή οξειδωτικού στρες τα ROS οξειδώνουν πρωτεΐνες που μπορεί να σχηματίσουν συσσωματώματα με τοξική δράση για το κύτταρο. Αυτά τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα μπορούν να εξαλειφθούν μέσω της αυτοφαγίας. Σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αποδείχθηκε ανακύκλωση της οξειδωμένης LDL μέσω της αυτοφαγίας, γεγονός που συμβάλλει στην προστασία των αγγείων από το σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας, ενώ άλλες έρευνες αναδεικνύουν το ρόλο της αυτοφαγίας στο ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού (45).



Εικόνα 39. Η ρύθμιση της αυτοφαγίας από την υποξία και το οξειδωτικό στρες. Πηγή: (8)

3.6 ER stress

Το στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο προκαλείται από τη συσσώρευση λάθος αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο εσωτερικό του και έχει αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου. Ως απόκριση στο ER stress εκκινείται η UPR (unfolded protein response) αλλά και η αυτοφαγία (23,45).

Η UPR είναι μια πορεία μεταγωγής μηνύματος που ενεργοποιεί πολλούς προστατευτικούς μηχανισμούς του κυττάρου που συμβάλλουν στην αποδόμηση των λάθος αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και στη διατήρηση της ομοιόστασης του ενδοπλασματικού δικτύου. Στη UPR πορεία συμμετέχουν οι πρωτεΐνες Ire1 (inositol-requiring kinase1), η PERK (protein kinase-like ER kinase) και ο ATF6 (activating transcription factor6) που προάγουν τη μεταγραφή πλήθους γονιδίων μεταξύ των οποίων και τα γονίδια της αυτοφαγίας (45). Η πορεία της Ire1 μεσολαβείται από την JNK-1 η οποία φωσφορυλιώνει την Beclin1 με αποτέλεσμα την αποδέσμευσή της από το Bcl-2 (13).

Όπως και στην περίπτωση των ROS που προκαλούν την εκλεκτική αυτοφαγία μιτοχονδρίων, έτσι και στην περίπτωση του ER stress παρατηρείται αποδόμηση μέρους του ER μέσω της αυτοφαγίας.

Το ER stress εκκινεί την αυτοφαγία μέσω διάφορων μηχανισμών, όπως η αναστολή της Akt πορείας ή μέσω της πορείας της AMPK που ενεργοποιείται από το ασβέστιο που απελευθερώνει

το ER σε συνθήκες στρες στο κυτοσόλιο μέσω της CaMKKβ (45). Τα αυξημένα επίπεδα κυτοσολικού ασβεστίου προκαλούν επίσης τη φωσφορυλίωση της πρωτεϊνικής κινάσης Cθ η οποία προάγει την αυτοφαγία μέσω της επίδρασής της στην LC3. Οι μηχανισμοί που συνδέουν το ER stress με την αυτοφαγία ποικίλουν ανάλογα και με την αιτία που προκαλεί το στρες (8). ER stress μπορεί να προκαλέσουν η συσσώρευση συσσωματωμένων πρωτεϊνών, η εξάντληση γλυκόζης λόγω γλυκοζυλίωσης και μη επάρκειας της ενέργειας για τη δράση των συνοδών πρωτεϊνών, η υποξία και το οξειδωτικό στρες λόγω αδυναμίας σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών και η εκροή ασβεστίου από το ER (8).

Η αυτοφαγία που πυροδοτείται από το ER stress μέσω της ενεργοποίησης της DAPK (death-associated protein kinase) μπορεί επίσης να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο είτε μέσω της ίδιας της αυτοφαγίας είτε μέσω της απόπτωσης. Έτσι το τελικό αποτέλεσμα που έχει η αυτοφαγία που προκαλείται από το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (αλλά και από άλλες αιτίες) στο κύτταρο εξαρτάται από το αρχικό ερέθισμα, αλλά και το είδος του κυττάρου (8).

Ενδιαφέρον είναι ότι το πλεόνασμα θρεπτικών συστατικών έχει βρεθεί ότι προκαλεί στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο και ενεργοποιεί την UPR (23). Δεδομένου ότι η UPR προάγει την αυτοφαγία, το πλεόνασμα θρεπτικών συστατικών λόγω του ER stress ίσως αποτελεί ένα ερέθισμα για την αυτοφαγία στα κύτταρα.

3.7 Γενοτοξικό στρες – p53

Ο p53 είναι ογκοκαταστολέας και ο κεντρικός ρυθμιστής των αποκρίσεων που εκκινούνται από την καταστροφή του DNA. Μπορεί να ρυθμίζει την αυτοφαγία και θετικά και αρνητικά(20,28).

Σε γενοτοξικό στρες ο p53 ενεργοποιείται για να πυροδοτήσει την αυτοφαγία μέσω διάφορων μηχανισμών, όπως η αναστολή του mTORC1 μέσω της AMPK, της PTEN και της Redd1 (20,21,28). Η προαγωγή της αυτοφαγίας μπορεί επίσης να γίνει μέσω της αύξησης της δραστηριότητας του DRAM (damage-regulated modulator of autophagy) (20).

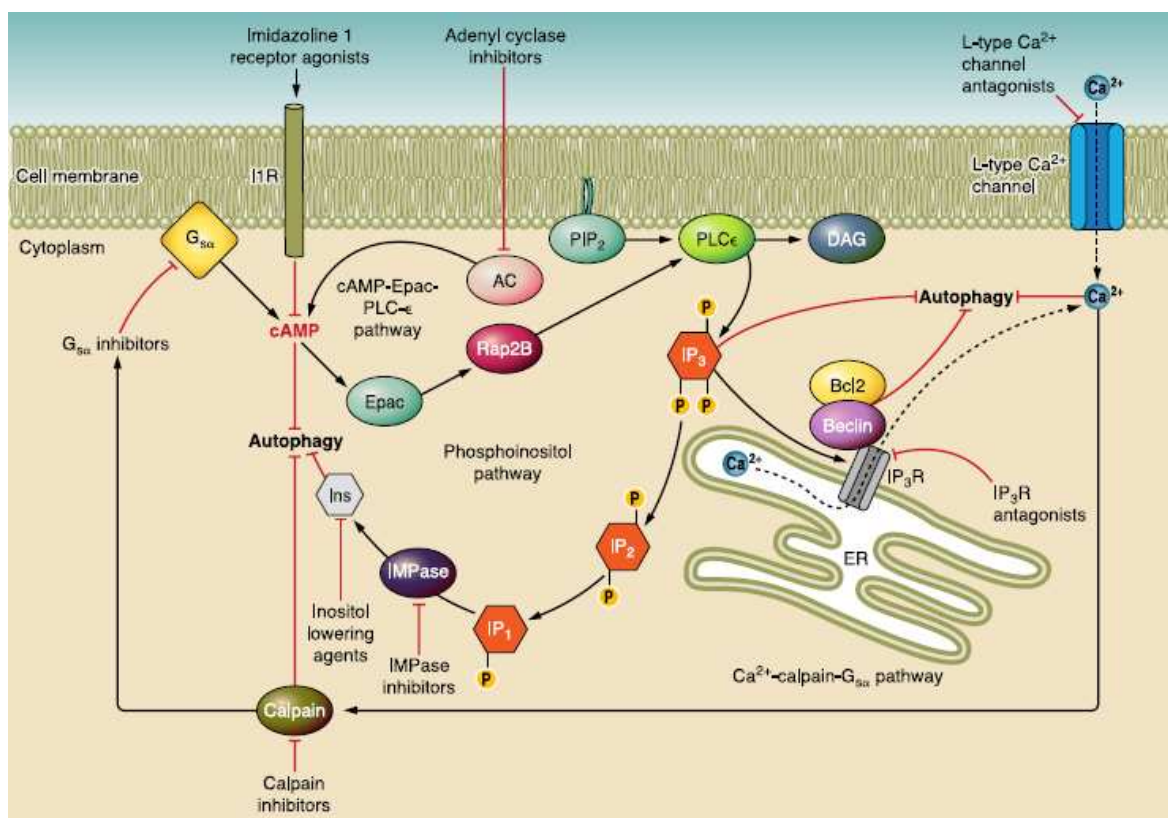
Η αρνητική ρύθμιση της αυτοφαγίας έγκειται στο γεγονός ότι κάποια ερεθίσματα για την αυτοφαγία προκαλούν την αποδόμηση του p53 στο πρωτεόσωμα (20).

3.8 Vps34

Η Vps34 αποτελεί συστατικό του συμπλόκου της class III PI3K που είναι απαραίτητο για το σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων στο στάδιο της έναρξης της αυτοφαγίας. Επιπλέον φαίνεται ότι είναι απαραίτητη και στο στάδιο της σύντηξης του αυτοφαγοσώματος με το λυσόσωμα. Πιο

πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η Vps34 έχει και ρυθμιστικό ρόλο στην αυτοφαγία. Συγκεκριμένα έχει προταθεί ότι η hVps34 προάγει τη δράση του mTORC1 ως απόκριση στα επίπεδα αμινοξέων και ασβεστίου με αποτέλεσμα την αναστολή της αυτοφαγίας. Ο αντιφατικός αυτός ρόλος της Vps34 αποδίδεται στην ύπαρξη διαφορετικών δεξαμενών Vps34 στο κύτταρο που ρυθμίζονται με διαφορετικό τρόπο από τα θρεπτικά συστατικά (47).

3.9 Ρύθμιση της αυτοφαγίας με πορείες ανεξάρτητες από το mTORC1



Εικόνα 40. Πορείες ρύθμισης της αυτοφαγίας ανεξάρτητες από την mTOR. Πηγή: (13)

Η πορεία της φωσφοϊνοσιτόλης

Η αυτοφαγία ρυθμίζεται αρνητικά από την ενδοκυτταρική ινοσιτόλη και την 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3) με μηχανισμό που δεν περιλαμβάνει το mTORC1 (13,48). Η επίδραση της ινοσιτόλης και της IP3 στην αυτοφαγία ανακαλύφθηκε από την έρευνα των Sarkar et al (2005) στην οποία βρέθηκε ότι το λίθιο προάγει την αυτοφαγία. Το λίθιο αναστέλλει τη μονοφωσφατάση της ινοσιτόλης (IMPase) με αποτέλεσμα την ελάττωση των επιπέδων της ελεύθερης ινοσιτόλης (48).

Η πορεία της φωσφοϊνοσιτόλης ξεκινά με την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC) από υποδοχέα που είναι συνδεδεμένος με πρωτεΐνη G. Η PLC υδρολύει την 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP2) σε 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3) και διακυλογλυκερόλη

(DAG). Η PI3 μετατρέπεται σε PI2 και ακολούθως σε IP1. Η IP1 υδρολύεται από την IMPase προς ελεύθερη ινοσιτόλη η οποία αναστέλλει την πορεία της αυτοφαγίας (13,48,51). Η πορεία της φωσφοϊνοσιτόλης είναι ανεξάρτητη από την πορεία του mTORC1 και μάλιστα οι δύο πορείες έχουν αθροιστική επίδραση στην αυτοφαγία (48).

Η πορεία της φωσφοϊνοσιτόλης ανακαλύφθηκε σε έρευνες σχετικά με την επίδραση του λιθίου στην αυτοφαγία. Το λίθιο χρησιμοποιείται για ως mood-stabilizing φάρμακο την αγωγή της διπολικής διαταραχής. Έτσι προκύπτει το ενδεχόμενο της προαγωγής της αυτοφαγίας ως μια στρατηγική για την αντιμετώπιση της διπολικής διαταραχής, αλλά και νευροεκφυλιστικών ασθενειών καθώς διάφορα φάρμακα που χρησιμοποιούνται επιδεικνύουν παρόμοιες δράσεις (48).

Η IP3 εξάλλου δεσμεύεται στους υποδοχείς της στο ER (IP3R) οι οποίοι είναι ρυθμιστές της Beclin1. Οι IP3R δεσμεύουν την Beclin1 και την Bcl-2 με αποτέλεσμα την αναστολή της αυτοφαγίας. Η αναστολή των IP3R πυροδοτεί την αυτοφαγία (13,118). Η IP3 εκτός από την παραγωγή ινοσιτόλης αναστέλλει την αυτοφαγία και μέσω της δράσης της ως δεύτερο μήνυμα. Η δέσμευση της IP3 στον υποδοχέα της στο ενδοπλασματικό δίκτυο προκαλεί την απελευθέρωση ασβεστίου από το ER και την αύξησή του στο κυτοσόλιο που επίσης αναστέλλει την αυτοφαγία (13,118).

cAMP-Erac-PLCε-IP3 πορεία

Η cAMP-Erac-PLCε-IP3 είναι μια πορεία που ρυθμίζει αρνητικά την αυτοφαγία μέσω της επίδρασής της στα επίπεδα IP3. Η αύξηση των επιπέδων cAMP στο κύτταρο μειώνει την αυτοφαγία, ενώ η ελάττωση του cAMP με χημικούς παράγοντες πυροδοτεί την αυτοφαγία. Το cAMP ενεργοποιεί τον Erac που είναι ένας παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEF). Ο Erac ακολούθως ενεργοποιεί τη μικρή G πρωτεΐνη Rap2B που με τη σειρά της ενεργοποιεί την PLCε η οποία όπως αναφέρεται πιο πάνω αυξάνει τα επίπεδα IP3 με την υδρόλυση της PIP2. Έτσι η αύξηση των επιπέδων cAMP αναστέλλει την αυτοφαγία με μια πορεία μεταγωγής μηνύματος που προάγει την αύξηση της IP3 (13).

Ca²⁺-καλπαΐνη-Gsa πορεία

Τα αυξημένα επίπεδα ασβεστίου στο κύτταρο μπορεί να αναστέλλουν την αυτοφαγία. Έχει βρεθεί ότι χημικοί παράγοντες που αυξάνουν το κυτοσολικό Ca έχουν αποτέλεσμα την αναστολή της αυτοφαγίας. Επίσης οι ανταγωνιστές των διαύλων Ca τύπου L που ελαττώνουν τα

επίπεδα Ca στο κυτοσόλιο προάγουν την αυτοφαγία, ενώ οι αγωνιστές διαύλων Ca τύπου L που αυξάνουν το ενδοκυτταρικό Ca αναστέλλουν την αυτοφαγία (13).

Το κυτοσολικό Ca ενεργοποιεί τις καλπαίνες που είναι Ca-εξαρτώμενες κυστεϊνικές πρωτεάσες. Η ενεργοποίηση των καλπαϊνών αναστέλλει την αυτοφαγία, ενώ η αναστολή τους με χημικά μέσα ή γενετικό knockdown πυροδοτεί την αυτοφαγία. Η αναστολή της αυτοφαγίας από την ενεργοποίηση των καλπαϊνών μεσολαβείται από το cAMP. Η καλπαΐνη ενεργοποιεί την ετεροτριμερή Gsa πρωτεΐνη με την αποδέσμευση της α υπομονάδας της. Η Gsa ακολούθως προκαλεί την αύξηση του cAMP μέσω της ενεργοποίησης της αδενυλικής κυκλάσης. Το cAMP μέσω της πορείας cAMP-Erac-PLCε-IP3 αναστέλλει την αυτοφαγία. Οι επιδράσεις της Gsa στην αυτοφαγία διατηρούνται και με την ενεργοποίηση ή την αναστολή της και από άλλους παράγοντες (13,118).

Με το συνδυασμό των παραπάνω πορειών προκύπτει μια κυκλική πορεία που ρυθμίζει αρνητικά την αυτοφαγία κατά την οποία το κυτοσολικό Ca ενεργοποιεί τις καλπαΐνες οι οποίες μέσω της Gsa αυξάνουν το cAMP το οποίο με την cAMP-Erac-PLCε-IP3 πορεία αυξάνει την IP3 η οποία με τη δέσμευσή της στον IP3R του ER αυξάνει το κυτοσολικό ασβέστιο (13).

Πέρα από το γεγονός ότι οι παραπάνω πορείες ρύθμισης της αυτοφαγίας είναι ανεξάρτητες από το mTORC1 ενδιαφέρον είναι ότι τα επιμέρους συστατικά τους υπόκεινται σε ρύθμιση τόσο από τους φυσικούς ενεργοποιητές και αναστολείς τους όσο και από χημικούς και φαρμακευτικούς παράγοντες. Αυτό μας δίνει τη δυνατότητα για το χειρισμό της αυτοφαγίας προς την κατεύθυνση που επιλέγουμε, δηλαδή είτε προς την ενίσχυση είτε προς την αναστολή της αυτοφαγίας, αλλά και την εφαρμογή της κατευθυνόμενης αυτοφαγίας για πειραματικούς ή θεραπευτικούς σκοπούς. Οι πορείες αυτές εξάλλου δίνουν τη δυνατότητα σχεδιασμού πειραμάτων προαγωγής της αυτοφαγίας σε πειραματόζωα χωρίς την αναστολή ή Knockdown της mTOR που προκαλεί το θάνατο των πειραματόζωων σε λίγα 24ωρα.

3.10 Κυτοσολικό Ca

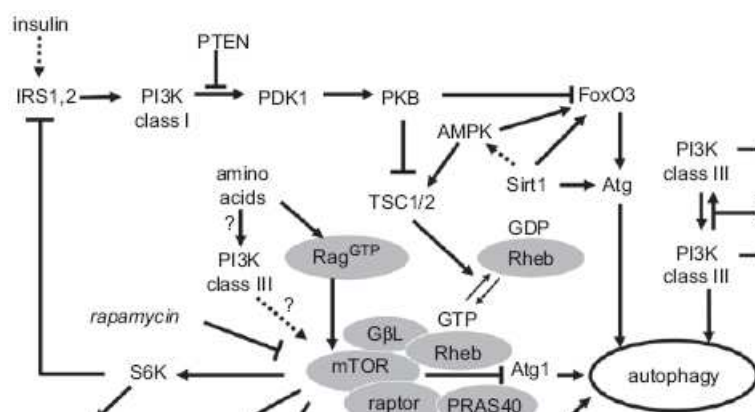
Η αύξηση του ελεύθερου κυτοσολικού ασβεστίου πυροδοτεί ποικίλες κυτταρικές αποκρίσεις, όπως η μυϊκή συστολή, την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, αλλαγές στο μεταβολισμό και τον πολλαπλασιασμό, ακόμα και κυτταρικό θάνατο (38). Όσο αφορά την αυτοφαγία παρουσιάζεται να έχει αντιφατικούς ρόλους αφού αφενός μπορεί να πυροδοτήσει την αυτοφαγία πχ ενεργοποιώντας την AMPK, αφετέρου μπορεί να την αναστείλει μέσω των πορειών μεταγωγής μηνύματος που είναι ανεξάρτητες από το mTORC1. Οι διαφορετικές επιδράσεις του

κυτοσολικού Ca^{2+} στην αυτοφαγία επισημαίνονται και από τους ερευνητές που πρότειναν τη ρύθμιση της αυτοφαγίας μέσω των mTORC1-ανεξάρτητων πορειών (38,49,50). Έτσι η αύξηση του κυτοσολικού Ca δεν συνεπάγεται και την πυροδότηση της αυτοφαγίας. Οι αποκρίσεις του κυττάρου μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με το είδος του κυττάρου, την προέλευση του Ca (εξωκυτταρικό ή από το ER) και την αιτία που προκαλεί την αύξηση του κυτοσολικού Ca. Για να προβλέψουμε την κατεύθυνση της αυτοφαγίας με την αύξηση του κυτοσολικού Ca θα πρέπει μάλλον να λαμβάνουμε υπόψη και άλλους παράγοντες, όπως αν το Ca έχει μεγαλύτερη συνάφεια για την CaMKKβ παρά για τις καλπαΐνες, ή αν το Ca που εισέρχεται στο κύτταρο μέσω των μεμβρανικών διαύλων ασβεστίου έχει πιο άμεση πρόσβαση στις καλπαΐνες παρά στην CaMKKβ.

3.11 FOXO3

Ο FOXO3 (FoxO, class O of forkhead box transcription factors) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που πρόσφατα βρέθηκε ότι αυξάνει την έκφραση διάφορων αυτοφαγικών γονιδίων στους σκελετικούς μυς (8,51). Στην ενεργοποίηση της αυτοφαγίας από τον FOXO3 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο η Bnip3, μια πρωτεΐνη που ενεργοποιεί την Beclin1 μέσω της άρσης της αναστολής που της ασκεί η Bcl-2 (52). Ο FOXO3 είναι επαρκής παράγοντας για την έναρξη της αυτοφαγίας στους σκελετικούς μυς, όπως βρέθηκε από πείραμα σε ενήλικα ποντίκια (8), ενώ η αναστολή της mTOR δεν προάγει την αυτοφαγία στα κύτταρα αυτά (52). Η δραστηριότητα του FOXO3 αναστέλλεται από την Akt και ενεργοποιείται από την APMK (51,122).

Η ρύθμιση της αυτοφαγίας από τον FOXO3 μπορεί να θεωρηθεί ως ένα τμήμα μιας γενικότερης απόκρισης στη νηστεία κατά την οποία οι FOXO πρωτεΐνες αναστέλλουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, αναστέλλουν την έκφραση γονιδίων της γλυκόλυσης και της λιπογένεσης, ενώ προάγουν την έκφραση γονιδίων της γλυκονεογένεσης και της οξειδωσης λιπαρών οξέων (51).



Εικόνα 41. Πηγή: (51)

3.12 Μηχανισμοί ανατροφοδοτικής ρύθμισης

Η διεξαγωγή της αυτοφαγίας σε επίπεδα υψηλότερα ή και χαμηλότερα από τα κανονικά μπορεί να είναι επιβλαβής για το κύτταρο, αλλά και για ολόκληρο τον οργανισμό. Επιπλέον η αυτοφαγία είναι κατά κύριο λόγο μια προσαρμοστική διαδικασία σε διάφορες συνθήκες που αφορούν το περιβάλλον του κυττάρου και καθώς αυτές μεταβάλλονται, μεταβάλλονται και τα επιθυμητά επίπεδα αυτοφαγίας. Άλλωστε όπως έχει παρατηρηθεί με την απομάκρυνση των θρεπτικών συστατικών αρχικά τα επίπεδα αυτοφαγίας είναι πολύ υψηλά, σε παρατεταμένη νηστεία όμως υπάρχει μια κάμψη και η αυτοφαγία εξελίσσεται σε χαμηλότερα επίπεδα. Η ανάγκη λοιπόν για τη διατήρηση της αυτοφαγίας σε επιθυμητά επίπεδα εξυπηρετείται και από μηχανισμούς ανατροφοδότησης.

Αναστολή τελικών προϊόντων

Όπως πολλές βιοχημικές διαδικασίες η αυτοφαγία υπόκειται στον έλεγχο των τελικών προϊόντων. Ένας ισχυρός παράγοντας ενεργοποίησης της αυτοφαγίας είναι η έλλειψη αμινοξέων. Κατά την αυτοφαγία αποδομούνται στο λυσόσωμα διάφορες πρωτεΐνες και συσσωματώματα πρωτεϊνών καθώς και ολόκληρα οργανίδια, τα προϊόντα των οποίων, δηλαδή τα αμινοξέα, επιστρέφουν στο κυτοσόλιο μέσω των περμεασών. Έτσι με τον εμπλουτισμό του κυτοσολίου με αμινοξέα το αρχικό ερέθισμα για την έναρξη της αυτοφαγίας, δηλαδή η έλλειψη αμινοξέων παύει να υφίσταται με αποτέλεσμα την αναστολή της διαδικασίας (52). Η αύξηση των ελεύθερων αμινοξέων στο κυτοσόλιο με τη δράση της αυτοφαγίας επομένως δρα ως αυτοπεριοριστικός ανατροφοδοτικός μηχανισμός ρύθμισης (53).

Παρομοίως η παραγωγή ενέργειας από τα προϊόντα της αυτοφαγίας αναπληρώνει τα επίπεδα ATP στο κύτταρο με αποτέλεσμα την άρση του ερεθίσματος της έλλειψης ενέργειας και την αναστολή της αυτοφαγίας.

S6K

Ένας σημαντικός μηχανισμός ανατροφοδότησης στην πορεία της αυτοφαγίας είναι η αναστολή της PI3K-Akt πορείας από την S6K. Η S6K (ribosomal protein S6 kinase) είναι στόχος του mTORC1 και προάγει την πρωτεϊνοσύνθεση. Έτσι σε επάρκεια θρεπτικών συστατικών η πρόσδεση της ινσουλίνης στους υποδοχείς της ενεργοποιεί την πορεία της PI3K η οποία ενισχύει τη δραστηριότητα του mTORC1. Το ενεργοποιημένο mTORC1 αυξάνει τα επίπεδα της S6K η οποία προάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών στο κύτταρο (20,28,29). Η S6K όμως έχει και ρυθμιστικό ρόλο στην αυτοφαγική πορεία.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 25 η S6K που ενεργοποιείται από το mTORC1 αναστέλλει τη φωσφορυλίωση του IRS. Με τον τρόπο αυτό υπάρχει μια αρνητική ρύθμιση της PI3K-Akt πορείας που οδηγεί σε ελάττωση της δραστηριότητας του mTORC1 και επομένως σε ενίσχυση της αυτοφαγίας (13,123). Με τη δράση της αυτή η S6K παρέχει ένα μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης στην ενεργοποίηση του mTORC1 από τους αυξητικούς παράγοντες.

Η θετική επίδραση της S6K στην αυτοφαγία μέσω της PI3K-Akt πορείας συμβάλλει στη διατήρηση της αυτοφαγίας σε κάποια βασικά επίπεδα ακόμα και σε συνθήκες επάρκειας θρεπτικών συστατικών ώστε να μπορεί η αυτοφαγία να διεξάγει διεργασίες απαραίτητες για το κύτταρο, όπως η αποδόμηση μη επιθυμητών συστατικών (51).

Η ανατροφοδοτική ρύθμιση του mTORC1 από την S6K μέσω της PI3K-Akt πορείας δημιουργεί στο κύτταρο μια κατάσταση αντίστασης στην ινσουλίνη. Αυτό επιβεβαιώθηκε σε S6K-knockout ποντίκια που εμφάνισαν βελτιωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη. Έτσι προκύπτει και μια σύνδεση με το πλεόνασμα θρεπτικών συστατικών, την παχυσαρκία, την αντίσταση στην ινσουλίνη και τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου II (56).

Έρευνες στη *Drosophila* και σε κύτταρα θηλαστικών έχουν δείξει ότι η S6K είναι απαραίτητη για την αυτοφαγία (123). Το γεγονός ότι η S6K αφενός είναι απαραίτητη για την αυτοφαγία, αφετέρου ελαττώνεται με την αναστολή του mTORC1 (που πυροδοτεί την αυτοφαγία) συμβάλλει στη διατήρηση της αυτοφαγίας σε επίπεδα που δεν είναι επιβλαβή για το κύτταρο (52,123). Αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να γίνει πιο κατανοητή αν δούμε τις εξής σχέσεις:

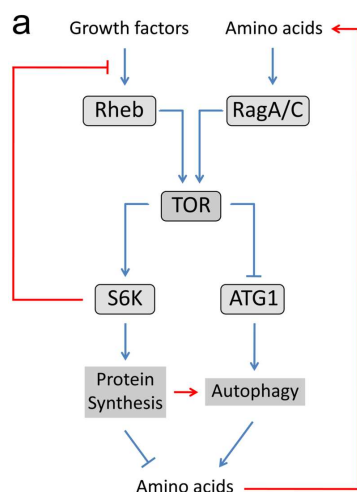
$\downarrow \text{mTORC1} \rightarrow \uparrow \text{αυτοφαγίας}$
 $\downarrow \text{mTORC1} \rightarrow \downarrow \text{S6K} \rightarrow \downarrow \text{αυτοφαγίας}$

Η σχέση αυτή αν λάβουμε υπόψη και την ελάττωση της S6K λόγω αναστολής του mTORC1 ίσως ερμηνεύει και το γεγονός ότι η έλλειψη θρεπτικών συστατικών και αυξητικών παραγόντων πυροδοτεί αρχικά υψηλούς ρυθμούς αυτοφαγίας που στη συνέχεια κλιμακώνονται.

Επιπλέον έχει προταθεί ότι σε μακροχρόνια νηστεία η δράση της S6K ελαττώνεται σε μεγάλο βαθμό και έτσι η πορεία PI3K-Akt επανενεργοποιείται, οπότε η αυτοφαγία αναστέλλεται ώστε να μην καταλήξει σε αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο (51).

Η S6K τέλος συμμετέχει σε ένα μηχανισμό ρύθμισης του mTORC1 μέσω της επίδρασής της στο mTORC2 που περιγράφεται πιο κάτω.

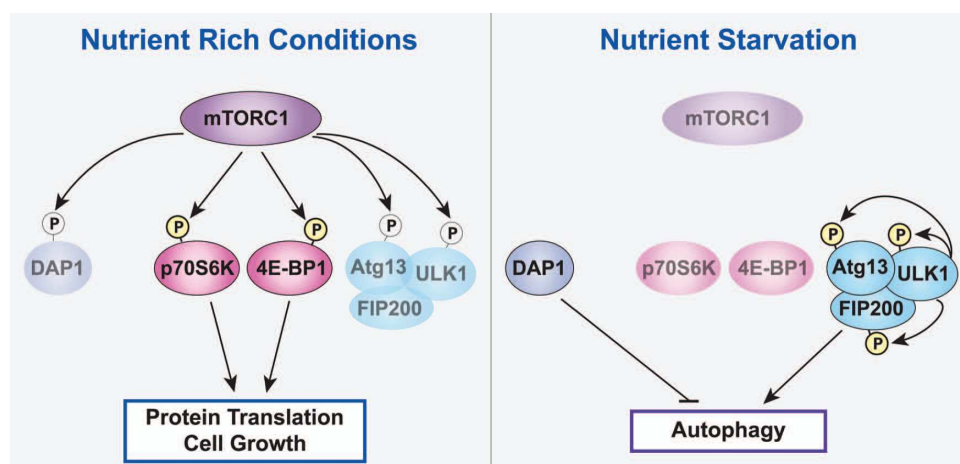
Ωστόσο ο ρόλος και οι επιδράσεις της S6K στην αυτοφαγία δεν είναι απόλυτα επιβεβαιωμένες, ενώ υπάρχουν και αντικρουόμενες παρατηρήσεις, όπως πχ ότι ο αποκλεισμός της S6K σε μυικά κύτταρα δεν έχει επίδραση στην αυτοφαγία (51).



Εικόνα 42. Η ανατροφοδοτική ρύθμιση της αυτοφαγίας από την S6K και τα αμινοξέα. Πηγή: (52)

DAP1

Η DAP1 (death associated protein1) είναι ένας αναστολέας της αυτοφαγίας. Η DAP1 είναι στόχος του mTORC1 και οι ερευνητές που ανακάλυψαν την επίδρασή της στην αυτοφαγία τη χαρακτηρίζουν το «γκάζι-φρένο» της πορείας. Σε συνθήκες επάρκειας θρεπτικών συστατικών το mTORC1 φωσφορυλιώνει την DAP1 (Ser3, Ser51) και αναστέλλει τη δράση της. Με την απομάκρυνση των θρεπτικών συστατικών και ιδιαίτερα των αμινοξέων, με την αναστολή του mTORC1 μειώνεται ραγδαία και η φωσφορυλίωση της DAP1 με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή της. Έτσι σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών όταν το mTORC1 αναστέλλεται, δραστηριοποιείται ένας άλλος αρνητικός ρυθμιστής της αυτοφαγίας, η DAP1. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται μια ανεξέλεγκτη πορεία της αυτοφαγίας και περιορίζεται σε ρυθμούς ανεκτούς από το κύτταρο. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η DAP1 εκδηλώνει την ανασταλτική της δράση δεν περιλαμβάνει το mTORC1, αλλά δεν είναι ακόμα γνωστός, καθώς δεν έχουν αναγνωριστεί τα υποστρώματα ή τα λειτουργικά μοτίβα της πρωτεΐνης (54,55,123).



Εικόνα 43. Πηγή: (54)

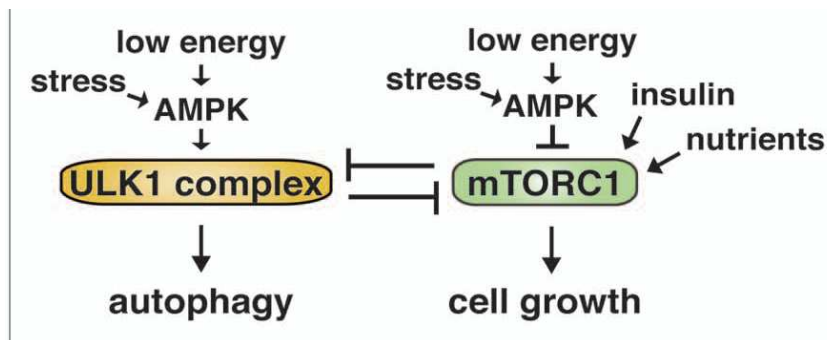
Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα σε συνθήκες επάρκειας θρεπτικών συστατικών το ενεργό mTORC1 προάγει την πρωτεϊνοσύνθεση μέσω των S6K και 4E-BP1. Κατά την έλλειψη θρεπτικών συστατικών το mTORC1 απενεργοποιείται και η φωσφορυλίωση των στόχων του αναστέλλεται. Αυτό έχει αποτέλεσμα αφενός την ενεργοποίηση του ULK συμπλόκου και την έναρξη του σχηματισμού αυτοφαγοσωμάτων, αφετέρου την ενεργοποίηση της DAP1 η οποία ρυθμίζει αρνητικά την αυτοφαγία (29,54,55,123).

ULK

Η ULK εκτός από συστατικό του μηχανισμού του σχηματισμού των αυτοφαγοσωμάτων αποτελεί και ρυθμιστικό παράγοντα της αυτοφαγίας. Η ρυθμιστική της δράση έγκειται στην αλληλεπίδρασή της με την AMPK, αλλά και με το mTORC1.

Η ULK1 ενεργοποιείται από την AMPK είτε άμεσα, είτε έμμεσα μέσω του mTORC1 (32,33,35,36). Η ενεργοποιημένη ULK1 όμως αναστέλλει τη δράση της AMPK φωσφορυλιώνοντας και τις τρεις υπομονάδες της (37,112). Με τον τρόπο αυτό ασκεί μια αρνητική ανατροφοδοτική ρύθμιση στην αυτοφαγία, αφού αναστέλλει τη δράση ενός ενεργοποιητή της διαδικασίας.

Επιπλέον έχει βρεθεί ότι η ULK εκτός από στόχο αποτελεί και αναστολέα του mTORC1 (35,112). Με την αναστολή της δράσης του mTORC1 η ULK1 παρέχει ένα μηχανισμό θετικής ανατροφοδότησης που ενισχύει την πορεία της αυτοφαγίας. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η ULK1 αναστέλλει τη δράση του mTORC1 δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος. Αυτό που μέχρι τώρα γνωρίζουμε είναι ότι η ULK1 δεσμεύεται στο raptor και το φωσφορυλιώνει αναστέλλοντας έτσι τη δράση του mTORC1. Αυτή η δράση του ULK1 εκδηλώνεται και παρουσία αμινοξέων και ινσουλίνης που είναι ισχυροί ενεργοποιητές του mTORC1 (112).

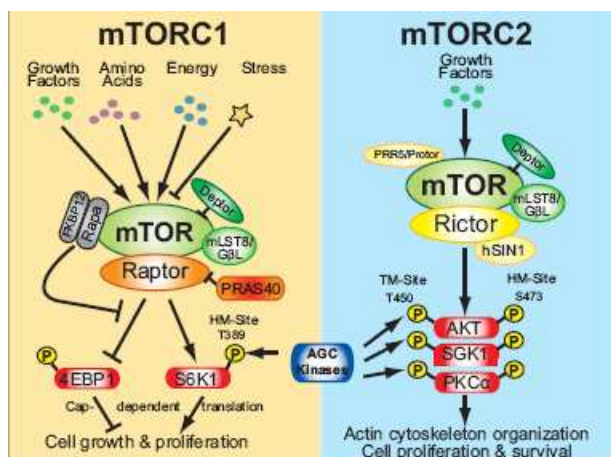


Εικόνα 44. Η ρύθμιση μεταξύ ULK1- mTORC1. Πηγή: (112)

Με την ελάττωση των επιπέδων ενέργειας στο κύτταρο λοιπόν κινητοποιείται η πορεία της AMPK η οποία προάγει το σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων επιδρώντας στο mTORC1, αλλά και άμεσα στο ULK1. Η ενεργοποιημένη ULK1 αφενός συμμετέχει στο σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος, αφετέρου αναστέλλει το mTORC1 με αποτέλεσμα την ενίσχυση της αυτοφαγικής πορείας. Παράλληλα όμως μειώνει τους ρυθμούς της αυτοφαγίας καθώς αναστέλλει την AMPK.

3.13 mTORC2

Το mTORC2 είναι το δεύτερο σύμπλοκο που σχηματίζει η mTOR στα κύτταρα των θηλαστικών. Η αρχική διάκριση μεταξύ των δύο συμπλόκων έγινε με βάση την παρατήρηση ότι το mTORC1 είναι ευαίσθητο στη ραπαμυκίνη, ενώ το mTORC2 όχι, αν και τελικά και το mTORC2 μπορεί να αναστέλλεται από τη ραπαμυκίνη (24). Για τη δράση και κυρίως για τη ρύθμισή του λίγα πράγματα είναι γνωστά. Φαίνεται όμως ότι και το mTORC2 έχει ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού και στην επιβίωση του κυττάρου κυρίως μέσω της επίδρασής του στην Akt, καθώς και στην οργάνωση του κυτταρικού σκελετού (24,56).

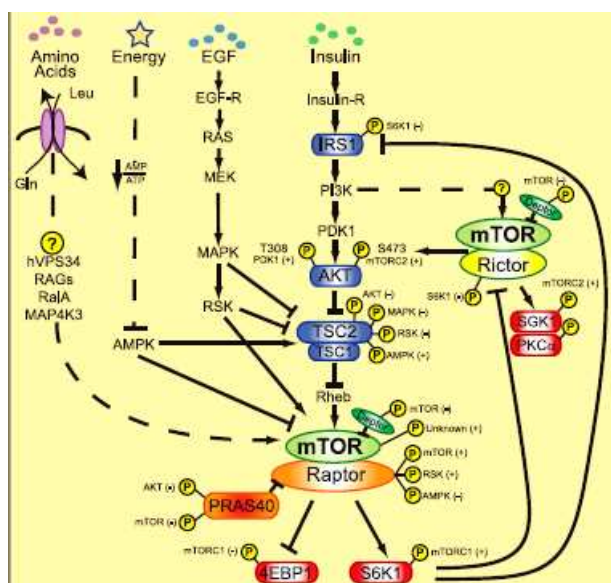


Εικόνα 45. Τα σύμπλοκα της mTOR. Πηγή: (56)

Όσο αφορά την αυτοφαγία το mTORC2 είναι αρνητικός ρυθμιστής της πορείας και ασκεί τη δράση του αυτή μέσω της επίδρασής του στην Akt. Η Akt υπενθυμίζεται ότι συμμετέχει στην πορεία της PI3K η οποία εκκινείται από αυξητικούς παράγοντες και αναστέλλει την αυτοφαγία μέσω του mTORC2. Η πλήρης ενεργοποίηση της Akt υπό την επίδραση των αυξητικών παραγόντων γίνεται με τη φωσφορυλίωσή της από την PDK1 στη Ser308 και από το mTORC2 Ser473 (24,29,31,56). Έτσι το mTORC2 ενισχύει την πορεία της PI3K με αποτέλεσμα την αρνητική ρύθμιση της αυτοφαγίας. Η πορεία της PI3K ωστόσο εξακολουθεί να είναι ενεργή και χωρίς τη φωσφορυλίωση της Akt από το mTORC2 (24). Η Akt άλλωστε εξακολουθεί να εκδηλώνει διάφορες δράσεις της και απουσία του mTORC2, ενώ ένας πιθανός ρόλος του mTORC2 είναι η επιλογή των υποστρωμάτων της Akt (56).

Η ανασταλτική δράση του mTORC2 στην αυτοφαγία επιβεβαιώθηκε και από το εύρημα ότι η καταστολή του mTORC2 σε μυϊκά κύτταρα πυροδότησε την αυτοφαγία σε συνθήκες νηστείας. Η πυροδότηση της αυτοφαγίας στην περίπτωση αυτή αποδόθηκε στη δράση του FOXO3, ενός μεταγραφικού παράγοντα που προάγει την έκφραση των γονιδίων της αυτοφαγίας και ρυθμίζεται από την Akt (27).

Το mTORC2 με την S6K δημιουργούν και μια πορεία ανατροφοδοτικής ρύθμισης της αυτοφαγίας. Η S6K, που είναι στόχος του mTORC1, φωσφορυλιώνει το Rictor που είναι υπομονάδα του mTORC2 με αποτέλεσμα την ελάττωση της δράσης του mTORC2 (56). Με τον τρόπο αυτό η S6K ενισχύει την αυτοφαγική πορεία γιατί ελαττώνει τη δράση ενός αρνητικού ρυθμιστή της πορείας.



Εικόνα 46. Η ρύθμιση των mTOR συμπλόκων. Πηγή: (56)

Η ρύθμιση του mTORC2 δεν είναι γνωστή. Τα θρεπτικά συστατικά δεν επιδρούν στη δράση του mTORC2. Οι αυξητικοί παράγοντες ίσως ρυθμίζουν το mTORC2. Η υπόθεση αυτή βασίζεται στην παρατήρηση ότι το mTORC2 φωσφορυλιώνει την Akt στην PI3K πορεία (31,56).

4 Νηστεία – Έλλειψη θρεπτικών συστατικών

Από τις πρώτες μελέτες για την αυτοφαγία η έλλειψη θρεπτικών συστατικών βρέθηκε ότι είναι ισχυρός ενεργοποιητής της αυτοφαγίας. Επιπλέον η ινσουλίνη, η ορμόνη που εκκρίνεται σε συνθήκες επάρκειας θρεπτικών συστατικών και προάγει αναβολικές διαδικασίες, αναστέλλει την αυτοφαγία, ενώ η γλυκαγόνη (59), η ορμόνη που εκκρίνεται όταν δεν υπάρχει εισροή θρεπτικών συστατικών στον οργανισμό, προάγει την αυτοφαγία (36). Η έλλειψη θρεπτικών συστατικών πυροδοτεί την αυτοφαγία η οποία τροφοδοτεί το κύτταρο με πρώτες ύλες για την παραγωγή ενέργειας, αλλά και για τη σύνθεση πρωτεϊνών (19,36). Στους πολυκύτταρους οργανισμούς μάλιστα με την αυτοφαγία υποστηρίζονται και περιφερικοί ιστοί καθώς τα συστατικά που παράγονται με την αυτοφαγία μπορούν να εξέρχονται από το κύτταρο στο οποίο παράγονται και έτσι μπορεί επιπλέον να διατηρούνται σχετικά σταθερά τα επίπεδα θρεπτικών συστατικών στο εξωκυτταρικό περιβάλλον (19).

Η νηστεία μέσα σε 24 ώρες πυροδοτεί την αυτοφαγία σε διάφορα όργανα και ιστούς όπως: ήπαρ, πάγκρεας και εξωκρινείς αδένες, σκελετικούς μυς, νεφρούς, καρδιά αλλά όχι στον εγκέφαλο (36,57,58). Ο εγκέφαλος προστατεύεται από την αυτοφαγία καθώς τροφοδοτείται με γλυκόζη και κετόνες που παράγονται στο ήπαρ και υποστηρίζεται από τους άλλους ιστούς (57,58). Και στον εγκέφαλο ωστόσο λαμβάνει χώρα η αυτοφαγία, όπως βρέθηκε με χρήση φαρμακευτικών παραγόντων, αλλά όχι ως απόκριση στη νηστεία (36). Παρομοίως η αυτοφαγία στους νευρώνες είναι μια διαδικασία απαραίτητη για την ομοιόσταση, αλλά δεν έχει το ρόλο της προσαρμογής στη νηστεία (36).

Ο σημαντικός ρόλος της αυτοφαγίας για την προσαρμογή στη νηστεία φαίνεται από το γεγονός ότι με την αναστολή της αυτοφαγίας με φαρμακευτικούς παράγοντες παρουσιάζεται καρδιακή δυσλειτουργία από τα πρώτα κιόλας στάδια της νηστείας (58). Ένα κλασικό παράδειγμα στο οποίο αναφέρονται συχνά οι ερευνητές είναι το πείραμα των Kuma et al, 2004 που έδειξε ότι ποντίκια στα οποία η αυτοφαγία δεν εξελίσσεται κανονικά δεν μπορούν να επιβιώσουν κατά το χρονικό διάστημα από τον τοκετό μέχρι να θηλάσουν. Αυτή η χρονική περίοδος είναι μια περίπτωση ακραίας νηστείας που αναδεικνύει το ρόλο της αυτοφαγίας στην υποστήριξη του μεταβολισμού και της επιβίωσης.

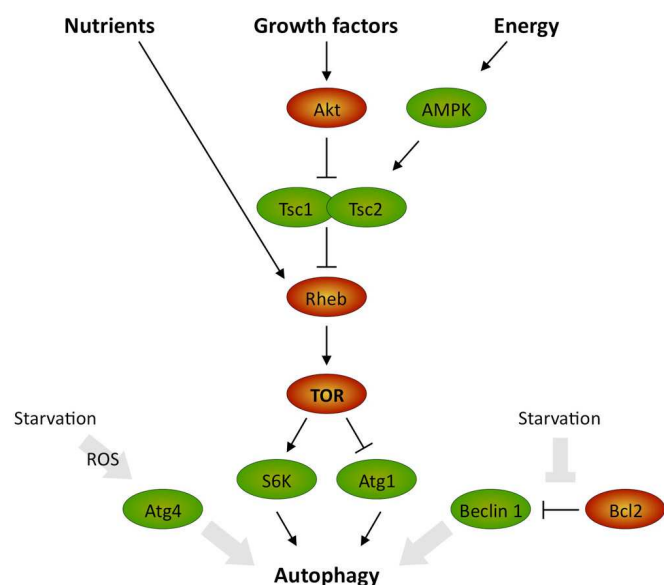
Η αυτοφαγία ωστόσο δεν πυροδοτείται μόνο σε ακραίες συνθήκες νηστείας, αλλά και μεταξύ των γευμάτων σε όργανα όπως το ήπαρ για την υποστήριξη του μεταβολισμού, αλλά και για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων συστατικών από το κύτταρο (36,57).

Η αυτοφαγία που πυροδοτείται από τη νηστεία ακολουθεί μια κλιμάκωση και στους περισσότερους ιστούς επιστρέφει στα βασικά επίπεδα μέσα σε 48 ώρες (57). Το γεγονός αυτό αντανakλά τους μηχανισμούς ανατροφοδότησης που προστατεύουν το κύτταρο από την εκτεταμένη αυτοφαγία που μπορεί να καταλήξει και σε κυτταρικό θάνατο.

4.1 Οδοί μεταγωγής μηνύματος που ενεργοποιούνται κατά τη νηστεία

Κατά τη νηστεία τα αποθέματα γλυκόζης μειώνονται με αποτέλεσμα την ελάττωση των επιπέδων ATP και την ενεργοποίηση της πορείας της AMPK. Με την ελάττωση των επιπέδων της γλυκόζης ελαττώνονται και τα επίπεδα ινσουλίνης με αποτέλεσμα την αναστολή της PI3K πορείας και την απενεργοποίηση του mTORC1. Η ελάττωση των επιπέδων των αμινοξέων πυροδοτεί επίσης την αυτοφαγία μέσω διάφορων οδών, με πιο πιθανή την πορεία των Rag GTPασών.

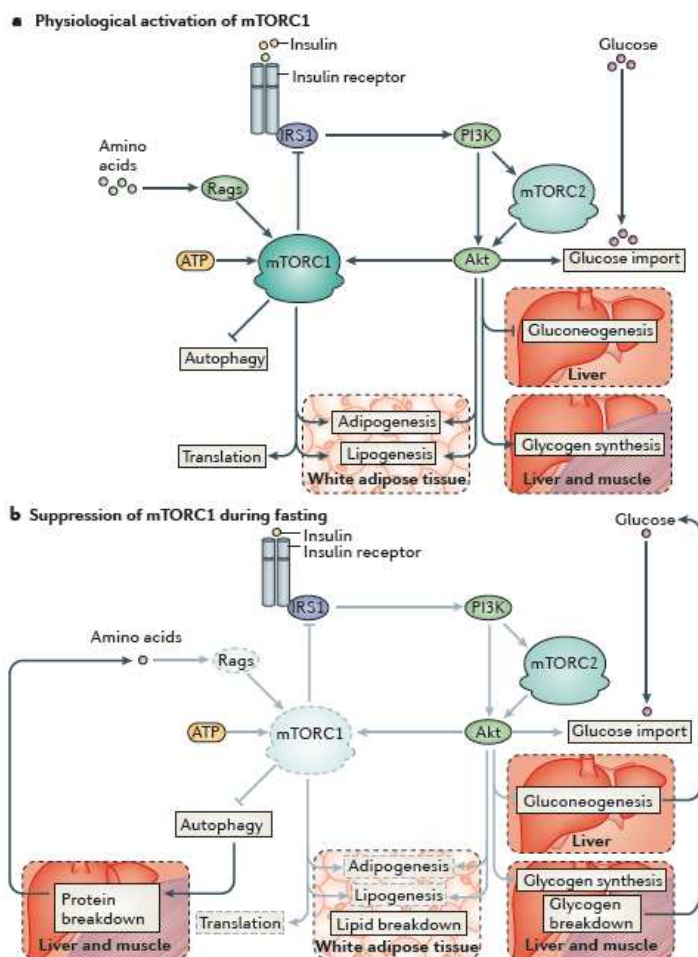
Κατά τη νηστεία κινητοποιούνται και διάφορες άλλες πορείες που προάγουν την αυτοφαγία. Για παράδειγμα δημιουργούνται ROS που αυξάνουν την αυτοφαγία μέσω διάφορων μηχανισμών. Στο διάγραμμα της εικόνας 47 η αύξηση των ROS φαίνεται να αυξάνει την αυτοφαγία μέσω της Atg4: η Atg4 οξειδώνεται και έτσι ελαττώνεται η ικανότητά της να αποδεσμεύει την LC3 από την αυτοφαγοσωμική μεμβράνη με αποτέλεσμα την αύξηση της αυτοφαγίας. Άλλοι παράγοντες κατά τη νηστεία επιδρούν στην Beclin 1. Πχ ο JNK αποδεσμεύει την Beclin1 από την Bcl-2 με αποτέλεσμα την έναρξη της αυτοφαγίας.



Εικόνα 47. Η ρύθμιση της αυτοφαγίας από τα θρεπτικά συστατικά. Πηγή: (1)

Σε επίπεδο οργάνων κατά τη νηστεία η αυτοφαγία εκδηλώνεται με υψηλούς ρυθμούς στους σκελετικούς μυς και στο ήπαρ. Τα αμινοξέα που παράγονται από την αποδόμηση των πρωτεϊνών στους μυς μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας στο ήπαρ όπου μπορούν να μετατραπούν σε γλυκόζη μέσω της γλυκονεογένεσης. Την ίδια τύχη μπορεί να έχουν και τα αμινοξέα που παράγονται στο ήπαρ. Το γλυκογόνο που βρίσκεται αποθηκευμένο στο ήπαρ μπορεί επίσης να αποδομηθεί με την πορεία της αυτοφαγίας για την άμεση παραγωγή ενέργειας. Τα αποθέματα λίπους στο ήπαρ επίσης αξιοποιούνται για την παραγωγή ενέργειας μέσω του αυτοφαγικού καταβολισμού τους.

Μια ενδιαφέρουσα απόκριση στη νηστεία είναι η αυτοφαγία των μιτοχονδρίων. Κατά την έλλειψη των θρεπτικών συστατικών η αποδόμηση των μιτοχονδρίων μέσω της αυτοφαγίας φαίνεται ότι αποτελεί μια πιο άμεση πηγή ενέργειας σε σχέση με την ενέργεια που παράγεται με την αναπνοή στα μιτοχόνδρια. Επιπλέον κατά τη νηστεία η αναστολή της mTOR αναστέλλει τη σύνθεση νέων μιτοχονδρίων (31) η οποία αφενός είναι ενεργοβόρος διαδικασία, αφετέρου ίσως τα νέα μιτοχόνδρια να πλεονάζουν σε έλλειψη θρεπτικών συστατικών. Τα μιτοχόνδρια που απομένουν όμως προσαρμόζονται ώστε να είναι πιο αποτελεσματικά καθώς εμπλουτίζονται με ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας μέσω διαδικασίας που ρυθμίζεται από το mTORC1 (31).



Εικόνα 48. Η ρύθμιση της αυτοφαγίας και του μεταβολισμού από την mTOR a) σε κανονικές συνθήκες, b) σε συνθήκες νηστείας. Πηγή: (31)

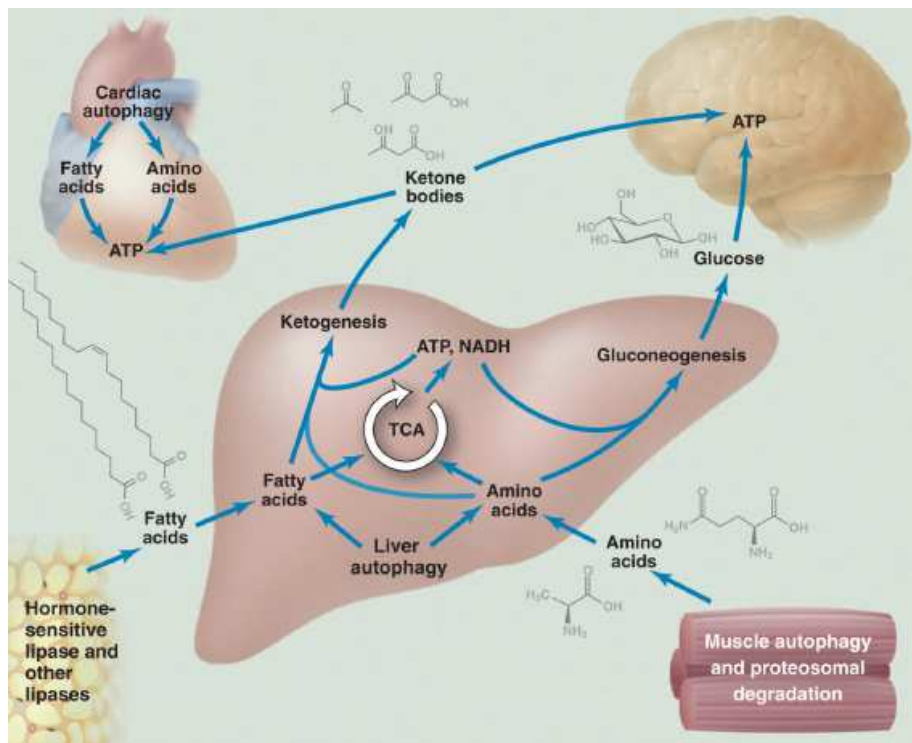
4.2 Προσαρμογή του οργανισμού στη νηστεία – Οι μεταβολικές πορείες κατά τη νηστεία

Κατά τη νηστεία με την πτώση των επιπέδων γλυκόζης, αμινοξέων, ινσουλίνης και ATP παύουν οι αναβολικές διαδικασίες στο κύτταρο και αυξάνονται οι ρυθμοί της αυτοφαγίας (31).

Στο ήπαρ με την πυροδότηση της αυτοφαγίας αρχίζει η αποδόμηση μιτοχονδρίων, κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών και γλυκογόνου μέσω της αυτοφαγίας (31). Οι ρυθμοί της αυτοφαγίας στο ήπαρ μάλιστα είναι τόσο έντονοι που σε κανονικές συνθήκες μπορεί να αποδομηθεί ανά ώρα το 1,5% του συνολικού πρωτεώματος και σε συνθήκες νηστείας το 5% του συνολικού πρωτεώματος (36,59), ενώ σε 24ωρη νηστεία το μέγεθός του σε ποντίκια συρρικνώνεται στο 1/3 του κανονικού (31). Επιπλέον στο ήπαρ κινητοποιούνται τα αποθέματα λίπους: τα σταγονίδια λίπους ακολουθούν την οδό της αυτοφαγίας και διασπώνται προς ελεύθερα λιπαρά οξέα που μπορούν να αποδώσουν ενέργεια μέσω της β-οξειδώσης στο ήπαρ και στους μυς (31). Οι ρυθμοί της αυτοφαγίας αυξάνονται επίσης στους σκελετικούς μυς με αποτέλεσμα τη μαζική διάσπαση πρωτεϊνών προς αμινοξέα που μέσω της κυκλοφορίας φτάνουν στο ήπαρ για να μετατραπούν σε γλυκόζη (31). Η αυτοφαγία στους σκελετικούς μυς εξελίσσεται σε μικρότερο βαθμό σε σύγκριση με το ήπαρ. Αν λάβουμε υπόψη όμως το μέγεθος του μυϊκού

ιστού προκύπτει μια σημαντική ποσότητα αμινοξέων που παράγονται μέσω της αυτοφαγίας τα οποία μπορεί να χρησιμοποιηθούν είτε για την παραγωγή ενέργειας είτε για τη σύνθεση πρωτεϊνών (60).

Οι παραπάνω πορείες που επικρατούν με την εξάντληση των αποθεμάτων γλυκογόνου (~12ωρη νηστεία) φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.



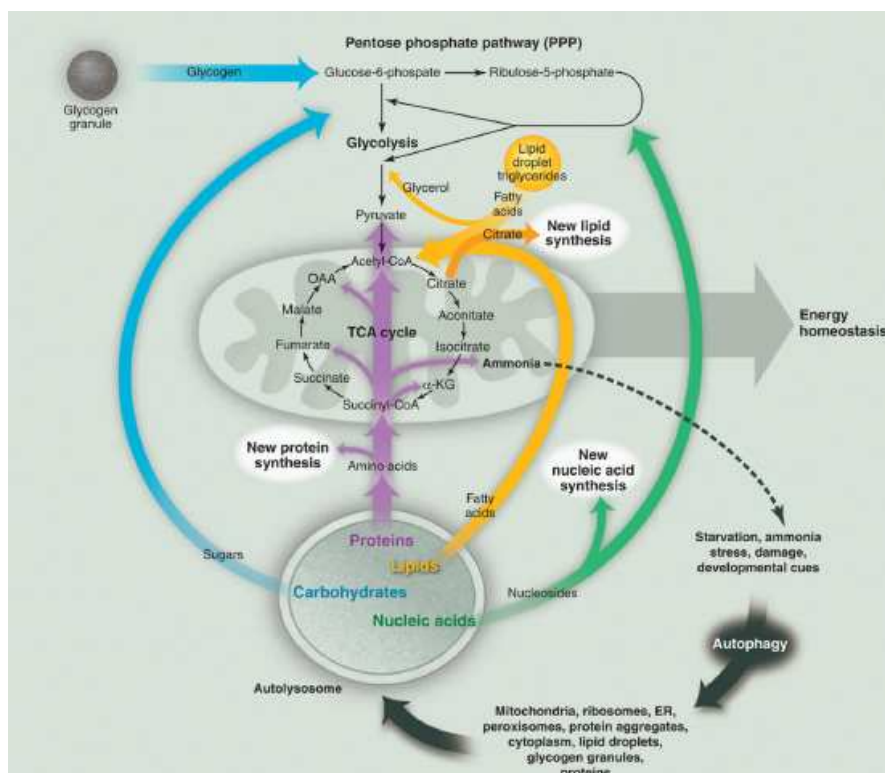
Εικόνα 49. Πηγή: (58)

Στο λευκό λιπώδη ιστό η λιπόλυση τροφοδοτεί το ήπαρ με λιπαρά οξέα, ενώ η αυτοφαγία στους μυς τροφοδοτεί το ήπαρ με αμινοξέα. Στο ήπαρ τα λιπαρά οξέα που παράγονται από την αυτοφαγία στο ήπαρ ή σε περιφερικούς ιστούς χρησιμοποιούνται είτε για την παραγωγή ενέργειας είτε για το σχηματισμό κετονικών σωμάτων. Τα αμινοξέα που παράγονται στο ήπαρ και στους σκελετικούς μυς είτε τροφοδοτούν με ενδιάμεσα τον κύκλο του κιτρικού οξέος (TCA), είτε ακολουθούν την οδό της κετογένεσης ή σχηματίζουν γλυκόζη με την οδό της γλυκονεογένεσης. Η ενέργεια που παράγεται στο ήπαρ χρησιμοποιείται για τη διεξαγωγή της κετογένεσης και της γλυκονεογένεσης. Η γλυκόζη και τα κετονικά σώματα που σχηματίζονται στο ήπαρ τροφοδοτούν τον εγκέφαλο, αλλά και την καρδιά όπου επίσης λαμβάνει χώρα αυτοφαγία για τις ενεργειακές ανάγκες του μυοκαρδίου (58).

Κατά τη νηστεία η αυτοφαγία εξελίσσεται σε διάφορους ιστούς και όργανα και αξιοποιούνται για την παραγωγή ενέργειας διάφορα συστατικά του κυττάρου. Έτσι εκτός από τα σταγονίδια λίπους και τα κοκκία γλυκογόνου που αποτελούν κλασσικά ενεργειακά υποστρώματα με την αυτοφαγία για την παραγωγή ενέργειας διασπώνται επίσης πρωτεΐνες, συσσωματώματα

πρωτεϊνών, αλλά και ολόκληρα οργανίδια, όπως πχ μιτοχόνδρια (58,31). Τα προϊόντα του καταβολισμού αυτών των συστατικών υποστηρίζουν μεταβολικά το κύτταρο στο οποίο παράγονται, αλλά και μέσω της κυκλοφορίας περιφερικούς ιστούς και ζωτικά όργανα, όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα (31,58,60).

Τα προϊόντα της αυτοφαγίας, δηλαδή γλυκόζη και σάκχαρα, αμινοξέα, λιπαρά οξέα και νουκλεοτίδια ακολουθούν τις μεταβολικές πορείες που απεικονίζονται στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 50. Πηγή: (58)

Τα σάκχαρα και η γλυκόζη που παράγονται από τη γλυκογονόλυση και την αυτοφαγία ακολουθούν τη γλυκολυτική πορεία ή και τον κύκλο των φωσφοπεντοζών (PPP) για την παραγωγή ATP και πυροσταφυλικού για τον κύκλο του κιτρικού οξέος (TCA). Τα νουκλεοτίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το σχηματισμό νέων νουκλεϊκών οξέων, αλλά και για την παραγωγή ATP μέσω του κύκλου των φωσφοπεντοζών και της γλυκόλυσης. Τα αμινοξέα μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε για τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών είτε για την παραγωγή ενέργειας τροφοδοτώντας με ενδιάμεσα τον κύκλο του Krebs. Στο ήπαρ μέσω της γλυκονεογένεσης και της κετογένεσης μπορούν να σχηματίσουν γλυκόζη και κετονικά σώματα, ενώ μέσω του κιτρικού μπορούν να σχηματίσουν λιπαρά οξέα για τη σύνθεση νέων μεμβρανών. Τα λιπίδια τέλος που προκύπτουν από την αυτοφαγία και τη λιπόλυση δίνουν ενέργεια κυρίως μέσω του ακετυλο-CoA, ενώ μέσω του κιτρικού μπορούν να δώσουν νέα λιπίδια (58).

Όπως αναφέρεται και στη ρύθμιση της αυτοφαγίας, τα τελικά προϊόντα του καταβολισμού των συστατικών του κυττάρου αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές της αυτοφαγίας. Δηλαδή κατά την εξέλιξη της πορείας καθώς γίνονται διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά το mTORC1 επανενεργοποιείται αναστέλλοντας την αυτοφαγία. Έτσι όπως έχει μετρηθεί και σε ποντίκια σε 48 ώρες τα επίπεδα αυτοφαγίας στο ήπαρ και στους περισσότερους ιστούς επιστρέφουν στα βασικά επίπεδα (57). Στους σκελετικούς και στον καρδιακό μυ ωστόσο η αυτοφαγία εξακολουθεί να είναι αυξημένη και σε 48 ώρες νηστείας, ενώ ο εγκέφαλος προστατεύεται χρησιμοποιώντας τη γλυκόζη και τα κετονικά σώματα που παράγονται στο ήπαρ (58,57). Η αναστολή των τελικών προϊόντων λοιπόν ερμηνεύει εν μέρει την κλιμάκωση που παρουσιάζει η αυτοφαγία που πυροδοτείται από τη νηστεία (36,57,58,60,61).

4.3 Διάσπαση πρωτεϊνών μέσω της αυτοφαγίας

Οι πρωτεΐνες αποτελούν το πιο κλασσικό ίσως υπόστρωμα της αυτοφαγίας. Ο ρυθμός αποδόμησης των μακρόβιων πρωτεϊνών μάλιστα έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης αυτοφαγίας (36). Οι πρωτεΐνες ακολουθούν την αυτοφαγική πορεία σε διάφορους ιστούς και με πολύ έντονους ρυθμούς στο ήπαρ (36,59). Ενδεικτικά στο ήπαρ ποντικών η αυτοφαγία που επάγεται ως απόκριση στη νηστεία έχει αποτέλεσμα την ελάττωση του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου του ήπατος κατά 40% μέσα σε 24 ώρες (66). Τα αμινοξέα που παράγονται έχουν διπλό ρόλο: α) την παροχή ενέργειας μέσω του καταβολισμού τους για τη διατήρηση του ενεργειακού ισοζυγίου και την υποστήριξη του μεταβολισμού μέσω της γλυκονεογένεσης και της κετογένεσης και β) τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών.

Τα αμινοξέα γενικά θεωρούνται μία μάλλον φτωχή πηγή ενέργειας (62). Αν λάβουμε υπόψη δε, το υψηλό ενεργειακό κόστος της αυτοφαγικής πορείας το καθαρό ενεργειακό κέρδος από τον αυτοφαγικό καταβολισμό των πρωτεϊνών γίνεται ακόμα μικρότερο (36), τόσο που θα μπορούσε να αμφισβητηθεί η συμβολή του στην υποστήριξη του ενεργειακού ισοζυγίου. Το γεγονός όμως ότι διάφοροι φαινότυποι που οφείλονται σε δυσλειτουργίες της αυτοφαγίας αναστρέφονται με την παροχή υποστρωμάτων του κύκλου του Krebs, αποδεικνύει ότι η αυτοφαγία των πρωτεϊνών πράγματι υποστηρίζει το ενεργειακό ισοζύγιο (36,63).

Τα αμινοξέα χρησιμοποιούνται επίσης για τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών. Με την αυτοφαγία διασπώνται μακρόβιες ή μη απαραίτητες για την επιβίωση πρωτεΐνες ώστε να αναπληρωθούν τα αποθέματα αμινοξέων που θα χρησιμοποιηθούν ως δομικοί λίθοι για την παραγωγή πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την επιβίωση. Η σημασία της αναπλήρωσης των «δεξαμενών»

αμινοξέων μέσω της αυτοφαγίας φαίνεται από το γεγονός ότι με την αναστολή της αυτοφαγίας μειώνονται και οι ρυθμοί της πρωτεϊνوسύνθεσης (36,64).

Η αυτοφαγία είναι μια διαδικασία η οποία σε κανονικές συνθήκες εξελίσσεται στο κύτταρο σε κάποια βασικά επίπεδα συμβάλλοντας στην απομάκρυνση μακρόβιων πρωτεϊνών, ελαττωματικών πρωτεϊνών ή και συσσωματωμάτων πρωτεϊνών για την προστασία του κυττάρου (36). Σε συνθήκες νηστείας όμως η αυτοφαγία συνολικά και ο αυτοφαγικός καταβολισμός των πρωτεϊνών αυξάνεται σημαντικά για την υποστήριξη του μεταβολισμού και την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του κυττάρου. Κατά τις πρώτες ώρες της νηστείας οι πρωτεΐνες καταβολίζονται για την παραγωγή ενέργειας στο πρωτεόσωμα, ενώ ακολούθως επικρατεί ο καταβολισμός μέσω της αυτοφαγίας που κορυφώνεται γύρω στις 6-8 ώρες νηστείας (36,59). Το επόμενο χρονικό διάστημα η μακροαυτοφαγία των πρωτεϊνών κλιμακώνεται και μετά από 8 ώρες νηστείας η μακροαυτοφαγία μεταβάλλεται σε CMA. Ο καταβολισμός των πρωτεϊνών μέσω της CMA φτάνει στους μεγαλύτερους ρυθμούς στις 10-12 ώρες νηστείας και διατηρείται στα επίπεδα αυτά για περισσότερο από 3 ημέρες (36,102).

Η CMA όπως περιγράφεται σε προηγούμενη ενότητα είναι μια μορφή αυτοφαγίας με υψηλή εκλεκτικότητα. Με την προοδευτική επικράτηση της CMA έναντι της μακροαυτοφαγίας καθώς η νηστεία παρατείνεται υπάρχει μια κλιμάκωση στη μαζική αποδόμηση πρωτεϊνών και καταβολίζονται κατά κύριο λόγο οι πρωτεΐνες που μπορούν να ακολουθήσουν τη CMA πορεία (βλ ενότητα CMA). Με τον τρόπο αυτό προστατεύονται ζωτικής σημασίας οργανίδια και πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την επιβίωση του κυττάρου (36).

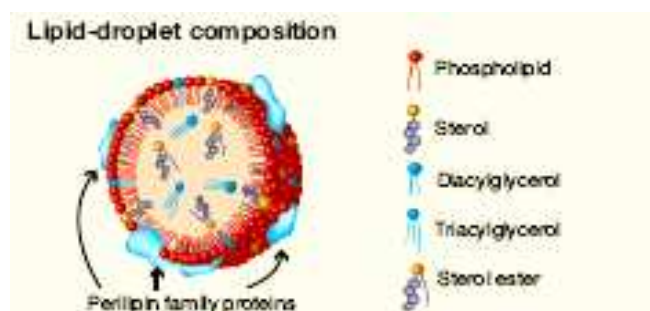
Η ελάττωση των επιπέδων του αυτοφαγικού καταβολισμού πρωτεϊνών κατά την παράταση της νηστείας οφείλεται σε διάφορους ανατροφοδοτικούς μηχανισμούς που περιγράφονται στην ενότητα της ρύθμισης της αυτοφαγίας. Οι λόγοι όμως της αύξησης της CMA και η επικράτησή της έναντι της αυτοφαγίας δεν είναι διευκρινισμένοι. Ίσως κάποιο ρόλο έχουν οι οξειδωμένες πρωτεΐνες που αυξάνονται στο κύτταρο κατά την εξέλιξη της νηστείας (4,36).

4.4 Αυτοφαγία και μεταβολισμός λιπιδίων

Πρόσφατα αποδείχτηκε ότι η αυτοφαγία συμμετέχει στο μεταβολισμό των λιπιδίων και η διαδικασία του καταβολισμού των λιπιδίων μέσω της αυτοφαγίας ονομάστηκε λιποφαγία ή μακρολιποφαγία (36,62). Παρόλο που από τις πρώτες λειτουργίες που αποδόθηκαν στην αυτοφαγία ήταν η συνεισφορά της σε ενέργεια και θρεπτικά συστατικά σε συνθήκες νηστείας, το γεγονός ότι τα πλούσια ενεργειακά λιπίδια αποτελούν υπόστρωμα της αυτοφαγίας

αποδείχτηκε μόλις πρόσφατα (65,66). Σήμερα λοιπόν γνωρίζουμε ότι τα σταγονίδια λίπους (LDs Lipid Droplets) απομονώνονται σε αυτοφαγосώματα που συντήκονται με το λυσόσωμα στο εσωτερικό των οποίων καταβολίζονται με τη δράση όξινων λιπασών (36,62,66).

Τα λίπη στο κύτταρο αποθηκεύονται στη μορφή σταγονιδίων λίπους (LD). Τα LD είναι σφαιρικά οργανίδια ο πυρήνας των οποίων αποτελείται από τριγλυκερίδια (TG) και χοληστερόλη (chol) που περιβάλλονται από μια μονοστιβάδα φωσφολιπιδίων και εξωτερικά από ένα κάλυμμα πρωτεϊνών που ονομάζονται περιλιπίνες (62,67). Προέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο και υπάρχουν σε όλους τους τύπους κυττάρων, ενώ στα λιποκύτταρα καταλαμβάνουν σχεδόν το σύνολο του κυτοσολίου. Στο λιποκύτταρο υπάρχει ένα μεγάλο LD (διαμέτρου >100μm) ο πυρήνας του οποίου αποτελείται κυρίως από TG, ενώ στους άλλους τύπους κυττάρων υπάρχουν LDs μικρότερης διαμέτρου (0,1-10μm) ο πυρήνας των οποίων αποτελείται από TG και χοληστερόλη (62,67).

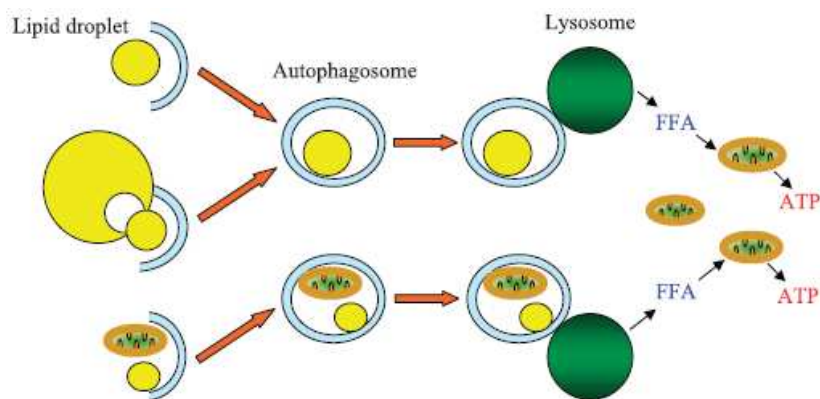


Εικόνα 51. Πηγή: (67)

Τα LD ανακυκλώνονται με τη λιπόλυση κατά την οποία τα TG των LD υδρολύονται προς ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) το μεγαλύτερο μέρος των οποίων επανεστεροποιείται σε TG ενώ το υπόλοιπο είτε εκκρίνεται ενωμένο με λιποπρωτεΐνες είτε οξειδώνεται στα μιτοχόνδρια για παραγωγή ενέργειας (66). Οι ρυθμοί της λιπόλυσης αυξάνουν για να καλυφθούν οι ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου, αλλά και όταν το κύτταρο εκτίθεται σε μεγάλα ποσά λιπιδίων ώστε να αποφευχθεί η υπερβολική αύξηση του μεγέθους ή αριθμού των LD (62,66). Η «κλασσική» διαδικασία της λιπόλυσης μεσολαβείται από τις κυτοσολικές λιπάσες που δρουν στην επιφάνεια των LD και ρυθμίζονται από πρωτεϊνικούς αναστολείς και ενεργοποιητές των λιπασών (62,66).

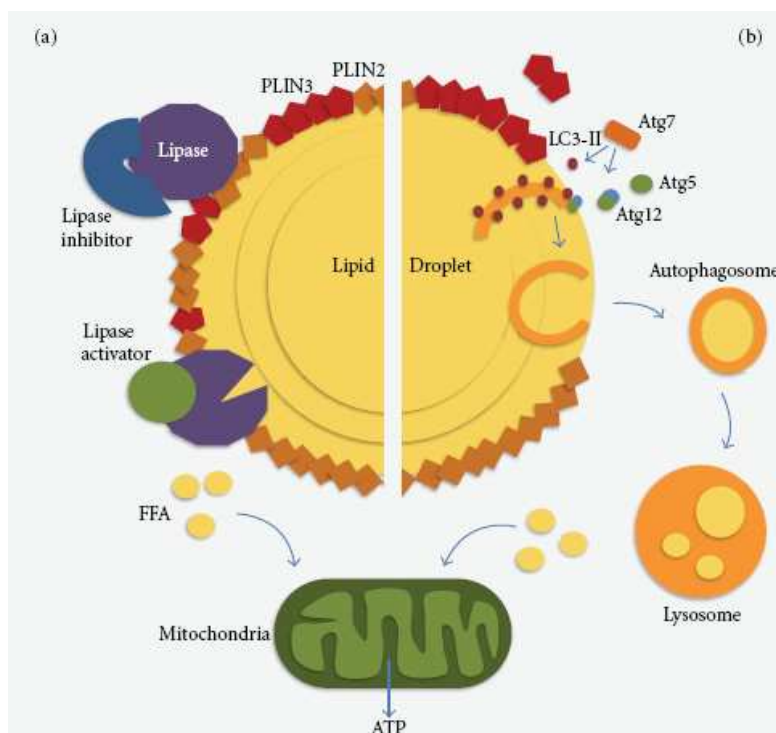
Η κινητοποίηση των λιπιδίων και η διάσπαση των LD όπως αποδείχτηκε το 2009 από τους Singh et al. και Shibata et al μπορεί να γίνει και μέσω της αυτοφαγίας. Τα LD λοιπόν μπορούν να καταβολίζονται με τη διαδικασία της αυτοφαγίας: στην εξωτερική μεμβράνη του LD αρχίζει να αναπτύσσεται η αυτοφαγосωμική μεμβράνη η οποία είτε περικλείει ολόκληρο το σταγονίδιο είτε ένα κλάσμα αυτού για να σχηματιστεί το αυτοφαγосώμα που συντήκεται με το λυσόσωμα

για να ακολουθήσει η διάσπαση του λιπιδικού φορτίου από τις όξινες λυσοσωμικές υδρολάσες (62). Τα LD μπορούν επίσης να εγκλωβίζονται σε αυτοφαγосώματα και μαζί με άλλα συστατικά από το κυττόςολιο, όπως πχ μιτοχόνδρια, ιδιαίτερα όταν η αυτοφαγία εξελίσσεται σε βασικό επίπεδο ως μια διαδικασία «μαζικού καταβολισμού» (62,66). Όπως φαίνεται λοιπόν και στο παρακάτω σχήμα το αυτοφαγосώμα μπορεί να περικλείει ολόκληρο το LD, ένα τμήμα του ή και το LD μαζί με άλλα συστατικά, πχ μιτοχόνδρια, ενώ τα λιπαρά οξέα που προκύπτουν μπορούν να δώσουν ενέργεια μέσω της β-οξείδωσης στα μιτοχόνδρια.



Εικόνα 52. Πηγή: (66)

Η λιποφαγία λαμβάνει χώρα σε λιποκύτταρα και ηπατοκύτταρα, αλλά και σε πολλούς τύπους κυττάρων, όπως ενδοθηλιακά κύτταρα, λεμφοβλάστες, δένδριτικά κύτταρα, νευρογλοιακά κύτταρα και νευρώνες, μακροφάγα και T κύτταρα (36,62,68).



Εικόνα 53. Πηγή: (62)

Στο αριστερό τμήμα της παραπάνω εικόνας φαίνεται η λιπόλυση που μεσολαβείται από τις κυτοσολικές λιπάσες, ενώ στο δεξί τμήμα απεικονίζεται ο σχηματισμός της αυτοφαγοσωμικής μεμβράνης στην επιφάνεια του σταγονολιπιδίου και ο σχηματισμός του αυτοφαγοσώματος. Και με τις δύο διαδικασίες παράγονται ελεύθερα λιπαρά οξέα που μπορούν να οξειδωθούν στα μιτοχόνδρια για την παραγωγή ενέργειας.

Η λιποφαγία στα διάφορα κύτταρα διεξάγεται σε ένα βασικό επίπεδο για την ανακύκλωση των LD, ενώ όπως έχει βρεθεί σε ηπατοκύτταρα αυξάνεται κατά τη νηστεία, αλλά και όπως συμβαίνει γενικά με τη λιπόλυση, όταν το κύτταρο εκτίθεται σε μεγάλες ποσότητες λιπαρών οξέων. Η λιποφαγία συμμετέχει επίσης στο μεταβολισμό των λιπιδίων στο λιπώδη ιστό, ενώ μέσω της δράσης της σε υποθαλαμικούς νευρώνες επηρεάζει την πρόσληψη τροφής (36,58,62,65). Στις επόμενες παραγράφους παρουσιάζεται η επίδραση της λιποφαγίας στο ήπαρ, το λιπώδη ιστό και στον υποθάλαμο.

Λιποφαγία στο ήπαρ

Η πρώτη απόδειξη για την ύπαρξη της λιποφαγίας προέκυψε από έρευνες σε κύτταρα του ήπατος (69). Στην έρευνα των Singh et.al βρέθηκε ότι η έκθεση ηπατοκυττάρων με κατεσταλμένη την ικανότητα αυτοφαγίας σε μεγάλη ποσότητα ελαϊκού οξέος έχει αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση του μεγέθους και του αριθμού των LD στα κύτταρα αυτά. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και *in vivo* καθώς παρατηρήθηκε ότι ποντίκια με κατεσταλμένη την ικανότητα αυτοφαγίας στο ήπαρ που ακολούθησαν δίαιτα υψηλή σε λίπος για μεγάλο χρονικό διάστημα (4 μήνες) ανέπτυξαν λιπώδες ήπαρ (62,69). Όπως προσδιορίστηκε με βιοχημικές αναλύσεις η αύξηση των LD στα ηπατοκύτταρα δεν οφείλεται σε αύξηση του ρυθμού σχηματισμού των LD ούτε σε μείωση της έκκρισής τους από τα ηπατοκύτταρα, αλλά σε μειωμένη λιπόλυση (62,69). Φυσιολογικά τα κύτταρα του ήπατος όταν εκθέτονται σε μεγάλη ποσότητα λιπιδίων αυξάνουν τους ρυθμούς λιπόλυσης για να αποφευχθεί η υπερβολική αύξηση του αριθμού και του μεγέθους των LD (62). Έτσι η συσσώρευση LD σε κύτταρα με κατεσταλμένη την ικανότητα της αυτοφαγίας αποδεικνύει ότι η λιπόλυση που προάγεται ως απόκριση στην έκθεση σε μεγάλη ποσότητα λιπιδίων γίνεται μέσω της αυτοφαγικής πορείας (62). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το εύρημα ότι με την απενεργοποίηση των λιπασών του λυσοσώματος η χορήγηση μεγάλης ποσότητας λιπιδίων δεν προκαλεί αύξηση της λιπόλυσης (62,69). Τα παραπάνω ευρήματα αποδεικνύουν ότι η αυτοφαγία των λιπιδίων όντως υφίσταται και αυξάνεται όταν ακολουθείται δίαιτα πλούσια σε λίπος για μεγάλο χρονικό διάστημα (69,62).

Η αύξηση της λιποφαγίας κατά την παροχή μεγάλης ποσότητας λιπιδίων αποτελεί ένα μηχανισμό προστασίας του ήπατος: η μαζική εισροή λιπιδίων από το αίμα προκαλεί την αύξηση σύνθεσης LD στο ήπαρ ώστε να αποφευχθεί η τοξικότητα των ελεύθερων λιπαρών οξέων τα οποία εστεροποιούνται σε TG και αποθηκεύονται ως LD. Παράλληλα όμως αυξάνεται και η λιπόλυση στο ήπαρ ώστε να μην υπάρχει υπερβολική αύξηση των LD. Όταν οι ρυθμοί της λιπόλυσης δεν μπορούν να αντισταθμίσουν τους αυξημένους ρυθμούς σύνθεσης LD μπορούν να προκληθούν παθολογικές καταστάσεις, όπως η ανάπτυξη λιπώδους ήπατος. Συνεπώς η καταστολή της λιποφαγίας που συμβάλλει στη λιπόλυση μπορεί να αποτελεί μια αιτία για παθολογικές καταστάσεις στο ήπαρ που οφείλονται στη συσσώρευση λιπιδίων (62).

Η αυτοφαγία των λιπιδίων στο ήπαρ προάγεται επίσης σε περιόδους νηστείας (62,69). Όπως αναφέρεται και σε προηγούμενες ενότητες η νηστεία πυροδοτεί την αυτοφαγία η οποία αρχικά ακολουθεί πολύ έντονους ρυθμούς ενώ καθώς η νηστεία παρατείνεται η αυτοφαγία κλιμακώνεται. Σημειώνεται ότι σε πολλές έρευνες η εκτίμηση της αυτοφαγίας γίνεται με προσδιορισμό του ρυθμού καταβολισμού πρωτεϊνών που αποτελούν το κλασικό υπόστρωμα των αυτοφαγοσωμάτων. Στην έρευνα των Singh et.al 2009 προτείνεται ότι καθώς η νηστεία παρατείνεται μειώνεται η αυτοφαγική αποδόμηση των πρωτεϊνών, ενώ η συνολική δραστηριότητα της αυτοφαγίας ακολουθεί τους ίδιους ρυθμούς (62,69). Οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι καθόλη τη διάρκεια της νηστείας τα αυτοφαγοσώματα εξακολουθούν να σχηματίζονται και να αποδομούνται με τον ίδιο ρυθμό, αλλά αυτό που μεταβάλλεται είναι το φορτίο των αυτοφαγοσωμάτων (36,62). Έτσι ενώ κατά τις πρώτες ώρες της νηστείας το φορτίο των αυτοφαγοσωμάτων είναι ένα ετερογενές μίγμα κυτοσολικού υλικού, καθώς η νηστεία παρατείνεται ως φορτίο των αυτοφαγοσωμάτων επικρατούν προοδευτικά τα LD (36,62). Η εκλεκτική αυτοφαγία των λιπιδίων στο ήπαρ λοιπόν προάγεται με την έλλειψη θρεπτικών συστατικών και μάλιστα συνεχίζει να εξελίσσεται καθώς η νηστεία παρατείνεται χρονικά (36,62). Η λιποφαγία όπως οι ίδιοι ερευνητές δηλώνουν ευθύνεται σε μεγάλο ποσοστό για τη συνολική λιπόλυση στο ήπαρ σε περιόδους παρατεταμένης νηστείας (62).

Η κινητοποίηση των αποθεμάτων λίπους του ήπατος μέσω της αυτοφαγίας μπορεί να αποδώσει μεγάλα ποσά ενέργειας για τη διατήρηση του ενεργειακού ισοζυγίου σε περιόδους νηστείας (36). Παράλληλα βέβαια με τον καταβολισμό των λιπιδίων μέσω της αυτοφαγίας συνεχίζει να εξελίσσεται ο καταβολισμός των λιπιδίων και μέσω των κυτοσολικών λιπασών. Η παρουσία δύο λιπολυτικών οδών που δρουν ταυτόχρονα ερμηνεύει ίσως και την ικανότητα του ήπατος να κινητοποιεί γρήγορα μεγάλες ποσότητες λιπιδίων (66). Έτσι παρόλο που τα ηπατοκύτταρα έχουν λιγότερες κυτοσολικές λιπάσες σε σχέση με τα κύτταρα του λιπώδους ιστού εμφανίζουν υψηλούς ρυθμούς λιπόλυσης (66) λόγω της ικανότητάς τους να καταβολίζουν τα λιπίδια μέσω

της αυτοφαγίας. Ωστόσο ο λόγος της ύπαρξης δύο εναλλακτικών μηχανισμών λιπόλυσης δεν έχουν διευκρινιστεί. Ίσως να ενεργοποιούνται η κάθε μία ανάλογα με τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου, για παράδειγμα ενεργοποίηση της λιποφαγίας για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων λιπαρών οξέων σε σύντομο χρονικό διάστημα. Είναι επίσης πιθανό τα προϊόντα των δύο πορειών να μην είναι ταυτόσημα, δεδομένου ότι οι λιπάσες των λυσοσωμάτων που δρουν κατά την αυτοφαγία είναι όξινες λιπάσες η δράση των οποίων δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένη. Τέλος βάση των ενδείξεων για την ετερογένεια των LD στο κύτταρο είναι πιθανό κάθε μηχανισμός λιπόλυσης να στοχεύει σε διαφορετικά LD (62).

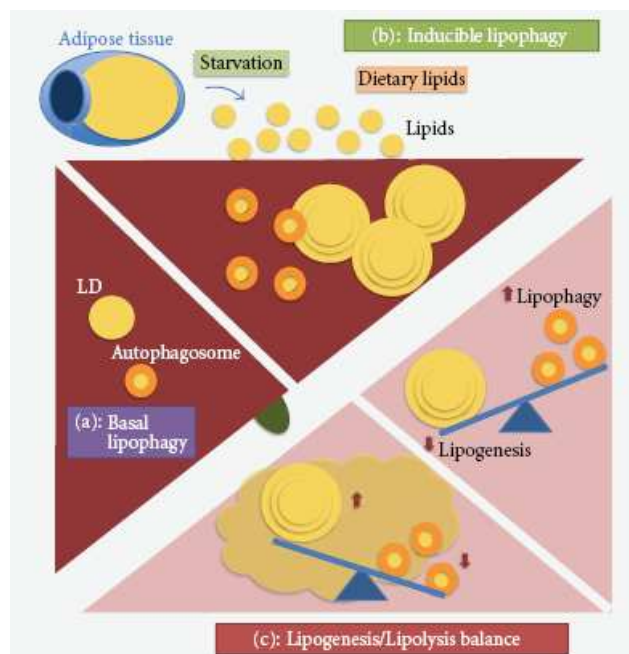
Η αύξηση της λιποφαγίας με την έκθεση των ηπατοκυττάρων σε μεγάλη ποσότητα λιπιδίων ωστόσο αποδείχτηκε *in vivo* και *in vitro* ότι φθίνει κατά τη χρόνια χορήγηση λιπιδίων (36,62,66,69). Ποντίκια σε δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος (επί 16 εβδομάδες) παρουσίασαν μειωμένη λιποφαγία, αλλά και αυτοφαγία συνολικά (36,66,69). Στα ποντίκια αυτά η λιποφαγία και η αυτοφαγία δεν αυξήθηκαν ούτε με το ερέθισμα της νηστείας ούτε το ερέθισμα της χορήγησης μεγάλης ποσότητας λιπαρών οξέων (69).

Η μη αύξηση της αυτοφαγίας με τη χρόνια χορήγηση λιπιδίων αποδόθηκε στο αυξημένο λιπιδικό περιεχόμενο των αυτοφαγοσωμάτων που φαίνεται να εμποδίζει τη σύντηξη του αυτοφαγοσώματος με το λυσόσωμα (36,66,68). Έτσι η δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος για μεγάλο χρονικό διάστημα αύξησε το λιπιδικό περιεχόμενο των ηπατοκυττάρων που είχε αποτέλεσμα την ελάττωση της σύντηξης του αυτοφαγοσώματος με το λυσόσωμα που οδηγεί σε μείωση της λιποφαγίας. Η μείωση της αυτοφαγίας με τη σειρά της προκαλεί επιπλέον συσσώρευση λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα που τελικά μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη λιπώδους ήπατος (36,62). Στα κύτταρα των θηλαστικών η αδυναμία σύντηξης του αυτοφαγοσώματος με το λυσόσωμα αναπληρώνεται σε κάποιο βαθμό με τη σύντηξη του αυτοφαγοσώματος με ενδόσωμα (36). Σε αυτό ίσως οφείλεται και το γεγονός ότι ακόμα και ποντίκια σε δίαιτα υψηλή σε λίπος αρχικά μπορεί να εκδηλώσουν μια αύξηση στην αυτοφαγία η οποία όμως προοδευτικά μειώνεται (62).

Τέλος από τους Shibata et.al (100) έχει προταθεί ότι η αυτοφαγία είναι απαραίτητη για τη βιογένεση των σταγονιδίων λίπους (65,100). Σύμφωνα με τους ερευνητές κατά τη νηστεία η LC3 είναι απαραίτητη για τη βιογένεση των LD στα κύτταρα του ήπατος και του μυοκαρδίου. Η LC3 στη λιπιδιωμένη της μορφή (LC3II) είναι απαραίτητη για την αυτοφαγία. Σε ηπατοκύτταρα που είχε ανασταλεί η διαδικασία της λιπιδίωσης της LC3 (και επομένως και η αυτοφαγία) ο

σχηματισμός LD κατά τη νηστεία μειώθηκε σημαντικά (65,100). Η επίδραση ωστόσο της LC3 στη βιογένεση των LD μπορεί να αφορά μη αυτοφαγικές δράσεις της πρωτεΐνης (65).

Στο παρακάτω σχήμα συνοψίζονται οι δράσεις της αυτοφαγίας των λιπιδίων στο ήπαρ.



Εικόνα 54. Πηγή: (62)

Όπως φαίνεται στο τμήμα (a) η λιποφαγία σε κανονικές συνθήκες εξελίσσεται σε ένα βασικό επίπεδο. Σε παρατεταμένη νηστεία ή κατά την εισροή μεγάλης ποσότητας λιπιδίων (b) η λιποφαγία αυξάνεται ώστε να διατηρηθεί ο αριθμός και το μέγεθος των LD σε κανονικά επίπεδα. Η αναστολή της αυτοφαγίας των λιπιδίων μπορεί να προκαλέσει ανισορροπία (c) καθώς η λιποφαγία φαίνεται να συμμετέχει στον καταβολισμό, αλλά και στη βιοσύνθεση των σταγονιδίων λίπους.

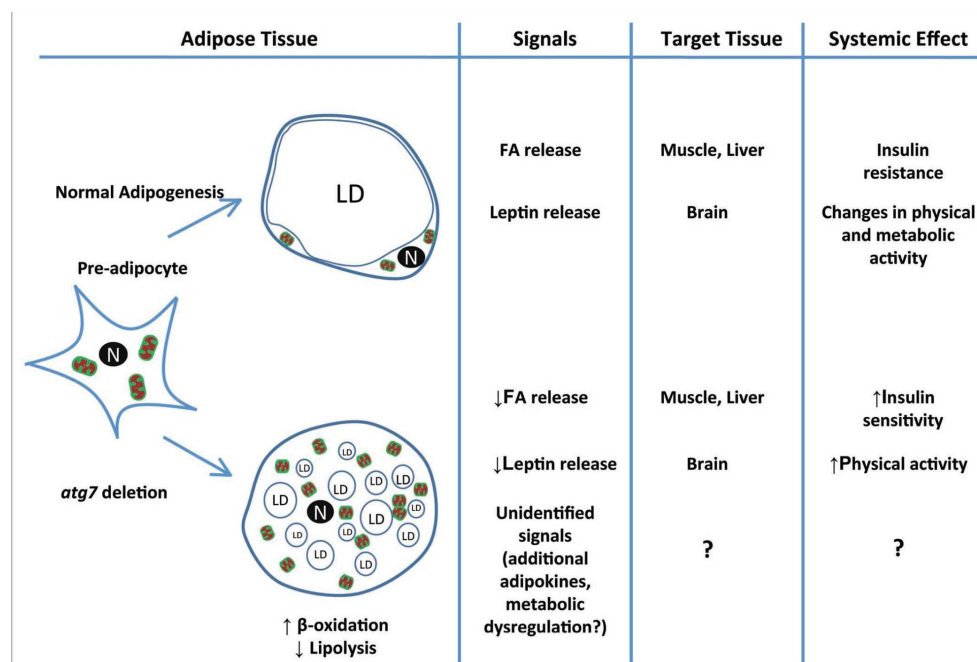
Λιποφαγία στο λιπώδη ιστό, Παχυσαρκία

Ο ρόλος της αυτοφαγίας στο λιπώδη ιστό αναδείχθηκε στις έρευνες των Singh et.al 2009 (70) και Zhang et.al 2009 (71) και είναι διαφορετικός από αυτόν της κινητοποίησης των λιπιδίων. Η αυτοφαγία όπως αποδείχτηκε στις έρευνες αυτές ρυθμίζει την ανάπτυξη του λιπώδους ιστού και είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων.

Η αναστολή της αυτοφαγίας στο λιπώδη ιστό είχε αποτέλεσμα τη μείωση της μάζας του λιπώδους ιστού και του λιπιδικού περιεχομένου των λιποκυττάρων (70,71,62). Η αναστολή της αυτοφαγίας σε καλλιέργεια προ-λιποκυττάρων είχε αποτέλεσμα τη μη διαφοροποίησή τους σε

ώριμα λιποκύτταρα (70). Τα ποντίκια που δημιουργήθηκαν με την αναστολή της αυτοφαγίας στο λιπώδη ιστό είχαν μειωμένο σωματικό βάρος και εντυπωσιακά μικρότερη μάζα λευκού λιπώδους ιστού (70,71). Οι Zhang et.al αναφέρουν ότι τα μεταλλαγμένα ποντίκια είχαν μόλις το 20% της μάζας του λευκού λιπώδους ιστού σε σχέση με τα άγριου τύπου ποντίκια (71), ενώ σύμφωνα με τους Singh et.al όταν τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν σε δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος ο λευκός λιπώδης ιστός ήταν έως και 45% μικρότερος στα μεταλλαγμένα ποντίκια (70).

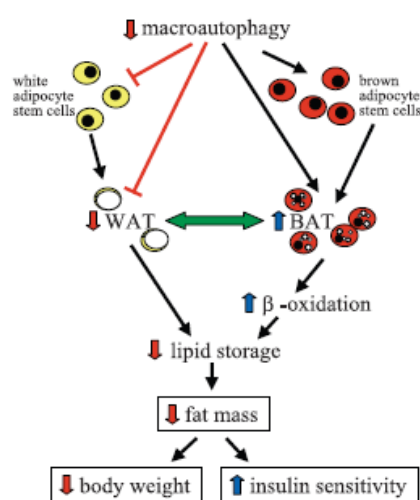
Επιπλέον η αναστολή της αυτοφαγίας είχε αποτέλεσμα την ανάπτυξη χαρακτηριστικών φαιού λιπώδους ιστού στο λευκό λιπώδη ιστό (70,71). Έτσι τα κύτταρα του λευκού λιπώδους ιστού είχαν πολλά και μικρά LD, σφαιρικό πυρήνα και μεγαλύτερο όγκο κυτταροπλάσματος καθώς και αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνών χαρακτηριστικών του φαιού λιπώδους ιστού όπως η θερμογενίνη (UCP-1, uncoupling protein-1) και η PGC-1α (PPAR-γ transcriptional coactivator) (62,70,71). Αποτέλεσμα των χαρακτηριστικών αυτών είναι η αύξηση των ρυθμών της β-οξείδωσης, αλλά και μείωση της ικανότητας του ούτως ή άλλως συρρικνωμένου, λευκού λιπώδους ιστού να αποθηκεύει λιπίδια (62,70,71). Η αύξηση των ρυθμών β-οξείδωσης στο λιπώδη ιστό φαίνεται να αποτρέπει τη συσσώρευση λιπιδίων σε όργανα όπως το ήπαρ και η καρδιά που θα ήταν φυσική συνέπεια της μειωμένης αποθηκευτικής ικανότητας του λευκού λιπώδους ιστού (66). Σε αυτό ίσως συμβάλλει και μια αύξηση του φαιού λιπώδους ιστού (71).



Εικόνα 55. Οι επιδράσεις της αναστολής της αυτοφαγίας στο λιπώδη ιστό. Πηγή: (101)

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η αυτοφαγία επιδρά στη διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων δεν είναι διευκρινισμένοι. Είναι πιθανό η αυτοφαγία να επιδρά σε πρωτεΐνες και μεταγραφικούς παράγοντες που καθορίζουν τη διαφοροποίηση (62). Είναι επίσης πιθανό τα λευκά λιποκύτταρα να μετατρέπονται σε φαιά ή και αντίστροφα μέσω διαδικασιών κυτταρικής αναδόμησης, πχ απομάκρυνση μιτοχονδρίων, που μεσολαβούνται από την αυτοφαγία (66).

Η αναστολή της αυτοφαγίας στο λιπώδη ιστό είχε επίσης αποτέλεσμα τη βελτίωση της ινσουλινοαντοχής (70,71) καθώς και μειωμένα επίπεδα τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης πλάσματος (71). Τα μεταλλαγμένα ποντίκια έδειξαν επίσης αυξημένα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας, και παρόλο που υποβλήθηκαν σε υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος δίαιτα δεν ανέπτυξαν παχυσαρκία (71).

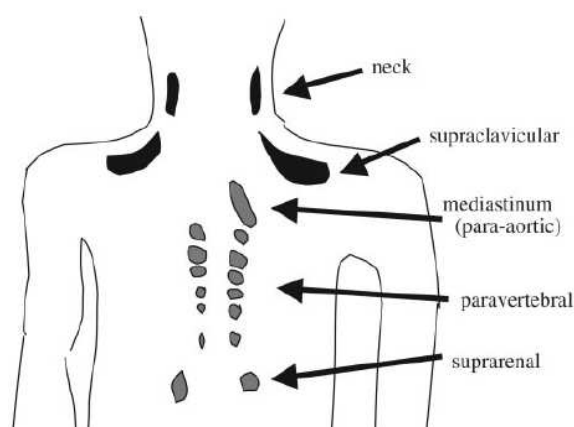


Εικόνα 56. Η αναστολή της αυτοφαγίας στο λιπώδη ιστό έχει αποτέλεσμα την ατελή διαφοροποίηση λευκών λιποκυττάρων, τη μειωμένη μάζα λευκού λιπώδους ιστού και πιθανόν τη μετατροπή των λευκών σε φαιά λιποκύτταρα. Αυτό οδηγεί σε μείωση της συνολικής λιπώδους μάζας και της αποθηκευτικής της ικανότητας με αποτέλεσμα το μειωμένο σωματικό βάρος, αλλά και τη βελτιωμένη απόκριση στην ινσουλίνη. Πηγή: (66)

Η επίδραση της αυτοφαγίας στη διαφοροποίηση των κυττάρων εξάλλου μπορεί να μην περιορίζεται στο λιπώδη ιστό, αλλά να είναι μια γενική λειτουργία της αυτοφαγίας. Έτσι ίσως να ερμηνεύεται η μείωση της βιογένεσης LD ήπαρ (100) που παρατηρήθηκε με την αναστολή της αυτοφαγίας (62,65,66).

Η αναστολή της αυτοφαγίας στο λιπώδη ιστό φαίνεται λοιπόν να οδηγεί σε έναν επιθυμητό φαινότυπο με μειωμένο σωματικό βάρος και λευκό λιπώδη ιστό, αύξηση της ενεργειακής δαπάνης στο λευκό λιπώδη ιστό λόγω των χαρακτηριστικών του, αλλά και του ίδιου του φαιού λιπώδους ιστού, βελτίωση της ινσουλινοαντοχής και των επιπέδων τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης πλάσματος (70,71).

Ο φαινότυπος της αναστολής της αυτοφαγίας στο λιπώδη ιστό μοιάζει πολύ ελκυστικός για την εφαρμογή του σε θεραπείες αντιμετώπισης της παχυσαρκίας. Θεωρητικά η επίδραση που έχει η αυτοφαγία στη διαφοροποίηση του λιπώδους ιστού θα μπορούσε να βελτιώσει πολλούς δείκτες υγείας. Η κύρια λειτουργία του λευκού λιπώδους ιστού είναι η αποθήκευση τριγλυκεριδίων σε μεγάλα LD που διασπώνται για την παραγωγή ενέργειας σε περιόδους έλλειψης θρεπτικών συστατικών. Ο φαιός λιπώδης ιστός αντίθετα έχει «θερμογεννητικό» ρόλο: διαθέτει πολλά μιτοχόνδρια όπου τα λιπαρά οξέα ακολουθούν τη β-οξείδωση με σκοπό την παραγωγή θερμότητας (66). Η αντίληψη ότι στον άνθρωπο τα φαιά λιποκύτταρα χάνονται μετά τη γέννηση φαίνεται να ανατρέπεται με έρευνες των τελευταίων ετών (72,73) που αποδεικνύουν την παρουσία λειτουργικού φαιού λιπώδους ιστού.



Εικόνα 57. Έρευνες των τελευταίων ετών με χρήση τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων (PET), βιοχημικές και μορφολογικές αναλύσεις δείχνουν την παρουσία μεταβολικά ενεργού φαιού λιπώδους ιστού στο άνω μέρος του σώματος (72,73). Πηγή: (72)

Τα αποτελέσματα των παραπάνω ερευνών, το γεγονός δηλαδή ότι η αναστολή της αυτοφαγίας στο λιπώδη ιστό έχει αποτέλεσμα τη μείωση της μάζας του λιπώδους ιστού και ένα φαινότυπο μειωμένου συνολικού λίπους και σωματικού βάρους, οδήγησαν στην υπόθεση ότι κατά την παχυσαρκία η αυτοφαγία στο λιπώδη ιστό είναι αυξημένη. Πράγματι η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε σε δείγματα ανθρώπινου λιπώδους ιστού. Οι Kovsan et al εξετάζοντας δείγματα λιπώδους ιστού παχύσαρκων ανθρώπων βρήκαν ότι η αυτοφαγία είναι πράγματι αυξημένη στο λιπώδη ιστό των παχύσαρκων ανθρώπων και μάλιστα η αύξηση αυτή είναι σε αναλογία με το βαθμό παχυσαρκίας (126). Η αύξηση της αυτοφαγίας ήταν πιο έκδηλη στο σπλαχνικό λίπος παρά στο υποδόριο και ιδιαίτερα σε σπλαχνικό λίπος που συσσωρεύεται στην κοιλιακή χώρα. Επιπλέον η αυτοφαγία ήταν περισσότερο αυξημένη σε παχύσαρκους ασθενείς που είχαν αναπτύξει ινσουλινοαντοχή, αν και δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ παχύσαρκων ατόμων με διαβήτη και παχύσαρκων ατόμων που δεν είχαν αναπτύξει διαβήτη. Η έρευνα αυτή δεν αποδίδει αιτιώδεις σχέσεις μεταξύ αυτοφαγίας και παχυσαρκίας, δηλαδή δεν αποδεικνύει ότι

η αύξηση της αυτοφαγίας ευθύνεται για την ανάπτυξη της παχυσαρκίας και των επιπλοκών της. Δείχνει όμως ότι η αυτοφαγία είναι όντως αυξημένη στο λιπώδη ιστό παχύσαρκων ατόμων και ιδιαίτερα στο σπλαχνικό λίπος που συσσωρεύεται στην κοιλιακή χώρα. Οι ρυθμοί της αυτοφαγίας μάλιστα αυξάνονται σε αναλογία με το βαθμό της παχυσαρκίας, την κατανομή του λίπους και την υπερτροφία των λιποκυττάρων. Επιπλέον η έρευνα έδειξε ότι η αυτοφαγία είναι περισσότερο αυξημένη σε παχύσαρκους ασθενείς που έχουν αναπτύξει ινσουλινοαντοχή και οι δύο αυτοί παράγοντες αν και συσχετίζονται μάλλον συμβάλλουν ο καθένας ανεξάρτητα από τον άλλο στην ανάπτυξη ασθενειών που σχετίζονται με την παχυσαρκία, όπως ο διαβήτης τύπου II (126).

Δυστυχώς λοιπόν η αναστολή της αυτοφαγίας στο λιπώδη ιστό θα μπορούσε να αξιοποιηθεί στην αντιμετώπιση της παχυσαρκίας. Η εφαρμογή ωστόσο μιας τέτοιας μεθόδου απαιτεί ακόμα μεγάλη έρευνα καθώς οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η αυτοφαγία επιδρά στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων (και γενικά διάφορων τύπων κυττάρων) δεν είναι ακόμα γνωστοί (66). Σημαντικότερο βέβαια είναι το γεγονός ότι τα ποντίκια που δημιουργήθηκαν με την αναστολή της αυτοφαγίας ήταν στείρα και δεν έδωσαν απογόνους (71) ενώ παρουσίασαν αυξημένη θνητότητα (70).

Ρύθμιση της αυτοφαγίας από τα λιπίδια

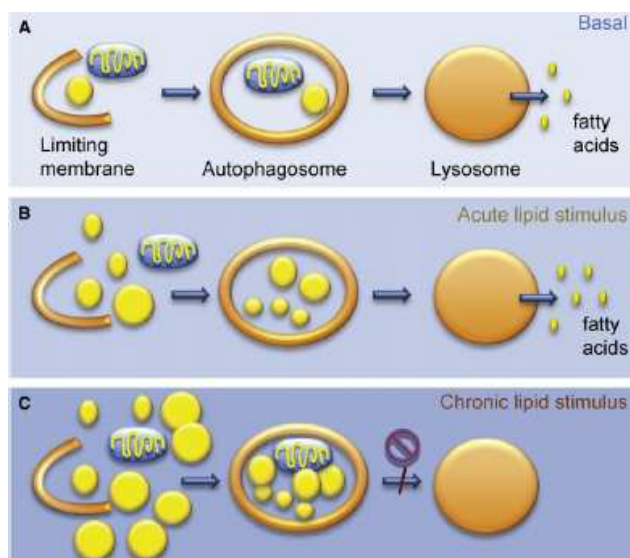
Η σχέση λιπιδίων και αυτοφαγίας είναι αμφίδρομη. Δηλαδή η λιποφαγία, η και γενικότερα η αυτοφαγία, ρυθμίζει το μεταβολισμό των λιπιδίων, αλλά ταυτόχρονα η ποσότητα και το είδος των λιπιδίων ρυθμίζουν την αυτοφαγία (36,62,66).

Όπως αναφέρεται στην προηγούμενη ενότητα της λιποφαγίας στο ήπαρ ποντίκια που ακολούθησαν δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος για μεγάλο χρονικό διάστημα δεν αύξησαν την αυτοφαγία υπό την επίδραση ερεθισμάτων που αύξησαν την αυτοφαγία σε ποντίκια που ακολούθησαν κανονική δίαιτα (69). Η υψηλή σε λίπος δίαιτα αύξησε το λιπιδικό περιεχόμενο των ηπατοκυττάρων γεγονός που φαίνεται να έχει ανασταλτική δράση στην αυτοφαγία (66,68,69). Το μεγάλο λιπιδικό περιεχόμενο εμποδίζει τη σύντηξη του αυτοφαγοσώματος με το λυσόσωμα, κάτι που αρχικά αντιμετωπίζεται σε κάποιο βαθμό με τη σύντηξη του αυτοφαγοσώματος με ενδόσωμα (68). Έτσι πειραματόζωα που έχουν υψηλό λιπιδικό περιεχόμενο στα ηπατοκύτταρα λόγω μακροχρόνιας δίαιτας υψηλής σε λίπος μπορεί αρχικά να εμφανίσουν μια αύξηση στην αυτοφαγία, αλλά προοδευτικά οι ρυθμοί της αυτοφαγίας μειώνονται (62,68). Συνολικά επομένως η μακροχρόνια δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος αυξάνει το λιπιδικό περιεχόμενο των κυττάρων και αυτό οδηγεί σε μείωση της λιποφαγίας και

γενικότερα της αυτοφαγίας (62,66). Η ελάττωση της αυτοφαγίας στις συνθήκες αυτές οδηγεί σε μείωση του καταβολισμού των LD και στην περαιτέρω συσσώρευσή τους με αποτέλεσμα την ανάπτυξη παθολογικών καταστάσεων όπως ηπατοτοξικότητα και στεάτωση (62).

Στην έρευνα των Singh et.al 2009 όπου αποδείχτηκε η ύπαρξη της λιποφαγίας αποδείχτηκε ότι η έκθεση των ηπατοκυττάρων σε μεγάλη ποσότητα λιπαρών οξέων (ελαϊκό) αυξάνει την αυτοφαγία (69). Η ικανότητα των ελεύθερων λιπαρών οξέων να αυξάνουν την αυτοφαγία αποδείχτηκε και σε άλλα κύτταρα όπως σε νευρώνες, μυικά κύτταρα, κύτταρα του παγκρέατος, μαστικά επιθηλιακά κύτταρα και σε καρκινικά κύτταρα του κόλον, αν και ο μηχανισμός επαγωγής της αυτοφαγίας από τα λιπαρά οξέα δεν έχει διευκρινιστεί (62).

Το παρακάτω σχήμα λοιπόν που αποδίδει τη σχέση λιπιδίων-αυτοφαγίας ίσως έχει ισχύ και σε άλλους τύπους κυττάρων εκτός από τα ηπατοκύτταρα.



Εικόνα 58. Πηγή: (36)

Σε κανονικές συνθήκες (A) ένας αριθμός LD καταβόλίζεται στο λυσόσωμα στα πλαίσια των βασικών επιπέδων αυτοφαγίας, μαζί με άλλα οργάνδια από το κυτοσόλιο, όπως μιτοχόνδρια. Κατά την έκθεση σε μεγάλη ποσότητα λιπαρών οξέων (B) ο αυτοφαγικός καταβολισμός των LD αυξάνεται και ως φορτίο των αυτοφαγοσωμάτων επικρατούν τα LD. Η αύξηση του λιπιδικού περιεχομένου του κυττάρου (C) που είναι συνέπεια πχ μακροχρόνιας δίαιτας υψηλής σε λίπος η σύντηξη του αυτοφαγοσώματος με το λυσόσωμα αναστέλλεται με αποτέλεσμα τη μείωση της αυτοφαγίας (36,62).

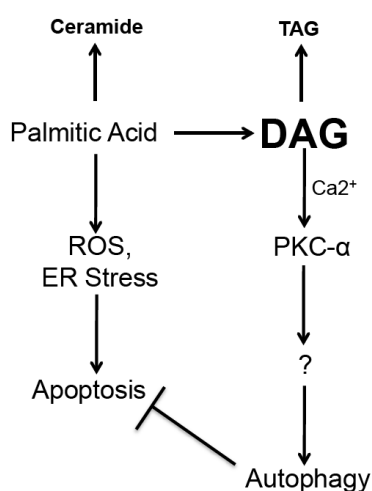
Ωστόσο άλλες έρευνες αναφέρουν ότι κορεσμένα λιπαρά οξέα, όπως το παλμιτικό, αναστέλλουν την αυτοφαγία (62,98). Είναι πιθανό λοιπόν τα διαφορετικά είδη λιπαρών οξέων να ρυθμίζουν διαφορετικά την αυτοφαγία (62,98). Σύμφωνα με τους Mei et.al τα ακόρεστα λιπαρά οξέα (ελαϊκό) προάγουν την αυτοφαγία, ενώ τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (παλμιτικό) αναστέλλουν την αυτοφαγία και προάγουν την απόπτωση. Η ανασταλτική δράση του παλμιτικού στην αυτοφαγία αποδίδεται στη μικρή ενσωμάτωσή του στα LD, ενώ η προαγωγή της αυτοφαγίας από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελεί έναν προστατευτικό μηχανισμό έναντι της λιποτοξικότητας των FFA (98). Αναδεικνύουν επίσης τη συσχέτιση της αυτοφαγίας με την ανάπτυξη λιπώδους ήπατος κατά την παχυσαρκία και τη δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος (98).

Σε πιο πρόσφατη έρευνα (74) αποδεικνύεται *in vitro* ότι το παλμιτικό αυξάνει την αυτοφαγία σε ανθρώπινα κύτταρα παγκρέατος. Στην έρευνα αυτή β-παγκρεατικά κύτταρα εκθέτονται σε υψηλές συγκεντρώσεις παλμιτικού και γλυκόζης σε μια προσομοίωση των μεταβολικών αλλαγών που συμβαίνουν στο σακχαρώδη διαβήτη II. Ως ελεύθερο λιπαρό οξύ επιλέχτηκε το παλμιτικό γιατί είναι γνωστό ότι προκαλεί στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER stress). Βρέθηκε ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις παλμιτικού ενεργοποιούν την αυτοφαγία στα παγκρεατικά κύτταρα, αλλά η γλυκόζη όχι. Η αύξηση της αυτοφαγίας προστατεύει το κύτταρο από τη λιποτοξικότητα που προκαλεί το παλμιτικό και ίσως μεσολαβείται από το ER stress που προκαλεί το παλμιτικό (74). Οι ίδιοι ερευνητές επισημαίνουν ότι υπάρχουν και αντίθετες αναφορές σχετικά με τη δράση των λιπαρών οξέων στην αυτοφαγία, ενώ δεν αποκλείουν το ενδεχόμενο να υπάρχει μια ελάττωση της σύντηξης των αυτοφαγοσωμάτων με το λυσόσωμα (74).

Στα πλαίσια της έρευνας για την επίδραση της αυτοφαγίας στη λειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος οι Las et.al αναφέρουν ότι η χρόνια έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις λιπαρών οξέων και γλυκόζης μπλοκάρουν την αυτοφαγία στα κύτταρα αυτά και μάλιστα τα λιπαρά οξέα και η γλυκόζη δρουν συνεργιστικά. Η αναστολή της αυτοφαγίας και η ταυτόχρονη μείωση της έκκρισης ινσουλίνης που προκαλούνται από τη μακροχρόνια λήψη υπερβολικής ποσότητας θρεπτικών συστατικών οδηγούν σε δυσλειτουργία των β-κυττάρων, παχυσαρκία και διαβήτη (93).

Οι Tan et.al τέλος σε πρόσφατη έρευνα απέδειξαν σε MEFs (mouse embryonic cells) και ηπατοκύτταρα (HepG2) ότι το παλμιτικό προάγει την αυτοφαγία, ενώ το ελαϊκό όχι. Προτείνουν μάλιστα ότι η επαγωγή της αυτοφαγίας γίνεται με μια οδό μεταγωγής μηνυμάτων που είναι ανεξάρτητη από την mTOR και μεσολαβείται από την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) η οποία ενεργοποιείται από τη διακυλογλυκερόλη (DAG) με την οποία εστεροποιούνται τα ελεύθερα

λιπαρά οξέα για την αποθήκευσή τους. Η νέα αυτή εναλλακτική οδός ίσως ερμηνεύει την αύξηση της αυτοφαγίας σε διάφορα κύτταρα (κυρίως ηπατοκύτταρα) υπό την επίδραση της μεγάλης συγκέντρωσης λιπαρών οξέων, καθώς είναι γνωστό ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις FFA ενεργοποιούν την mTOR. Οι Tan et.al αναγνωρίζουν την αυτοφαγία ως έναν κυτταροπροστατευτικό μηχανισμό έναντι της λιποτοξικότητας των ελεύθερων λιπαρών οξέων και ως απαραίτητη διαδικασία για την επιβίωση των κυττάρων σε στρεσογόνες συνθήκες (75). Στο παρακάτω διάγραμμα αποδίδεται ο μηχανισμός που προτείνεται από τους Tan et.al για την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας από το παλμιτικό οξύ.



Εικόνα 59. Πηγή: (75)

Υπάρχουν επομένως κάποιες αντικρουόμενες αναφορές σχετικά με την επίδραση των λιπιδίων στην αυτοφαγία, ιδιαίτερα όσο αφορά την ικανότητα των πιο συνηθισμένων ίσως λιπαρών οξέων της διατροφής, του παλμιτικού και του ελαϊκού, να προάγουν την αυτοφαγία. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι οι έρευνες έχουν γίνει σε διάφορους τύπους κυττάρων. Τα λιπίδια ίσως έχουν διαφορετική επίδραση στην αυτοφαγία στους διάφορους τύπους κυττάρων (62,75).

Για παράδειγμα στα κύτταρα του παγκρέατος τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (παλμιτικό) είναι τοξικά και προκαλούν την απόπτωση, ενώ τα μονοακόρεστα (παλμιτελαϊκό) ανατρέπουν τις τοξικές δράσεις των κορεσμένων λιπαρών οξέων (76). Είναι λοιπόν πιθανό στα κύτταρα του παγκρέατος η αυτοφαγία να ενεργοποιείται ως προστατευτικός μηχανισμός έναντι της τοξικότητας των κορεσμένων λιπαρών οξέων. Επιπλέον τα διαφορετικά αποτελέσματα ίσως προκύπτουν από μεθοδολογικές διαφορές, πχ in vitro ή in vivo έρευνες, διαφορετικές συγκεντρώσεις ή χρόνος έκθεσης στα λιπαρά οξέα κα (75).

Τα επίπεδα χοληστερόλης του κυττάρου τέλος επιδρούν στην αυτοφαγία. Η εξάλειψη της χοληστερόλης φαίνεται ότι αυξάνει το σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων σε διάφορους τύπους κυττάρων, αν και ίσως η σύντηξη με το λυσόσωμα να είναι προβληματική (66,96). Η

υπερχοληστερολαιμία έχει αναφερθεί επίσης ότι αναστέλλει την αυτοφαγία μέσω της επίδρασής της στην mTOR (66). Η μεγάλη συγκέντρωση ελεύθερης χοληστερόλης σε κύτταρα λείου μυός είχε επίσης αποτέλεσμα την επαγωγή της αυτοφαγίας ως κυτταροπροστατευτικού μηχανισμού (77). Έτσι η αυτοφαγία ίσως είναι ένας μηχανισμός προστασίας έναντι των αθηρωματικών πλακών που σχηματίζονται στα αγγεία (77).

Λιποφαγία στον υποθάλαμο – Έλεγχος λήψης τροφής

Ο εγκέφαλος γενικά προστατεύεται από την αυτοφαγία καθώς σε περιόδους νηστείας τροφοδοτείται με γλυκόζη και κετονικά σώματα που παράγονται στο ήπαρ και περιφερικούς ιστούς (57,58). Όπως είχε βρεθεί και πειραματικά, το ερέθισμα της έλλειψης θρεπτικών συστατικών δεν προάγει την αυτοφαγία στον εγκέφαλο ακόμα και σε 48ωρη νηστεία (57). Πρόσφατα όμως βρέθηκε ότι η αυτοφαγία είναι ενεργή σε νευρώνες του υποθαλάμου και μάλιστα συμμετέχει στο μηχανισμό που ρυθμίζει την πρόσληψη τροφής και το συνολικό ενεργειακό ισοζύγιο (62,78,97). Κατά την έλλειψη θρεπτικών συστατικών λοιπόν στους υποθαλαμικούς ορεξιογόνους AgRP (Agouti-related peptide) νευρώνες ενεργοποιείται η λιποφαγία με αποτέλεσμα την παραγωγή FFA τα οποία διεγείρουν και πυροδοτούν τους AgRP νευρώνες, η δράση των οποίων οδηγεί στη λήψη τροφής (62,78,97). Η αναστολή της λιποφαγίας στους AgRP νευρώνες μείωσε τη δράση τους και οδήγησε σε ελάττωση της πρόσληψης τροφής (97). Επιπλέον η αναστολή της λιποφαγίας στους AgRP νευρώνες αύξησε τα επίπεδα του ανορεξιογόνου προοπιομελανοκορτίνη και οδήγησε σε ελάττωση της λήψης τροφής και των αποθεμάτων λίπους στο σώμα (97).

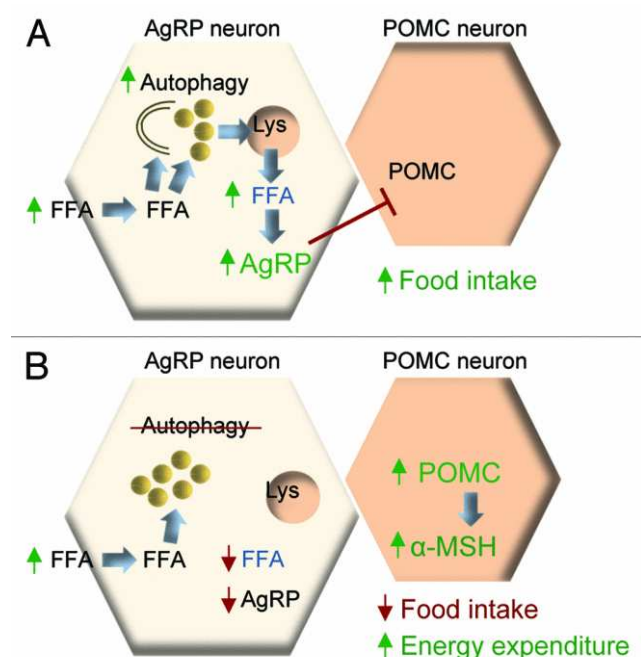
Στο μεσοβασικό υποθάλαμο (MBH) υπάρχει ένα δίκτυο νευρώνων που έχει κεντρικό ρόλο στον έλεγχο της λήψης τροφής και του ενεργειακού ισοζυγίου (62,97). Αυτό το νευρικό δίκτυο αποτελείται από τους AgRP (Agouti-related peptide) και τους POMC (proopiomelanocortin) νευρώνες οι οποίοι έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν τις ανά λεπτό μεταβολές των θρεπτικών συστατικών και ορμονών στην κυκλοφορία. Οι AgRP νευρώνες απελευθερώνουν AgRP που είναι ανταγωνιστής των υποδοχέων μελανοκορτίνης (MC4R, melanocortin-4 receptors) και προάγουν τη λήψη τροφής. Οι AgRP νευρώνες επίσης αναστέλλουν τους POMC νευρώνες. Οι POMC νευρώνες απελευθερώνουν την πρόδρομη προοπιομελανοκορτίνη που μετατρέπεται σε α-ορμόνη διέγερσης μελανοκυττάρων (MSH, μελανοτρόπος ορμόνη ή μελανοτροπίνη) η οποία περιορίζει την πρόσληψη τροφής και αυξάνει την ενεργειακή δαπάνη σε περιφερικούς ιστούς (78,97).

Αυτοί οι υποθαλαμικοί νευρώνες ρυθμίζονται από θρεπτικά, ορμονικά και νευρικά ερεθίσματα, όπως η γλυκόζη, τα λιπαρά οξέα και τους μεταβολίτες τους, η ινουλίνη και (92,97). Μάλιστα πρόσφατα διατυπώθηκε ότι για τη λειτουργία αυτών των υποθαλαμικών νευρώνων είναι απαραίτητη η παρουσία FFA που με τη β-οξειδωση στα μιτοχόνδρια παρέχουν το ATP για τη διέγερση και πυροδότηση των νευρώνων αυτών (78,97). Στη ρύθμιση της λήψης τροφής και του ενεργειακού ισοζυγίου από τον υποθάλαμο έχει βρεθεί επιπλέον ότι συμμετέχουν παράγοντες οι οποίοι είναι επίσης βασικά συστατικά οδών μεταγωγής μηνυμάτων που ρυθμίζουν την αυτοφαγία, όπως mTOR, AMPK, PI3K, FoXO1 (78,97). Τα δεδομένα αυτά εύλογα οδήγησαν στη διερεύνηση της σχέσης υποθαλαμικής ρύθμισης της λήψης τροφής και αυτοφαγίας.

Οι ίδιοι ερευνητές που πρότειναν ότι η νηστεία και η έκθεση σε μεγάλη ποσότητα λιπαρών οξέων προάγει τη λιποφαγία σε κύτταρα του ήπατος (69) εξέτασαν αν το μοντέλο αυτό ισχύει και για τους υποθαλαμικούς νευρώνες. *In vitro* επιβεβαιώθηκε ότι η νηστεία αύξησε την αυτοφαγία στον MBH, ενώ παρατηρήθηκε ότι ταυτόχρονα αυξήθηκε και η πρόσληψη λιπαρών οξέων από τους νευρώνες τα οποία με την είσοδό τους στο κύτταρο εστεροποιούνται σε TG. Η αύξηση της πρόσληψης των λιπαρών οξέων θεωρήθηκε ότι ίσως αποσκοπεί στη δημιουργία του ερεθίσματος της μεγάλης συγκέντρωσης λιπαρών οξέων για την πυροδότηση της αυτοφαγίας. Πράγματι επιβεβαιώθηκε ότι η έκθεση νευρικών κυττάρων σε μεγάλη ποσότητα λιπαρών οξέων αύξησε την αυτοφαγία, ενώ βρέθηκε και αύξηση της φωσφορυλίωσης AMPK και ULK1. Είναι λοιπόν πιθανό η αυτοφαγία στους υποθαλαμικούς νευρώνες να επάγεται από την οδό μεταγωγής μηνύματος AMPK-ULK1. Η αύξηση της αυτοφαγίας στους υποθαλαμικούς νευρώνες είχε αποτέλεσμα την αύξηση των FFA στα κύτταρα, ενώ η αναστολή της αυτοφαγίας είχε αποτέλεσμα την ελάττωση των επιπέδων του ορεξιόγόνου AgRP. Τα λιπαρά οξέα που παράγονται από τη δράση της λιποφαγίας στους υποθαλαμικούς νευρώνες επομένως οδηγούν στη διέγερση και πυροδότηση των νευρώνων για την απελευθέρωση AgRP (97).

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και *in vivo* καθώς βρέθηκε ότι η αναστολή της αυτοφαγίας σε AgRP νευρώνες ελάττωσε τα επίπεδα AgRP και την πρόσληψη τροφής. Η αναστολή της αυτοφαγίας στους AgRP νευρώνες είχε επίσης αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων προοπιομελανοκορτίνης που απελευθερώνεται από τους POMC νευρώνες και της α-MSH, γεγονός που πιθανόν συνέβαλε στην ελάττωση των αποθεμάτων λίπους που παρατηρήθηκε στα πειραματόζωα (97).

Βάσει των ευρημάτων αυτών οι Singh et.al διατύπωσαν ένα μοντέλο για το ρόλο της αυτοφαγίας στη ρύθμιση της λήψης τροφής από τον υποθάλαμο που αποδίδεται στο σχήμα.



Εικόνα 60. Πηγή: (97)

Κατά τη νηστεία (A) αυξάνεται η πρόσληψη FFA από τους υποθαλαμικούς νευρώνες τα οποία πυροδοτούν την αυτοφαγία. Τα FFA με την είσοδο τους στα νευρικά κύτταρα εστεροποιούνται σε TG τα οποία ενσωματώνονται σε LD. Τα LD καταβολίζονται μέσω της αυτοφαγίας για την παραγωγή FFA τα οποία συμβάλλουν στη διέγερση και πυροδότηση των AgRP νευρώνων με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων AgRP και της λήψης τροφής.

Η αναστολή της αυτοφαγίας στους AgRP νευρώνες σε συνθήκες νηστείας (B) μειώνει τα επίπεδα FFA στα κύτταρα γιατί παραμένουν αποθηκευμένα ως TG στα LD, με αποτέλεσμα την ελάττωση της δράσης των AgRP νευρώνων και παράλληλα την αύξηση της δράσης των POMC που οδηγούν σε ελάττωση της λήψης τροφής και την αύξηση της ενεργειακής δαπάνης σε περιφερικούς ιστούς (97).

Ωστόσο οι Meng και Cai (91) αναφέρουν μια αντίθετη επίδραση της αυτοφαγίας στον υποθάλαμο. Οι Meng και Cai πραγματοποιώντας πειράματα σε ποντίκια βρήκαν ότι η αυτοφαγία έχει υψηλή δραστηριότητα στον υποθάλαμο, αλλά η αναστολή της οδηγεί σε αύξηση της λήψης τροφής και μείωση της ενεργειακής δαπάνης με αποτέλεσμα την πρόσληψη σωματικού βάρους ακόμα και με ισορροπημένη διατροφή. Η διατροφή μεγάλης περιεκτικότητας σε λίπος στα ποντίκια αυτά οδήγησε στην ανάπτυξη παχυσαρκίας και αντίστασης στην

ινσουλίνη. Τα αποτελέσματα της αναστολής της αυτοφαγίας στον υποθάλαμο αποδίδονται στην ανάπτυξη φλεγμονής που μεσολαβείται από την προφλεγμονώδη IκB κινάση β. Οι ερευνητές συμπεραίνουν ότι η μείωση της αυτοφαγίας στον υποθάλαμο από τη χρόνια πρόσληψη δίαιτας υψηλών θερμίδων οδηγεί σε φλεγμονή στον υποθάλαμο που έχει αποτέλεσμα στην απορρύθμιση του ενεργειακού ισοζυγίου και την ανάπτυξη παχυσαρκίας (91).

Τα αποτελέσματα των δύο ερευνών είναι αντιφατικά αφού οι Singh et.al βρήκαν ότι η αναστολή της αυτοφαγίας οδηγεί σε μείωση της πρόσληψης τροφής και αύξηση της ενεργειακής δαπάνης, ενώ οι Meng και Cai βρήκαν ότι η αναστολή της αυτοφαγίας στον υποθάλαμο προκαλεί την αύξηση της πρόσληψης τροφής και την ανάπτυξη ινσουλινοαντοχής. Σύμφωνα με την Singh τα διαφορετικά ευρήματα μπορεί να οφείλονται και σε μεθοδολογικές διαφορές, καθώς στην έρευνα των Meng και Cai δεν έγινε εκλεκτική αναστολή της αυτοφαγίας στους AgRP νευρώνες, αλλά συνολικά στον υποθάλαμο. Έτσι ίσως η συνολική αναστολή της αυτοφαγίας στον υποθάλαμο επηρέασε και άλλα κύτταρα, πχ νευρογλοιακά κύτταρα τα οποία επίσης επιδρούν στη ρύθμιση του ενεργειακού ισοζυγίου (97).

Η αυτοφαγία φαίνεται επίσης ότι έχει ρόλο στην ωρίμανση των POMC νευρώνων. Η αυτοφαγία αποδείχτηκε ότι είναι σημαντική για την κανονική ανάπτυξη των αξόνων στους POMC νευρώνες, ενώ η απουσία της αυτοφαγίας στους νευρώνες αυτούς προκαλεί μεταβολικές διαταραχές. In vivo η αναστολή της αυτοφαγίας στους POMC νευρώνες δημιούργησε ποντίκια με αυξημένο σωματικό βάρος και αποθέματα λίπους που παρουσίασαν αντίσταση στην ινσουλίνη (79).

4.5 Αυτοφαγία και μεταβολισμός υδατανθράκων

Αυτοφαγία γλυκογόνου

Η αυτοφαγία του γλυκογόνου είναι σημαντική για την παροχή θρεπτικών συστατικών και την ομοιόσταση της γλυκόζης στο νεογέννητο, κατά την περίοδο από τον τοκετό όταν παύει η παροχή θρεπτικών συστατικών από τον πλακούντα, μέχρι το θηλασμό (51,94). Σε αυτή τη χρονική περίοδο η γλυκαγόνη και η αδρεναλίνη πυροδοτούν την αυτοφαγία σε ήπαρ, καρδιά και μυς και το γλυκογόνο καταβολίζεται στα λυσοσώματα προς παραγωγή ελεύθερης γλυκόζης με τη δράση της α-γλυκοσιδάσης (94). Το γεγονός ότι με τον αυτοφαγικό καταβολισμό του γλυκογόνου παράγεται γλυκόζη στη μη φωσφορυλιωμένη της μορφή ίσως έχει ιδιαίτερη σημασία για το νεογνό καθώς κατά τη γέννηση η φωσφατάση της 6-φωσφογλυκόζης μάλλον δεν είναι πλήρως ενεργοποιημένη με αποτέλεσμα η γλυκόζη που παράγεται από τον καταβολισμό του γλυκογόνου στο κυτοσόλιο να μην είναι πλήρως αξιοποιήσιμη (51,94).

Η αυτοφαγία του γλυκογόνου ίσως είναι μια εκλεκτική διαδικασία, αλλά ίσως και να γίνεται στα πλαίσια της μαζικής μη εκλεκτικής αυτοφαγίας. Και στην περίπτωση αυτή ωστόσο η συμβολή της αυτοφαγίας στην παραγωγή γλυκόζης από το γλυκογόνο είναι σημαντική δεδομένου ότι κατά τη γέννηση υπάρχουν αποθηκευμένα μεγάλα ποσά γλυκογόνου στο ήπαρ και τους μυς (51).

Στην ενήλικη ζωή η αυτοφαγία του γλυκογόνου δεν φαίνεται να έχει κάποιο ρόλο, αν και ίσως εξελίσσεται μέσω της μικροαυτοφαγίας με την απευθείας εγκόλπωση γλυκογόνου στην επιφάνεια των λυσοσωμάτων (36,51). Η μη φυσιολογική λειτουργία της αυτοφαγίας του γλυκογόνου όμως αποτελεί την αιτιολογική βάση μιας σειράς μυικών διαταραχών που συνολικά ονομάζονται *autophagic vacuolar myopathies* και περιλαμβάνουν ασθένειες όπως τη νόσο Danon, Pompe κα (36).

Όπως περιγράφεται στην ενότητα της ρύθμισης της αυτοφαγίας η γλυκόζη ρυθμίζει την αυτοφαγία μέσω ποικίλων οδών μεταγωγής μηνυμάτων που κατά κύριο λόγο συγκλίνουν στο mTORC1. Και η αυτοφαγία όμως ρυθμίζει το μεταβολισμό της γλυκόζης έμμεσα, μέσω της επίδρασής της στα β-κύτταρα του παγκρέατος.

Αυτοφαγία στα β-κύτταρα του παγκρέατος, επίδραση στην ινσουλίνη

Τα β-κύτταρα είναι τα κύτταρα του παγκρέατος που παράγουν την ινσουλίνη η οποία ευθύνεται για την ομοιοστάση της γλυκόζης σε ολόκληρο τον οργανισμό. Η αυτοφαγία είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της δομής και της λειτουργίας των β-κυττάρων, ενώ δυσλειτουργία της αυτοφαγίας οδηγεί σε διαταραχές της έκκρισης ινσουλίνης και απορύθμιση της ομοιοστάσης της γλυκόζης (80).

Η αυτοφαγία στα β-κύτταρα σε κανονικές συνθήκες διεξάγεται όπως και στα περισσότερα κύτταρα σε ένα βασικό επίπεδο (76,81). Το ερέθισμα της νηστείας ωστόσο δεν αυξάνει τους ρυθμούς της αυτοφαγίας στα β-κύτταρα. Φαίνεται λοιπόν ότι τα νησίδια του παγκρέατος προστατεύονται από την αυτοφαγία σε συνθήκες νηστείας, όπως συμβαίνει και στον εγκέφαλο όπου δεν παρατηρείται αύξηση της αυτοφαγίας ακόμα και σε 48ωρη νηστεία (81).

Η διεξαγωγή της αυτοφαγίας σε βασικά επίπεδα είναι απαραίτητη για τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα των β-κυττάρων. Η αναστολή της αυτοφαγίας έχει αποτέλεσμα αυξημένους ρυθμούς απόπτωσης και τον προοδευτικό εκφυλισμό των β-κυττάρων τα οποία παρουσιάζουν διογκωμένα μιτοχόνδρια, κατεστραμμένα τμήματα του ER και της συσκευής

Golgi καθώς και συσσωματώματα ουβικουινομένων πρωτεϊνών (76,81,82). Οι ουβικουινομένες πρωτεΐνες προορίζονται για αποδόμηση στο πρωτεόσωμα. Το γεγονός ότι με την αναστολή της αυτοφαγίας παρατηρείται συσσώρευσή τους στο κυτοσόλιο σημαίνει ότι το σύστημα του πρωτεοσώματος συνεπικουρείται από την αυτοφαγία (76,81). Η αναστολή της αυτοφαγίας προκάλεσε επίσης την ελάττωση του πολλαπλασιασμού των β-κυττάρων με αποτέλεσμα τη μείωση της μάζας των β-κυττάρων στο πάγκρεας και την ελάττωση της έκκρισης ινσουλίνης (83). Ο φαινότυπος της αναστολής της αυτοφαγίας στα β-κύτταρα είναι η ανάπτυξη υποϊνσουλιναιμίας και υπεργλυκαιμίας (83). Η αυτοφαγία λοιπόν είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της δομής, της μάζας και της λειτουργίας των β-κυττάρων (76,81,83).

Η λειτουργία της αυτοφαγίας συμβάλλει επίσης στη διατήρηση των επιπέδων ινσουλίνης στα β-κύτταρα (76,81,84). Η ινσουλίνη συνθέτεται στο ER των β-κυττάρων ως προϊνσουλίνη και συσκευάζεται σε εκκριτικά κοκκία στη συσκευή Golgi στα οποία και μετατρέπεται σε ινσουλίνη (95). Τα β-κύτταρα διατηρούν σχετικά σταθερό τον αριθμό των β-κοκκίων καθώς αυτά ανακυκλώνονται μέσω της κρινοφαγίας και της αυτοφαγίας (76,81,84). Η κρινοφαγία, δηλαδή η σύντηξη των εκκριτικών κυστιδίων με το λυσόσωμα, συχνά χαρακτηρίζεται και η ίδια ως μια μορφή εκλεκτικής αυτοφαγίας που λαμβάνει χώρα σε ενδοκρινικά κύτταρα (76,81). Η συμβολή της αυτοφαγίας στην ομοιόσταση της ινσουλίνης στα β-κύτταρα αποδείχτηκε *in vivo* σε ποντίκια στα οποία είχε ανασταλεί η εκκριτική οδός της ινσουλίνης (84). Στα ποντίκια αυτά ενώ η έκκριση ινσουλίνης μειώθηκε σημαντικά οι ρυθμοί βιοσύνθεσης προϊνσουλίνης και μετατροπής σε ινσουλίνη σε κανονικές συνθήκες και υπό το ερέθισμα της γλυκόζης δεν μεταβλήθηκαν σε σχέση με τα ποντίκια ελέγχου. Επομένως λόγω της μειωμένης έκκρισης δημιουργείται ένα πλεόνασμα ινσουλίνης. Εν τούτοις τα επίπεδα ινσουλίνης στα μεταλλαγμένα β-κύτταρα δεν αυξήθηκαν σημαντικά. Αυτό οφείλεται στην αύξηση της αποδόμησης της ινσουλίνης μέσω της κρινοφαγίας, αλλά και μέσω της αύξησης της αυτοφαγίας. Η αυτοφαγία λοιπόν ρυθμίζει τους ρυθμούς αποδόμησης της ινσουλίνης ώστε να διατηρηθεί σε σταθερά επίπεδα στα β-κύτταρα (76,81,84).

Η αυτοφαγία έχει επίσης ρόλο στην έκκριση της ινσουλίνης. Η αναστολή της αυτοφαγίας προκάλεσε την ελάττωση και της βασικής και της επαγόμενης από τη γλυκόζη έκκρισης της ινσουλίνης (83). Η δέσμευση της γλυκόζης στους μεμβρανικούς της υποδοχείς προκαλεί το άνοιγμα τασεοευαίσθητων διαύλων ασβεστίου με αποτέλεσμα την είσοδο ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο και την αύξηση της συγκέντρωσής τους στο κυτοσόλιο. Η αύξηση των ιόντων ασβεστίου αποτελεί το ερέθισμα για την εξωκυττάρωση των εκκριτικών κοκκίων ινσουλίνης

(95). Με την αναστολή της αυτοφαγίας δεν παρατηρήθηκε η αναμενόμενη αύξηση των ιόντων ασβεστίου και η έκκριση ινσουλίνης υπό το ερέθισμα της γλυκόζης ήταν μειωμένη (83).

Όπως αναφέρεται στην ενότητα της ρύθμισης της αυτοφαγίας το ER stress και το οξειδωτικό στρες προάγουν την αυτοφαγία. Η αυτοφαγία στην περίπτωση αυτή δρα ως κυτταροπροστατευτικός μηχανισμός και απομακρύνει τμήμα του ER και κατεστραμμένα μιτοχόνδρια που αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής ROS. Τα β-κύτταρα είναι επιρρεπή στο ER και στο οξειδωτικό στρες (76), ενώ η συσσώρευση των ROS φαίνεται ότι ελαττώνει την επαγόμενη από τη γλυκόζη έκκριση της ινσουλίνης (85). Μια σημαντική λειτουργία της βασικής αυτοφαγίας στα β-κύτταρα είναι η προστασία τους από τους παράγοντες αυτούς οι οποίοι είναι και χαρακτηριστικά σημεία της αντίστασης στην ινσουλίνη και του διαβήτη (81).

Φαίνεται λοιπόν ότι ένας βασικός ρυθμός αυτοφαγίας είναι απαραίτητος για τη διατήρηση της δομής, της μάζας και της λειτουργίας των β-κυττάρων. Ο ζωτικός ρόλος της αυτοφαγίας αποδεικνύεται από γεγονός ότι η αναστολή της οδηγεί σε μείωση της έκκρισης ινσουλίνης, εκφυλισμό και αύξηση της απόπτωσης των β-κυττάρων (76,81-83).

Η αυτοφαγία στην ινσουλinoαντοχή και στο διαβήτη στα β-κύτταρα

Η αυτοφαγία στα β-κύτταρα δεν αυξάνεται σε συνθήκες νηστείας, αλλά έχει βρεθεί ότι αυξάνεται με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος (FHD, high fat diet) (82) και σε db/db ποντίκια που είναι ένα μοντέλο παχυσαρκίας, διαβήτη και δυσλιπιδαιμίας (81). Κοινό σημείο της HFD και του φαινότυπου των db/db ποντικών είναι η αντίσταση στην ινσουλίνη. Επομένως η ινσουλinoαντοχή μάλλον έχει ρόλο στην ενεργοποίηση της αυτοφαγίας στα β-κύτταρα (81).

Σε συνθήκες ινσουλinoαντοχής η αυτοφαγία επάγεται ως ένας προστατευτικός μηχανισμός έναντι της απόπτωσης και απομακρύνει κατεστραμμένα μιτοχόνδρια και πρωτεΐνες από τα β-κύτταρα (76,81). Η προστατευτική δράση της αυτοφαγίας αποδείχτηκε in vivo όταν ποντίκια στα οποία είχε ανασταλεί η ικανότητα της αυτοφαγίας υποβλήθηκαν σε HFD επί 12 εβδομάδες (82). Τα β-κύτταρα των μεταλλαγμένων ποντικών παρουσίασαν σοβαρή αντίσταση στην ινσουλίνη, εκτεταμένες εκφυλιστικές μεταβολές, συσσώρευση ουβικουινομένων πρωτεϊνών, ελάττωση του πολλαπλασιασμού και αύξηση της απόπτωσης (81,82). Ενδιαφέρον είναι το εύρημα ότι στα ποντίκια που δεν είχαν την ικανότητα της αυτοφαγίας δεν παρατηρήθηκε υπερπλασία των β-κυττάρων, που είναι μια απόκριση στην ινσουλinoαντοχή, ενώ στα ποντίκια ελέγχου η μάζα των β-κυττάρων διπλασιάστηκε (81,82). Επομένως σε συνθήκες που προκαλούν αντίσταση στην ινσουλίνη η αυτοφαγία ενεργοποιείται ως ένας προστατευτικός μηχανισμός που

περιορίζει εκφυλιστικά φαινόμενα και προστατεύει από την απόπτωση (76,81,82). Ο ρόλος της στην απομάκρυνση κατεστραμμένων οργανιδίων και πρωτεϊνών καθώς και ότι επιτρέπει την αντισταθμιστική αύξηση της μάζας των β-κυττάρων είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση των κυττάρων και την αναστολή εκδήλωσης διαβήτη (81).

Η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας στα β-κύτταρα έχει προταθεί ότι μεσολαβείται από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα τα επίπεδα των οποίων αυξάνονται σε συνθήκες ινσουλινοαντοχής (76,81). Όπως αναφέρεται και στην προηγούμενη ενότητα της ρύθμισης της αυτοφαγίας από τα λιπαρά οξέα, τα FFA αυξάνουν την αυτοφαγία στα κύτταρα του παγκρέατος. Επίσης τα επίπεδα FFA στον ορό αυξάνονται σε συνθήκες ινσουλινοαντοχής (76,81). Επομένως προτείνεται ότι η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας σε συνθήκες ινσουλινοαντοχής μεσολαβείται από τα FFA (76,81).

Σύμφωνα με τους Chen et al η αυτοφαγία προστατεύει τα παγκρεατικά κύτταρα και από την τοξικότητα των υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης (76). Οι υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης προκαλούν απόπτωση σε παγκρεατικά κύτταρα, αλλά παράλληλα παρατηρείται αύξηση της αυτοφαγίας. Η αναστολή της αυτοφαγίας με την ταυτόχρονη χορήγηση μεγάλης ποσότητας γλυκόζης αύξησε σημαντικά τους ρυθμούς απόπτωσης. Επομένως η αυτοφαγία επάγεται ως προστατευτικός μηχανισμός έναντι της γλυκοτοξικότητας (76).

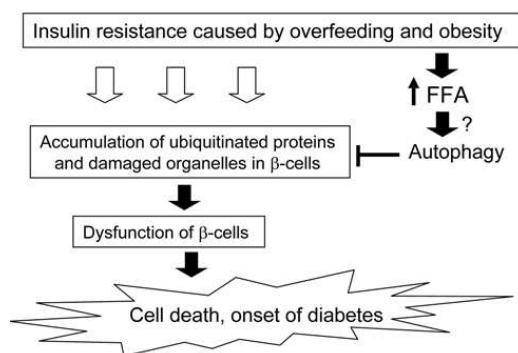
Η αυτοφαγία εξάλλου μπορεί να συμβάλλει στην ελάττωση της μάζας των β-κυττάρων που παρατηρείται στο διαβήτη. Τα πειράματα των Masini et al (86) και Fujimoto et al (87) σε ανθρώπινα κύτταρα ασθενών με διαβήτη II και κύτταρα από ινσουλίνωμα αντίστοιχα έδειξαν ότι στα κύτταρα αυτά υπήρχε αύξηση της αυτοφαγίας που οδήγησε σε κυτταρικό θάνατο (81,76). Η ελάττωση της μάζας των β-κυττάρων στο διαβήτη γίνεται κυρίως μέσω της απόπτωσης, αλλά φαίνεται ότι και η αυτοφαγία με τον τρόπο που διεξάγεται κατά τη νόσο του διαβήτη συμβάλλει στον κυτταρικό θάνατο (81). Οι Fujimoto et al αναφέρουν επίσης ότι η αυτοφαγία αυξάνεται και ως απόκριση στη νηστεία (87). Επειδή όμως ότι η έρευνα έγινε σε κύτταρα από ινσουλίνωμα μάλλον δεν μπορεί να γενικευτεί για τα β-κύτταρα, δεδομένου ότι η είναι γενικά αποδεκτό ότι τα νησίδια του παγκρέατος προστατεύονται από την αυτοφαγία σε συνθήκες νηστείας.

Ενδιαφέρον είναι ότι ο φαινότυπος του διαβήτη II και της αναστολής της αυτοφαγίας στα β-κύτταρα είναι όμοιος: σε κανονική δίαιτα εμφανίζεται ήπια ινσουλινοαντοχή που εκδηλώνεται με τη μειωμένη έκκριση ινσουλίνης υπό το ερέθισμα της γλυκόζης, ενώ σε HFD αναπτύσσεται διαβήτης και η μάζα των β-κυττάρων μειώνεται (82). Αυτό σημαίνει ότι η αναστολή ή η ελάττωση της αυτοφαγίας στα β-κύτταρα μπορεί να προδιαθέτει για διαβήτη (81,88).

Ο διαβήτης ΙΙ χαρακτηρίζεται από προοδευτική ανεπάρκεια των β-κυττάρων με συνέπεια τη μειωμένη έκκριση ινσουλίνης και την ανάπτυξη ινσουλinoαντοχής στους περιφερικούς ιστούς (76). Ως αιτίες της αντίστασης στην ινσουλίνη έχουν προταθεί η μη κανονική λειτουργία των μιτοχονδρίων και το ER stress. Δεδομένου ότι η αυτοφαγία ενεργοποιείται από τους παράγοντες αυτούς, ενώ η μη κανονική λειτουργία της αυτοφαγίας μπορεί να προκαλέσει τη συσσώρευση ελαττωματικών μιτοχονδρίων και να επιδεινώσει το ER stress, η αυτοφαγία ίσως σχετίζεται με την ανάπτυξη της ινσουλinoαντοχής (76,83). Ωστόσο δεν έχει διατυπωθεί σαφής αιτιώδης σχέση μεταξύ ελαττωματικής λειτουργίας μιτοχονδρίων και ER με την ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη. Επομένως δεν μπορεί να διατυπωθεί αιτιώδης σχέση και μεταξύ αυτοφαγίας και ινσουλinoαντοχής (83). Η ανεπάρκεια των β-κυττάρων εξάλλου οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στο ER stress στο οποίο τα β-κύτταρα είναι ευάλωτα (83). Δεδομένου ότι η αυτοφαγία ενεργοποιείται από το ER stress ως προστατευτικός μηχανισμός, είναι πιθανό η μη κανονική λειτουργία της αυτοφαγίας κατά το διαβήτη να αδυνατεί να ρυθμίσει το ER stress με αποτέλεσμα την ανεπάρκεια των β-κυττάρων (83).

Στην ανάπτυξη ινσουλinoαντοχής κατά τη μακροχρόνια δίαιτα υψηλού θερμιδικού περιεχομένου εξάλλου, πιθανό να συμβάλλει ο ανατροφοδοτικός μηχανισμός της S6K. Η ενεργοποίηση της mTORC1 με την αφθονία θρεπτικών συστατικών αυξάνει τα επίπεδα της S6K η οποία αναστέλλει την PI3K πορεία με αποτέλεσμα την μειωμένη απόκριση του mTORC1 στην ινσουλίνη. Επιπλέον η μείωση της δραστηριότητας της PI3K συνεπάγεται και τη μείωση της δραστηριότητας της Akt. Μια από τις πολλές δράσεις της Akt είναι η αύξηση της πρόσληψης της γλυκόζης από τα κύτταρα. Επομένως η S6K μέσω του ανατροφοδοτικού μηχανισμού μπορεί να προκαλέσει ελάττωση της πρόσληψης γλυκόζης από τα κύτταρα και αύξηση της γλυκονεογένεσης στο ήπαρ που οδηγούν σε ινσουλinoαντοχή και υπεργλυκαιμία (31).

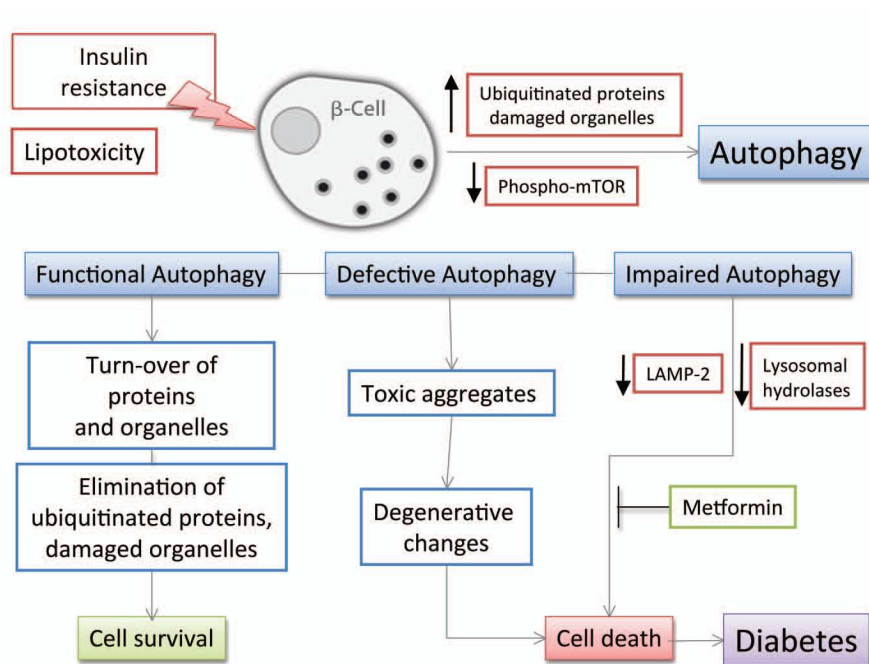
Η αυτοφαγία στα διάφορα κύτταρα κατά κανόνα δρα ως ένας προστατευτικός μηχανισμός για την επιβίωση του κυττάρου. Από τη σκοπιά αυτή και στην περίπτωση του διαβήτη και της ινσουλinoαντοχής μπορεί να συμβάλλει στην επιβίωση των β-κυττάρων όπως αποδίδεται στο παρακάτω διάγραμμα.



Εικόνα 61. Πηγή(88)

Η αντίσταση στην ινσουλίνη που αναπτύσσεται κατά την παχυσαρκία έχει αποτέλεσμα τη συσσώρευση ουβικουινομένων πρωτεϊνών και κατεστραμμένων οργανιδίων στα β-κύτταρα. Ταυτόχρονα όμως ενεργοποιείται η αυτοφαγία, πιθανόν μέσω των FFA και με τη δράση της απομακρύνονται από τα β-κύτταρα τα κατεστραμμένα οργανίδια και πρωτεΐνες που διαφορετικά προκαλούν τη δυσλειτουργία και τελικά το θάνατο των β-κυττάρων με αποτέλεσμα την έναρξη διαβήτη. Ωστόσο υπό τις συνθήκες της ινσουλινοαντοχής και του διαβήτη η λειτουργία της αυτοφαγίας μπορεί να μην είναι φυσιολογική ή να είναι ανεπαρκής για την εκδήλωση προστατευτικής δράσης.

Η αλληλεπίδραση αυτοφαγίας – ινσουλινοαντοχής αποδίδεται και στο παρακάτω διάγραμμα.



Εικόνα 62. Πηγή: (99)

Η αντίσταση στην ινσουλίνη προκαλεί τη συσσώρευση ουβικουινομένων πρωτεϊνών και κατεστραμμένων οργανιδίων στο κυτοσόλιο. Η αυτοφαγία ως προστατευτικός μηχανισμός απομακρύνει αυτά τα τοξικά συστατικά στο κυτοσόλιο. Η αυτοφαγία κατά την ινσουλινοαντοχή πιθανόν πυροδοτείται από τα λιπαρά οξέα τα οποία είναι αυξημένα σε τέτοιες συνθήκες. Σε συνθήκες ινσουλινοαντοχής ναι μεν αυξάνεται ο σχηματισμός αυτοφαγοσωμάτων, αλλά η ροή της αυτοφαγίας μάλλον δεν είναι φυσιολογική. Η σύντηξη των αυτοφαγοσωμάτων με το λυσόσωμα, όπως φαίνεται από τα μειωμένα επίπεδα LAMP-2, και η δράση των λυσοσωμικών υδρολασών έχουν ελαττωμένους ρυθμούς. Έτσι η δράση της αυτοφαγίας δεν είναι επαρκής για να αντιμετωπίσει τη συσσώρευση τοξικών συστατικών στο κυτοσόλιο με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο και την έναρξη του διαβήτη (99).

5.1 Αυτοφαγία και μακροθρεπτικά συστατικά

Η έλλειψη θρεπτικών συστατικών είναι ισχυρός και ο πρώτος παράγοντας που αναγνωρίστηκε ότι πυροδοτεί την αυτοφαγία (2,17,18). Ακόμα και σήμερα η αυτοφαγία χαρακτηρίζεται ως ένας προσαρμοστικός μηχανισμός του κυττάρου στη νηστεία και την έλλειψη θρεπτικών συστατικών. Ο συνολικός περιορισμός των προσλαμβανόμενων θερμίδων προκαλεί την πυροδότηση της αυτοφαγίας στους περισσότερους ιστούς (57) με εξαίρεση τον εγκέφαλο, αλλά και τα ινσουλινοπαραγωγά κύτταρα του παγκρέατος που φαίνεται να προστατεύονται.

Ενδιαφέρον είναι ότι η μειωμένη διατροφική πρόσληψη, δηλαδή η κατανάλωση σχετικά μικρής ποσότητας τροφής χωρίς όμως να προκαλείται κακή θρέψη ή υποσιτισμός (103) έχει συσχετιστεί με την παράταση του χρόνου ζωής σε διάφορους οργανισμούς από τις ζύμες ως τα θηλαστικά (103,104). Επιπλέον στη μακροβιότητα που παρέχει ο περιορισμός της τροφής έχει αποδειχτεί ότι παίζει ρόλο η αρνητική ρύθμιση της mTOR (103). Δεδομένου ότι η μειωμένη πρόσληψη τροφής πυροδοτεί την αυτοφαγία και μάλιστα με μηχανισμούς που μεσολαβούνται από την mTOR μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι ευεργετικές επιδράσεις της μειωμένης διατροφικής πρόσληψης οφείλονται στη δράση της αυτοφαγίας (103,105,106). Η μειωμένη πρόσληψη τροφής έχει βρεθεί επίσης ότι έχει θετική επίδραση σε νόσους που σχετίζονται με το γήρας, όπως νευροεκφυλιστικές ασθένειες και καρκίνος (105,106). Η αυτοφαγία έχει προταθεί ότι μεσολαβεί τις ευεργετικές επιδράσεις του περιορισμού της τροφής στην επέκταση του χρόνου ζωής και στη διαχείριση εκφυλιστικών νόσων. Η ισχύ αυτής της πρότασης είναι αντικείμενο έντονης έρευνας τα τελευταία χρόνια. Η αυτοφαγία μπορεί να συμβάλλει στην επιβίωση του κυττάρου για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα εξασφαλίζοντας επιθυμητές συνθήκες στο εσωτερικό του κυττάρου: απομακρύνει από το κυτοσόλιο κατεστραμμένα οργανίδια, μακρόβιες πρωτεΐνες και συσσωματώματα πρωτεϊνών που συσσωρεύονται από την έκθεση του

κυττάρου σε στρεσογόνους παράγοντες (106). Αντίστροφα η ελάττωση των ρυθμών της αυτοφαγίας που παρατηρείται με την αύξηση της ηλικίας ίσως συμβάλλει στην εκδήλωση εκφυλιστικών φαινομένων (107). Η δράση της αυτοφαγίας λοιπόν ίσως συμβάλλει στην παράταση του χρόνου ζωής και στην καθυστέρηση της εκδήλωσης εκφυλιστικών φαινομένων.

Οι δομικοί λίθοι των πρωτεϊνών, δηλαδή τα αμινοξέα είναι ρυθμιστικοί παράγοντες της αυτοφαγίας. Η απουσία αμινοξέων είναι ισχυρό ερέθισμα για την έναρξη της αυτοφαγίας, ενώ η παρουσία αμινοξέων αναστέλλει την αυτοφαγία. Για τον τρόπο με τον οποίο η έλλειψη αμινοξέων πυροδοτεί την αυτοφαγία έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί. Είναι επίσης πιθανό τα διαφορετικά αμινοξέα να αναστέλλουν την αυτοφαγία μέσω διαφορετικών μηχανισμών στους διάφορους τύπους κυττάρων. Για παράδειγμα έχει παρατηρηθεί ότι η παρουσία λευκίνης είναι πολύ ισχυρός αναστολέας της αυτοφαγίας. Δεδομένο ωστόσο είναι ότι παρουσία αμινοξέων η mTOR είναι ενεργή και προάγει την πρωτεϊνσύνθεση, ενώ με την εξάντληση των αμινοξέων ενεργοποιείται η αυτοφαγία μέσω της οποίας αποδομούνται διάφορες πρωτεΐνες του κυττάρου για την παραγωγή αμινοξέων που μπορεί να χρησιμοποιηθούν είτε για τη σύνθεση πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την επιβίωση του κυττάρου, είτε για την παραγωγή ενέργειας. Τα επίπεδα αμινοξέων στο αίμα και στους μυς μεταβάλλονται ανάλογα με τη διαιτητική πρόσληψη πρωτεϊνών. Επομένως είναι μάλλον εφικτό να κατευθύνουμε την αυτοφαγία με τη διαχείριση της διατροφικής πρόσληψης πρωτεϊνών (105).

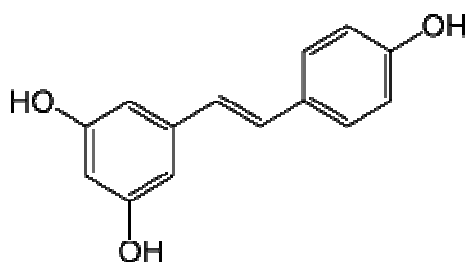
Οι υδατάνθρακες διασπώνται στον οργανισμό και μετατρέπονται σε γλυκόζη που είναι η κύρια πηγή ενέργειας του κυττάρου. Η επάρκεια γλυκόζης στο κύτταρο συνεπάγεται και αυξημένα επίπεδα ATP που αναστέλλουν την αυτοφαγία. Επιπλέον η αύξηση της γλυκόζης προκαλεί και αύξηση στην έκκριση ινσουλίνης η οποία επίσης αναστέλλει την αυτοφαγία. Τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης επομένως αναστέλλουν την αυτοφαγία καθώς αντανακλούν επάρκεια των ενεργειακών αποθεμάτων, αλλά και υψηλότερα επίπεδα αυξητικών παραγόντων, όπως η ινσουλίνη και ο IGF-1.

Τα λιπίδια της τροφής επηρεάζουν και τα επίπεδα των λιπιδίων στο αίμα. Σε ηπατικά κύτταρα έχει βρεθεί ότι η έκθεση σε μεγάλες ποσότητες λιπαρών οξέων αυξάνει τους ρυθμούς λιποφαγίας. Αντίθετα η χρόνια έκθεση των κυττάρων σε μεγάλες ποσότητες λιπαρών οξέων έχει αποτέλεσμα την ελάττωση της λιποφαγίας και γενικότερα της αυτοφαγίας. Επιπλέον η διατροφή μεγάλης περιεκτικότητας σε λίπος για παρατεταμένο χρονικό διάστημα οδηγεί στην ανάπτυξη ινσουλινοαντοχής κατά την οποία η ροή της αυτοφαγίας δεν είναι φυσιολογική.

5.2 Συστατικά των τροφών που επιδρούν στην αυτοφαγία

Διάφορα συστατικά που περιέχονται στις τροφές έχουν την ικανότητα να διεγείρουν ή να αναστέλλουν την αυτοφαγία. Οι ουσίες αυτές συνοψίζονται από τους Hannigan και Gorski (105) και Singletary και Milner (106). Όπως επισημαίνουν και οι ίδιοι ερευνητές τα δεδομένα προκύπτουν κυρίως από *in vitro* έρευνες. Στις περισσότερες περιπτώσεις δε, η επίδραση των ουσιών στην αυτοφαγία επιτυγχάνεται με δόσεις πολύ υψηλότερες από αυτές που συνήθως προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής. Επιπλέον η ικανότητα των ουσιών να διεγείρουν ή να αναστείλουν την αυτοφαγία ίσως εξαρτάται και από τον τύπο του κυττάρου, οπότε η γενίκευση των αποτελεσμάτων είναι μάλλον παρακινδυνευμένη. Τέλος σε πολλές περιπτώσεις το συμπέρασμα ότι η εξεταζόμενη ουσία επιδρά στην αυτοφαγία βασίζεται στην παρατήρηση του σχηματισμού αυτοφαγικών δομών και όχι στην παρατήρηση της ροής της αυτοφαγίας. Η αύξηση του αριθμού των αυτοφαγοσωμάτων όμως μπορεί να οφείλεται και στην ελάττωση της σύντηξής τους με το λυσόσωμα σε μη φυσιολογική ροή της αυτοφαγίας. Στη συνέχεια αναφέρονται συστατικά των τροφών που φαίνεται να επιδρούν στην αυτοφαγία.

Ρεσβερατρόλη



Η ρεσβερατρόλη είναι μια φυσική φαινόλη που ανήκει στα φλαβονοειδή και υπάρχει στη φλούδα των σταφυλιών, σε ξηρούς καρπούς και στο κόκκινο κρασί (105,106). Στη ρεσβερατρόλη έχουν αποδοθεί αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές δράσεις (105,106). Η ρεσβερατρόλη έχει αποδειχτεί σε διάφορες σειρές καρκινικών κυττάρων ότι διεγείρει την αυτοφαγία (105,106). Ως μηχανισμοί για την πυροδότηση της αυτοφαγίας έχουν προταθεί η αναστολή της mTOR μέσω της Akt (108), αλλά και πορείες ανεξάρτητες από την mTOR (106). Οι επιδράσεις της ρεσβερατρόλης στην αυτοφαγία στις διάφορες έρευνες εκδηλώνονται σε δόσεις της τάξης των 50 $\mu\text{mol/L}$ (105,106). Η ρεσβερατρόλη αν και έχει γρήγορη απορρόφηση, η βιοδιαθεσιμότητά της είναι μάλλον μικρή και τα επίπεδα στο πλάσμα είναι μικρότερα των 5 ng/ml (105). Ένας λόγος που εμφανίζεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα είναι το γεγονός ότι μεταβολίζεται γρήγορα. Οι θετικές επιδράσεις της όμως μπορεί να οφείλονται και στους μεταβολίτες της.

Σε πρόσφατη έρευνα ωστόσο βρέθηκε ότι μικρές δόσεις ρεσβερατρόλης (2,5mg/kg/ημέρα σε ποντίκια) πυροδοτούν την αυτοφαγία σε κύτταρα του μυοκαρδίου (109). Η αύξηση της αυτοφαγίας στην έρευνα αυτή προτείνεται ότι οφείλεται στην αναστολή του mTORC1 μέσω της ενεργοποίησης του mTORC2. Οι μεγαλύτερες δόσεις ρεσβερατρόλης έχουν αποτέλεσμα την κλιμάκωση της αυτοφαγίας. Η αύξηση της αυτοφαγίας εμφανίζεται να έχει καρδιοπροστατευτική δράση καθώς σχετίζεται με αύξηση της επιβίωσης των κυττάρων και μείωση της απόπτωσης (109).

Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C ή ασκορβικό οξύ υπάρχει σε ποικιλία λαχανικών και φρούτων, κυρίως των εσπεριδοειδών. Η βιταμίνη C έχει βρεθεί ότι αυξάνει την αυτοφαγία σε πνευμονικά καρκινικά κύτταρα και σε ανθρώπινα αστροκύτταρα (105,106). Η ενίσχυση της αυτοφαγίας οφείλεται εν μέρει στην ικανότητα του να σταθεροποιεί το όξινο pH των λυσοσωμάτων βελτιστοποιώντας έτσι τη δράση των όξινων υδρολασών (106). Το ασκορβικό σε καρκινικά κύτταρα πνευμόνων αποδείχτηκε ότι προκαλεί κυτταρικό θάνατο αναστέλλοντας έτσι την ανάπτυξη του καρκινικού όγκου (106). Έχει προσδιοριστεί ότι το ασκορβικό έχει τη μεγαλύτερη απορρόφηση με την κατανάλωση τουλάχιστον πέντε φρούτων και λαχανικών ημερησίως που αντιστοιχούν σε 210-280mg βιταμίνης C (105).

Βιταμίνη D

Η βιταμίνη D υπάρχει κυρίως σε ιχθυέλαια και λιπαρά ψάρια, σε ζωικής προέλευσης τροφές (συκώτι, μοσχάρι, γάλα και γαλακτοκομικά, αβγά) σε διάφορες συγκεντρώσεις και σε εμπλουτισμένα τρόφιμα, ενώ συνθέτεται στο δέρμα με την έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία (110). Η υψηλή πρόσληψη βιταμίνης D και ασβεστίου έχει συνδεθεί με μειωμένο κίνδυνο για καρκίνο (105,106). Η βιταμίνη D στην ενεργή της μορφή, δηλαδή ως καλσιτριόλη, και το ανάλογό της seocalcitol (EB1089) έχει αποδειχτεί ότι αυξάνουν την αυτοφαγία σε μαστικά καρκινικά κύτταρα (105). Η βιταμίνη D φαίνεται ότι ενεργοποιεί την αυτοφαγία μέσω της αύξησης των ενδοκυτταρικών επιπέδων ασβεστίου (105).

Τοκοτριενόλες

Οι τοκοτριενόλες μαζί με τις τοκοφερόλες συνιστούν τα μέλη της βιταμίνης E. Απαντούν κυρίως σε φυτικές τροφές: έλαια (ελαιόλαδο, ηλιέλαιο κα), στα πράσινα μέρη των φυτών, δημητριακά ολικής άλεσης, όσπρια, σπόρους φυτών και λαχανικά (110). Έχουν αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση και φαίνεται ότι προστατεύει από νευροεκφυλιστικές νόσους (105). Σε μια σειρά κυττάρων (pancreatic stellate cells) που οδηγούν σε ίνωση του παγκρέατος

αποδείχτηκε ότι αυξάνουν την αυτοφαγία (105) και την απόπτωση στα κύτταρα αυτά. Μάλιστα αυτή η δράση των τοκοτριενολών φαίνεται να περιορίζεται μόνο στα κύτταρα αυτά αφού δεν βρέθηκε να επηρεάζει τα κύτταρα σε ηρεμία ή τα τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα (105). Επομένως οι τοκοτριενόλες προστατεύουν το πάγκρεας εξαλείφοντας τα κύτταρα που οδηγούν στην ανάπτυξη ίνωσης. Δεν έχει ερευνηθεί αν οι αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές δράσεις των τοκοτριενολών οφείλονται στην ικανότητά της να διεγείρει την αυτοφαγία, αλλά είναι πιθανό (105).

Βιταμίνη K2

Οι μενακινόνες ή βιταμίνη K2 είναι μέλη της βιταμίνης K. Συνθέτονται από βακτήρια και απαντούν σε τροφές που έχουν υποστεί ζύμωση, ενώ απορροφώνται στο τελευταίο τμήμα του λεπτού εντέρου και στο κόλον με παθητική διάχυση και παράγονται από αναερόβια βακτήρια στο παχύ έντερο (110). Η ανεπάρκεια βιταμίνης K είναι σχετικά σπάνια και συνήθως σχετίζεται με δυσαπορρόφηση λιπιδίων, καταστροφή της μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου ή ηπατική νόσο, ενώ οι μενακινόνες ακόμα και σε υψηλές δόσεις δεν εμφανίζουν τοξική δράση (110). Είναι πιθανό να παρέχουν προστασία στη λευχαιμία καθώς βρέθηκε ότι προκαλούν αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο καρκινικών κυττάρων (HL-60 leukemia cells) και μάλιστα ιδιαίτερα των κυττάρων που εμφανίζουν μειωμένους ρυθμούς απόπτωσης (105,106).

Τριτερπενοειδείς σαπωνίνες

Οι σαπωνίνες σόγιας (soyasaponinins) ανήκουν στα τριτερπενοειδή και περιλαμβάνουν 3 γκρουπ σαπογενόλης: A, B και E. Οι σαπωνίνες του γκρουπ B απαντούν σε τροφές όπως όσπρια, βρώμη, προϊόντα σόγιας και στο ginseng. Οι σαπωνίνες βρέθηκε ότι αυξάνουν την αυτοφαγία σε κύτταρα αδενοκαρκινώματος πιθανόν μέσω της απενεργοποίησης της Akt και μέσω της πορείας των MAP κινασών (105). Οι σαπωνίνες της σόγιας έχουν μικρή βιοδιαθεσιμότητα καθώς ένα μεγάλο μέρος τους παραμένει άπεπτο. Ενδιαφέρον είναι ότι η παραδοσιακή διατροφή Ασιατικών χωρών που είναι πλούσια σε προϊόντα σόγιας και genistein, το οποίο επιδεικνύει παρόμοιες ιδιότητες, παρουσιάζει προστατευτική δράση έναντι διάφορων μορφών καρκίνου (105).

Ισοθειοκυανίνες

Οι ισοθειοκυανίνες και ειδικότερα η σουλφουροφάνη είναι συστατικά που σχηματίζονται με την υδρόλυση θειούχων γλυκοζιτών (106). Απαντούν σε σταυρανθή λαχανικά, όπως μπρόκολο, κουνουπίδι, κάρδαμο και διάφορα πράσινα φυλλώδη λαχανικά (105,106). Πιστεύεται πως έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες και ότι προστατεύουν το γενετικό υλικό των κυττάρων (105,106).

Αναστέλλουν την αυτοφαγία πιθανόν μέσω της ελάττωσης των επιπέδων της Bcl-2 που δεσμεύει και αναστέλλει την Beclin1 (105).

Κουρκουμίνη

Η κουρκουμίνη είναι το ενεργό συστατικό του κουρκουμά ή κιτρινόριζας που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του κάρυ, της μουστάρδας και ως πρόσθετο σε διάφορα τρόφιμα. Η κουρκουμίνη αυξάνει την αυτοφαγία μέσω της μείωσης της δραστηριότητας της Akt και της ενεργοποίησης της ERK1/2 πορείας και μάλιστα η ικανότητα αυτή της κουρκουμίνης έχει επιβεβαιωθεί *in vivo* (105,106). Η κουρκουμίνη έχει αντικαρκινικές ιδιότητες και πολύ μικρή τοξικότητα και έχει προταθεί η χρήση της ως αντικαρκινικού φαρμάκου. Η κουρκουμίνη χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή ιατρική της Ινδίας για αιώνες και σήμερα αποτελεί αντικείμενο έρευνας καθώς φαίνεται να προστατεύει από τον καρκίνο και τη νόσο Alzheimer. Η βιοδιαθεσιμότητά της είναι μικρή καθώς έχει μικρή απορρόφηση η οποία όμως αυξάνεται με ταυτόχρονη λήψη πιπερίνης. Η πιπερίνη είναι συστατικό του πιπεριού και στην παραδοσιακή ασιατική κουζίνα ο συνδυασμός των δύο συστατικών είναι συνηθισμένος (105).

Διάφορα συστατικά των τροφών έχει βρεθεί ότι επιδρούν στην αυτοφαγία των κυττάρων, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις ο μηχανισμός μέσω του οποίου ρυθμίζουν την αυτοφαγία δεν είναι γνωστός. Επιπλέον όπως προαναφέρεται τα αποτελέσματα για τα περισσότερα συστατικά βασίζονται σε *in vitro* έρευνες που σε πολλές περιπτώσεις δεν αξιολογούν τη ροή της αυτοφαγίας, αλλά μόνο το σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων. Οι επιδράσεις των συστατικών αυτών στην αυτοφαγία εκδηλώνονται συνήθως σε ποσότητες πολύ μεγαλύτερες από αυτές που συνήθως μετρούνται στα κύτταρα. Επιπλέον για τα περισσότερα συστατικά δεν έχουν προσδιοριστεί οι ποσότητες που είναι ικανές να επηρεάσουν την αυτοφαγία *in vivo*. Άλλωστε η βιοδιαθεσιμότητα των συστατικών αυτών όπως και ο μεταβολισμός τους δεν είναι διευκρινισμένος. Έτσι δεν μπορεί να προσδιοριστεί η ποσότητα του προσλαμβανόμενου συστατικού ή του τροφίμου που μπορεί να έχει επίδραση στην αυτοφαγία και αν στην ποσότητα αυτή το συστατικό δεν είναι τοξικό (105). Χρειάζεται λοιπόν περαιτέρω έρευνα για το σχεδιασμό διατροφικών σχημάτων ή τη χρήση των διάφορων συστατικών στη δημιουργία λειτουργικών τροφίμων με σκοπό την κατεύθυνση της αυτοφαγίας (105,106).

Το σημαντικότερο ζήτημα βέβαια είναι να διευκρινιστεί ο ρόλος και οι επιπτώσεις της αυτοφαγίας σε κάθε περίπτωση. Η αυτοφαγία γενικά είναι μια κυτταροπροστατευτική διαδικασία. Αυξάνεται ως απόκριση σε διάφορους στρεσογόνους παράγοντες και αποσκοπεί στην επιβίωση του κυττάρου. Για παράδειγμα απομακρύνει συσσωματώματα πρωτεϊνών η

συσσώρευση των οποίων έχει συνδεθεί με νευροεκφυλιστικές ασθένειες ή τροφοδοτεί το κύτταρο με θρεπτικά συστατικά σε περιόδους νηστείας. Στον καρκίνο όμως μπορεί να έχει ογκοκατασταλτική δράση ή αντίθετα να συμβάλλει στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και την ανάπτυξη του καρκινικού όγκου. Επομένως δεν γνωρίζουμε αν η αύξηση ή μείωση των ρυθμών της αυτοφαγίας είναι ωφέλιμη για τον οργανισμό (105). Επιπλέον δεν γνωρίζουμε τις συνέπειες που θα είχε σε άλλους ιστούς η μεταβολή των ρυθμών της αυτοφαγίας.

6 Συμπεράσματα

Εν κατακλείδι η αυτοφαγία είναι μια διαδικασία που προστατεύει το κύτταρο από διάφορους στρεσογόνους παράγοντες (όπως έλλειψη θρεπτικών συστατικών, οξειδωτικό στρες ή ακόμα και βακτήρια και ιούς), αλλά και απαραίτητη για την επιβίωση του κυττάρου καθώς διατηρεί καλές συνθήκες στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον απομακρύνοντας κατεστραμμένα οργανίδια, μακρόβιες πρωτεΐνες και γενικά επιβλαβή συστατικά. Η αυτοφαγία όμως μπορεί να οδηγήσει και σε κυτταρικό θάνατο όταν εξελίσσεται σε ανεξέλεγκτους ρυθμούς ή σε καταστάσεις όπως ο καρκίνος ή ο διαβήτης στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Για το λόγο αυτό η διαδικασία της αυτοφαγίας υπόκειται σε υψηλή ρύθμιση μέσω πολλαπλών μηχανισμών ελέγχου οι οποίοι έχουν αρχίσει να διευκρινίζονται, αλλά στην πλειονότητά τους δεν είναι ακόμα γνωστοί. Πολλές ασθένειες έχουν συνδεθεί με τη μη φυσιολογική λειτουργία της αυτοφαγίας και ανακαλύπτονται με αυξανόμενο ρυθμό επιδράσεις της αυτοφαγίας σε διάφορες βιολογικές λειτουργίες. Το γεγονός ότι η αυτοφαγία έχει επιβεβαιωμένες θετικές επιδράσεις σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις κάνει ελκυστικό το ενδεχόμενο της ένταξής της σε θεραπευτικές στρατηγικές. Δεδομένου ότι τα θρεπτικά συστατικά έχουν ρόλο στη ρύθμιση της πορείας είναι ίσως εφικτό να αναπτυχθούν διατροφικά σχήματα για την κατεύθυνση της πορείας στα πλαίσια θεραπευτικών εφαρμογών. Ωστόσο παραμένει να απαντηθούν σημαντικά ερωτήματα, όπως ο ρόλος και οι επιπτώσεις της αυτοφαγίας στο κύτταρο και στον οργανισμό σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, ποιοι παράγοντες και με ποιους μηχανισμούς ρυθμίζουν την πορεία, ποια θρεπτικά συστατικά και σε τι ποσότητες μπορούν να επηρεάσουν την πορεία, αλλά και ποιές οι επιπτώσεις στον οργανισμό συνολικά.

7.1 Παράρτημα

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

3-MA	3-μεθυλαδενίνη
4E-BP1	translation initiation factor 4E binding protein-1
AgRP	Agouti-related peptide
Akt	PKB, protein kinase B
AMPK	AMP-activated protein kinase
ATG	<u>A</u> utophagy related genes
CaMKK β	Ca/calmodulin-dependent kinase kinase- β
CMA	chaperone-mediated autophagy
Cvt	cytoplasm-to-vacuole targeting
DAP1	death associated protein1
Deptor	DEP-domain-containig mTOR-interacting protein
DRAM	Damage-regulated autophagy modulator
ER	endoplasmic reticulum
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
FFA	Free Fatty Acids
FHD	high fat diet
FIP200	200kDa focal adhesion kinase family-interacting protein
GABARAP	γ -aminobutyric acid type A receptor-associated protein
GAP	GTPase activating protein
GATE-16	Golgi-associated ATPase enhancer of 16kDa
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
Hif-1	hypoxia-inducible factor
IM	isolation membrane
IP3R	υποδοχέας της 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης
IPMK	inositol polyphosphate multikinase
IR	insulin receptor
IRS	insulin receptor substrate
JNK1	c-Jun NH ₂ -terminal kinase-1
Lamp2a	lysosome-associated membrane protein Lamp type 2a
LC3	microtubule-associated protein 1 light chain 3

LD	Lipid Droplet
MEF	mouse embryonic cells
mSIN1	mammalian stress-activated protein kinase interacting protein
mTOR	mammalian TOR ή mechanistic TOR
Mvb	multivesicular bodies
NAF-1	nutrient-deprivation autophagy factor-1
PAS	pre-autophagosomal structure, phagophore assembly site
PE	φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
PI3K	phosphatidylinositol 3 Kinase ή Vps34
PI3P	phosphatidylinositol-3-phosphate
PIKK	phosphatidylinositol kinase-related kinase
POMC	proopiomelanocortin
PRAS40	proline-rich Akt substrate 40kDa
Protor-1	protein observed with Rictor-1
Raptor	regulatory-associated protein of mTOR
Rheb	Ras homolog enriched in brain
Rictor	rapamycin-insensitive companion of mTOR
ROS	reactive oxygen species
S6K1	ribosomal protein S6 Kinase-1
SLC	solute-linked carrier
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors
TOR	target of rapamycin
TSC1-TSC2	tuberous sclerosis complex
ULK	unc-51-like kinase
UPR	unfolded protein response
UVRAG	ultraviolet irradiation resistant-associated gene
VMP1	vacuole membrane protein1
Vps	vacuolar protein sorting
WIPI	WD-repeat protein interacting with phosphoinositides

Συστατικά των τροφίμων που επηρεάζουν την αυτοφαγία

Dietary Compound	Major Dietary Source	Effect on Autophagic & Acidic Structures	Effect on Autophagic Flux	Concentration	Cell Line and Type	Method of Autophagy Analysis	+/- Apoptosis
Amantoflavone	Ginkgo and some other plants	ND	Inhibit	100μM	<i>In vitro</i> : Rat hepatocytes	Sequestration of [3H]-raffinose	ND
Apigenin	Celery and parsley	ND	Inhibit	100μM	<i>In vitro</i> : Rat hepatocytes	Sequestration of [3H]-raffinose	ND
Benzyl isothiocyanate	Cruciferous vegetables	Increase autophagosomes	ND	2.5μM	<i>In vitro</i> : MDA-MB-231 breast cancer cells	EM	+
Bromovanillin	Derivative of vanillin from vanilla beans	Increase, autophagosomes	ND	40μM	<i>In vitro</i> : HepG2 liver cancer cells	EM	+
Caffeine	Coffee, tea, cocoa, and soft drinks	Increase autophagosomes	Induce	10mM	Yeast strains: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	GFP-ATG8 localization Ape I maturation assay	ND
Concanavalin A	Jack bean seeds	Increase autophagosomes and acidic structures	ND	40μg/ml	<i>In vitro</i> : ML-1 hepatoma cells	GFP-LC3 localization EM LC3 conversion Acridine orange staining	-
		Increase autophagosomes and acidic structures	ND	40μg/ml	<i>In vitro</i> : Huh-7, HepG2 and CT-26 hepatoma cells	LC3 conversion Acridine orange staining	-
Curcumin	Tumeric	Increase autophagosomes	ND	40mg/kg	<i>In vivo</i> : Mouse hepatocytes	LC3 IF	ND
		Increase autophagosomes and acidic structures	ND	40μM	<i>In vitro</i> : U87-MG and U373-MG malignant glioma cells	AVO quantification GFP-LC3 localization LC3 western blotting	-
		Increase autophagosomes	ND	100mg/kg	<i>In vivo</i> : U87-MG malignant glioma cells	LC3 IHC LC3 conversion	-
Fenugreek	Wheat and maize flour (in Egypt)	Increase autophagosomes	ND	20mg/kg	<i>In vivo</i> : DMBA induced breast tumours in female Wistar rats	EM	ND
Fisetin	Several fruits and vegetables	ND	Inhibit	100μM	<i>In vitro</i> : Rat hepatocytes	Sequestration of [3H]-raffinose	ND

Dietary Compound	Major Dietary Source	Effect on Autophagic & Acidic Structures	Effect on Autophagic Flux	Concentration	Cell Line and Type	Method of Autophagy Analysis	+/- Apoptosis
Genistein	Soy	Increase autophagosomes	ND	50µM, 100µM	<i>In vitro</i> : A2780 ovarian cancer cells	GFP-LC3 localization	+
		ND	Inhibit	300µM	<i>In vitro</i> : Rat hepatocytes	Sequestration of [3H]-raffinose	ND
		ND	No effect	100µM	<i>In vitro</i> : Rat hepatocytes	Sequestration of [3H]-raffinose	ND
Hesperetin	Citrus fruits and peppermint	ND	Inhibit	100µM	<i>In vitro</i> : Rat hepatocytes	Sequestration of [3H]-raffinose	ND
Hop-derived prenylflavanones	Beer	Increase vacuoles	ND	200µM	<i>In vitro</i> : PC-3 and DU145 prostate cancer cells	Vacuole accumulation	-
Lithium	Grains, vegetables and some drinking water	Increase autophagosomes	Induce	10mM	<i>In vitro</i> : COS-7 African green monkey kidney cells PC12 rat pheochromocytoma cells	LC3 IF LC3 conversion Autophagic substrate clearance	ND
Luteolin (aglycone)	Perilla seeds	ND	Inhibit	100µM	<i>In vitro</i> : Rat hepatocytes	Sequestration of [3H]-raffinose	ND
Luteolin (glycosylated)	Celery, green pepper, and chamomile tea	ND	Inhibit	100µM	<i>In vitro</i> : Rat hepatocytes	Sequestration of [3H]-raffinose	ND
MK615	Japanese apricot	Increase autophagosomes	ND	300µg/ml	<i>In vitro</i> : SW480, COLO and WiDr colon cancer cells	EM LC3 IF	+
		Increase autophagosomes	ND	300µg/ml	<i>In vitro</i> : MDA-MB-468 and MCF-7 breast cancer cells	EM	+
Quercetin	Apple skins and red onions	ND	Inhibit	100µM	<i>In vitro</i> : Rat hepatocytes	Sequestration of [3H]-raffinose	ND
		No effect	ND	20µM	<i>In vitro</i> : Caco-2 colorectal cancer cells	MDC staining GFP-LC3 localization	+
		Increase autophagosomes and acidic structures	ND	20µM	<i>In vitro</i> : Ras transformed Caco-2 colorectal cancer cells	MDC staining GFP-LC3 localization	+
Resveratrol	Grapes, nuts, and red wine	Increase autophagosomes and acidic structures	ND	50µM	<i>In vitro</i> : A2780 ovarian cancer cells	EM MDC staining	-

Dietary Compound	Major Dietary Source	Effect on Autophagic & Acidic Structures	Effect on Autophagic Flux	Concentration	Cell Line and Type	Method of Autophagy Analysis	+/- Apoptosis
Sulforaphane		Increase autophagosomes	ND	50µM, 100µM	<i>In vitro</i> : A2780 ovarian cancer cells	GFP-LC3 localization	-
		Increase autophagosomes	ND	100µM	<i>In vitro</i> : H460 lung cancer cells Heel A and Heel B endometrial cancer cells HSY salivary gland carcinoma cells MCF-7 breast cancer cells	GFP-LC3 localization	ND
		Increase autophagosomes	Induce	64µM	<i>In vitro</i> : MCF-7 breast cancer cells	GFP-LC3 localization LC3 conversion Degradation of long-lived proteins	+
Sulforaphane	Cruciferous vegetables	Increase autophagosomes and acidic structures	ND	40µM	<i>In vitro</i> : PC-3 and LNCaP prostate cancer cells	EM Acridine orange LC3 IF	+
		Increase autophagosomes	ND	40µM	<i>In vitro</i> : PC-3 prostate cancer cells	GFP-LC3 localization LC3 conversion	+
		Increase autophagosomes and acidic structures	ND	20µM	<i>In vitro</i> : Pancreatic stellate cells	MDC LC3 conversion	+
Tocotrienols	Subclass of vitamin E; Palm oil and rice bran	Increase autophagosomes and acidic structures	ND	100ppm	<i>In vitro</i> : HCT-15 colon adenocarcinoma	EM MDC LC3-I and LC3-II concentrations	ND
Vitamin C (ascorbate)	Fruit and vegetables	Increase autophagosomes and acidic structures	ND	500µM	<i>In vitro</i> : H1299 non-small cell lung cancer cells	Acridine orange GFP-LC3 localization	+
Vitamin D (and EB 1089)	Fatty fish and fortified dairy products	Increase autophagosomes and acidic structures	ND	100nM	<i>In vitro</i> : MCF-7 breast cancer cells	MDC staining LysoTracker staining dsRed-LC3 localization EM	+
Vitamin K2 (menaquinone)	Fermented foods	Increase autophagosomes and autolysosomes	Induce	100nM	<i>In vitro</i> : MCF-7 breast cancer cells	GFP-LC3 localization EM Degradation of long-lived proteins	ND
				10µM	<i>In vivo</i> : HL-60 leukemia cells	Acridine orange LC3 conversion LC3 localization LC3-II turnover	+

Πηγή: Adrienne M. Hannigan and Sharon M. Gorski. Macroautophagy: The key ingredient to a healthy diet? Autophagy. 2009; 5(2): 140–151.

Table 1. Induction of autophagy by nutrition and diet-related bioactive food constituents

Treatment	Cell/tissue	Dose	Mechanism
Avicin D triterpenoid saponins	Bone, breast, lung, ovarian, prostate cancers	2 µg/mL	AMPK, TSC2
B-group triterpenoid soyasaponins	Colon cancer	100 ppm	Akt, ERK1/2
Benzyl isothiocyanate	Breast cancer	2.5-10 µmol/L	ROS
Caloric restriction			Hormones, growth factors
Curcumin	Brain cancer	40 µmol/L	Akt/mTOR/S6 kinase, ERK1/2
Genistein	Ovarian cancer	50 µmol/L	Akt
Ketones			
Naringen	Hepatocytes	100 µmol/L	AMPK, PP2A
Prenylated flavones	Breast cancer	25-50 µmol/L	
Prenylated flavones	Prostate cancer	100-200 µmol/L	
Prostaglandin J2	Prostate cancer		PPAR γ
Quercetin	Colon cancer	20 µmol/L	
Resveratrol	Ovarian cancer	50 µmol/L	Akt, mTOR, glycolysis
Resveratrol	Colorectal cancer	100 µmol/L	Vps34
Resveratrol	Salivary gland cancer	50-100 µmol/L	
Resveratrol	Lung cancer	50-100 µmol/L	
Sodium butyrate	Cervical cancer	50 mmol/L	
Sodium selenite	Brain cancer	7 µmol/L	
Sulforaphane	Prostate cancer	40 µmol/L	Mitochondria/mitophagy
Tocotrienols	Pancreatic cells	20 µmol/L	
Vitamin C	Glial cells	100 µmol/L	
Vitamin C	Lung cancer	250-500 µmol/L	
Vitamin D3	Head and neck cancers	100 nmol/L	p19 ^{INK4D}
Vitamin K2	Liver cancer	10-50 µmol/L	

Abbreviations: TSC2, tuberous sclerosis complex 2; PP2A, protein phosphatase 2A; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor γ .

Πηγή: Keith Singletary and John Milner. Diet, Autophagy, and Cancer: A Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:1596-1610.

Table 1. Phenotypes of Atg-knockout mice

Genotype	Tissue	Phenotype
<i>Atg3^{-/-}</i> , <i>Atg5^{-/-}</i> , <i>Atg7^{-/-}</i> , <i>Atg9^{-/-}</i> , and <i>Atg16L^{-/-}</i>	Whole-body	Death within 1 day after birth and suckling defect.
<i>Beclin 1^{-/-}</i>	Whole-body	Developmental defect and death <i>in utero</i> (E7.5d–E8.5d).
<i>FIP200^{-/-}</i>	Whole-body	Embryonic death at mid/late gestation associated with heart failure and liver degeneration.
<i>Atg7^{fl/fl}</i> , Alb-Cre, <i>Atg7^{fl/fl}</i> , Mx1-Cre and <i>Atg5^{fl/fl}</i> , Mx1-Cre	Liver	Liver injury and accumulation of ub/p62-positive inclusions and degenerated mitochondria.
<i>Atg5^{fl/fl}</i> , nestin-Cre and <i>Atg7^{fl/fl}</i> , nestin-Cre	Brain	Neurodegeneration and accumulation of ub/p62-positive inclusions.
<i>Atg5^{fl/fl}</i> , Pcp2-Cre and <i>Atg7^{fl/fl}</i> , Pcp2-Cre	Purkinje cells	Accumulation of concentric membranous structures in axon and the axonal degeneration.
<i>Atg5^{fl/fl}</i> , MerCreMer-Cre	Cardiomyocytes	Cardiac hypertrophy, left ventricular dilatation, systolic dysfunction, and accumulation of ub/p62-positive inclusions and mitochondria.
<i>Atg7^{fl/fl}</i> , MLCf-Cre	Skeletal muscle	Muscle atrophy and age-dependent decrease in force and accumulation of ub/p62-positive inclusions and mitochondria.
<i>Atg5^{fl/fl}</i> , HSA-Cre	Skeletal muscle	Atrophy of fast muscle fiber. Accumulation of ub/p62-positive inclusions.
<i>Atg7^{fl/fl}</i> , Rip-Cre	Pancreatic beta cells	Degeneration of islets and impaired glucose tolerance with reduced insulin secretion. Accumulation of ub/p62-positive inclusions and mitochondria.
<i>Atg5^{fl/fl}</i> , Podocin-Cre	Podocytes	Glomerulopathy with aging. Accumulation of ub/p62-positive inclusions.
<i>Atg7^{fl/fl}</i> , Vav-Cre	Hematopoietic stem cells	Anaemia as well as lymphopenia and accumulation of degenerated mitochondria.
<i>Atg5^{fl/fl}</i> , Lck-Cre and <i>Atg7^{fl/fl}</i> , Lck-Cre	T cells	Reduced number of T cells. Failure to reduce mitochondrial content as well as an imbalance in pro- and antiapoptotic protein expression.
<i>Atg5^{fl/fl}</i> , CD19-Cre	B cells	Decrease in the number of B cells.
<i>Atg7^{fl/fl}</i> , Ap2-Cre	Adipocytes	Decreased mass of white adipose tissue and enhanced insulin sensitivity. Multilocular lipid droplet and accumulated mitochondria.
<i>Atg5^{fl/fl}</i> , Zp3-Cre	Oocytes	Death at the 8-cell stage.

Πηγή: Yoshinobu Ichimura and Masaaki Komatsu. Pathophysiological Role of Autophagy: Lesson from Autophagy-Deficient Mouse Models. *Exp. Anim.* 60(4), 329–345, 2011

Autophagy-deficient mouse models and human diseases linked to defects in specific autophagy genes

Autophagy gene and function (human/mouse)	Human disease linked to mutation/inactivation	Mouse model phenotype
<i>ATG16L/Atg16L</i>		
Atg16L complexes with conjugated Atg5–Atg12 to promote expansion and curvature of the nascent phagophore	<i>T300.4</i> mutation in <i>ATG16L</i> linked to Crohn's disease, discovered by GWAS	Loss of Atg16L1 inhibits autophagy in Paneth cells, reducing secretion of granules of antimicrobial peptides that influence intestinal microbiota and causing increased inflammation
<i>BECN1/Becn1</i>		
Beclin1 regulates the kinase activity of Vps34 at the ER; complex includes regulatory components UVRAG, Atg14L, Rubicon and Ambra	<i>BECN1</i> is mono-allelically deleted in breast, ovarian and prostate cancer	<i>Becn1</i> -null mice are embryonic lethal, showing a defect in cavitation of the blastocyst. <i>Becn1</i> heterozygotes are predisposed to lymphoma, hepatocellular carcinoma and other cancers
<i>UVRAG/Uvrage</i>		
UVRAG complexes with Beclin1 and Vps34 at the ER to promote autophagy	<i>UVRAG</i> is mono-allelically deleted in colon cancer	N/A
<i>IRGM/Irgm</i>		
Immunity-related GTPase stimulates autophagy and promotes clearance of pathogenic bacteria	Deletion of upstream regulatory sequences segregates with Crohn's disease and is associated with altered IRGM expression	N/A
<i>CLN3/Cln3</i>		
Associated with Golgi, endosomes and lipid rafts and may play a role in transporting ceramide and other sphingolipids to lipid rafts	Accumulation of proteolipids in children with Batten disease leads to neurodegeneration and is due to inactivation of the <i>CLN3</i> gene, which promotes autophagosome fusion with the lysosome	Immature autophagosomes in tissues from mice with knock-in of mutant forms of <i>Cln3</i>
<i>Parkin</i>		
A E3 ubiquitin ligase that localizes to the mitochondria and is required for mitophagy	Parkinson's disease (PD) is associated with cell death of dopaminergic neurons and progressive loss of cognitive and motor function. Mutation of several genes are linked to PD, including Parkin	N/A
<i>p62/SQSTM1</i>		
A multifunctional adaptor protein that promotes turnover of polyubiquitinated protein aggregates through interaction with LC3 at the autophagosome	p62 mutations are linked to Paget's disease in which increased bone turnover results in abnormal bone architecture. Associated with deregulated NF-κB signalling and reduced turnover of ubiquitinated proteins	<i>p62</i> -null mice are resistant to Ras-driven lung carcinogenesis. Loss of <i>p62</i> prevents accumulation of ubiquitin-positive protein aggregates in the liver and neurons of <i>Atg7</i> -deficient mice
<i>Lamp2</i>		
A lysosomal membrane protein required for fusion of the autophagosome with the lysosome	Danon disease is an X-linked disease resulting in hypertrophic cardiomyopathy and accumulation of autophagosomes in the heart muscle	Increased autophagosome numbers in multiple tissues, cardiomyopathy, skeletal myopathy, periodontitis associated with inflammation due to defective clearance of intracellular pathogens

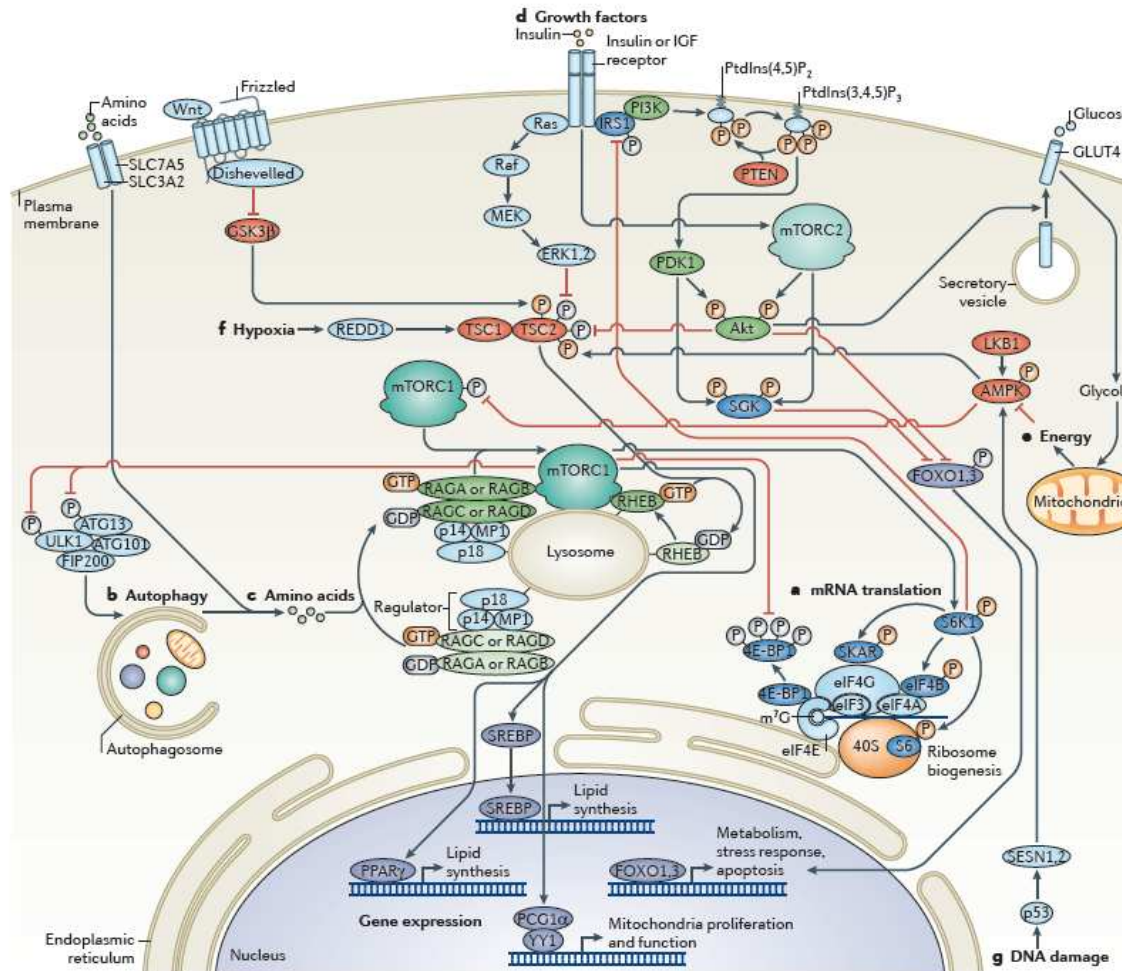
Πηγή: Danielle Glick, Sandra Barth and Kay F. Macleod. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010; 221(1): 3–12. doi:10.1002/path.2697.

Metabolic diseases potentially involving Autophagy

DISEASE	PATHOPHYSIOLOGIC CONSEQUENCES	THERAPEUTIC INTERVENTION
Diabetes	Decreased insulin production and hepatic insulin resistance	Increasing autophagy may help expand β -cell mass, provide resistance against stress and enhance hepatic insulin sensitivity.
Nonalcoholic fatty liver disease	Increased steatosis, hepatocyte injury and predisposition to cirrhosis and hepatic cancer	Increasing autophagy would help getting rid of liver fat and inflammation together with protection against tumorigenesis.
Pancreatitis	Increased cellular injury due to defective autophagy	Decreasing autophagy may help to prevent or treat pancreatitis.
Cardiovascular complications	Atherosclerosis	Increasing autophagy may safeguard plaque cells against cellular distress, in particular oxidative injury.
Hypercholesterolemia, Hypertriglyceridemia	Increased circulating and tissue cholesterol and triglycerides	Increasing autophagy may help to degrade hepatic triglyceride and regulate reverse cholesterol transport (RCT) from the macrophage.
Obesity	Hypertrophy in white adipose tissue	Regulated decrease in autophagy could be beneficial in limiting white adipose tissue mass and lipid content.

Πηγή: Rohit Anthony Sinha. Autophagy and its Role in Metabolism. Duke-NUS Graduate Medical School Laboratory of Hormonal Regulation, CVMD Program, 8 College Road, Singapore 018987. e-mail: rohit.sinha@duke-nus.edu.sg

Οδοί μεταγωγής μηνύματος της mTOR



Πηγή: Roberto Zoncu, Alejo Efeyan and David M. Sabatini. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Natura Reviews Molecular Cell Biology* 2010. AOP , doi:10.1038/nrm3025

Η πορεία της mTOR

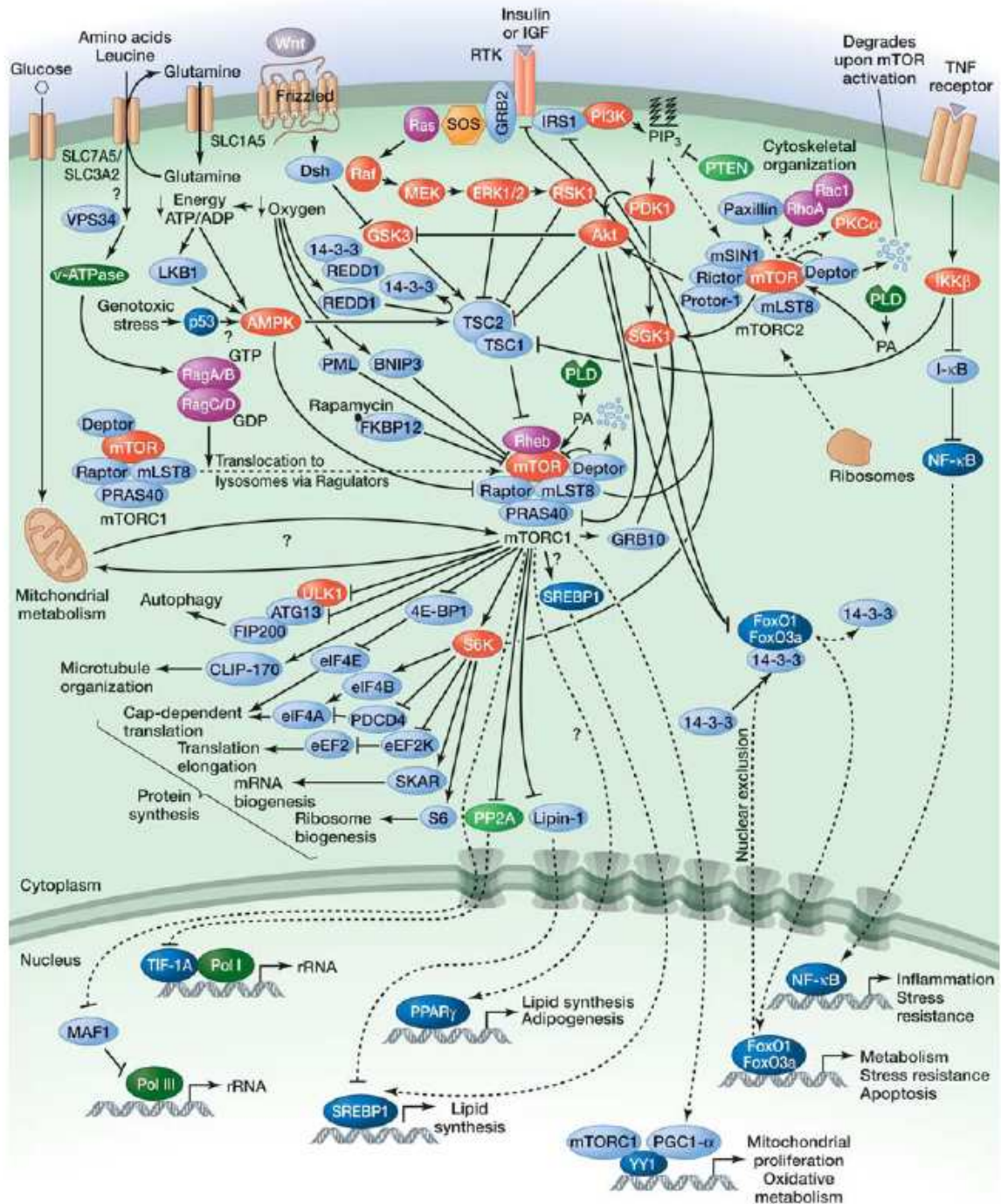
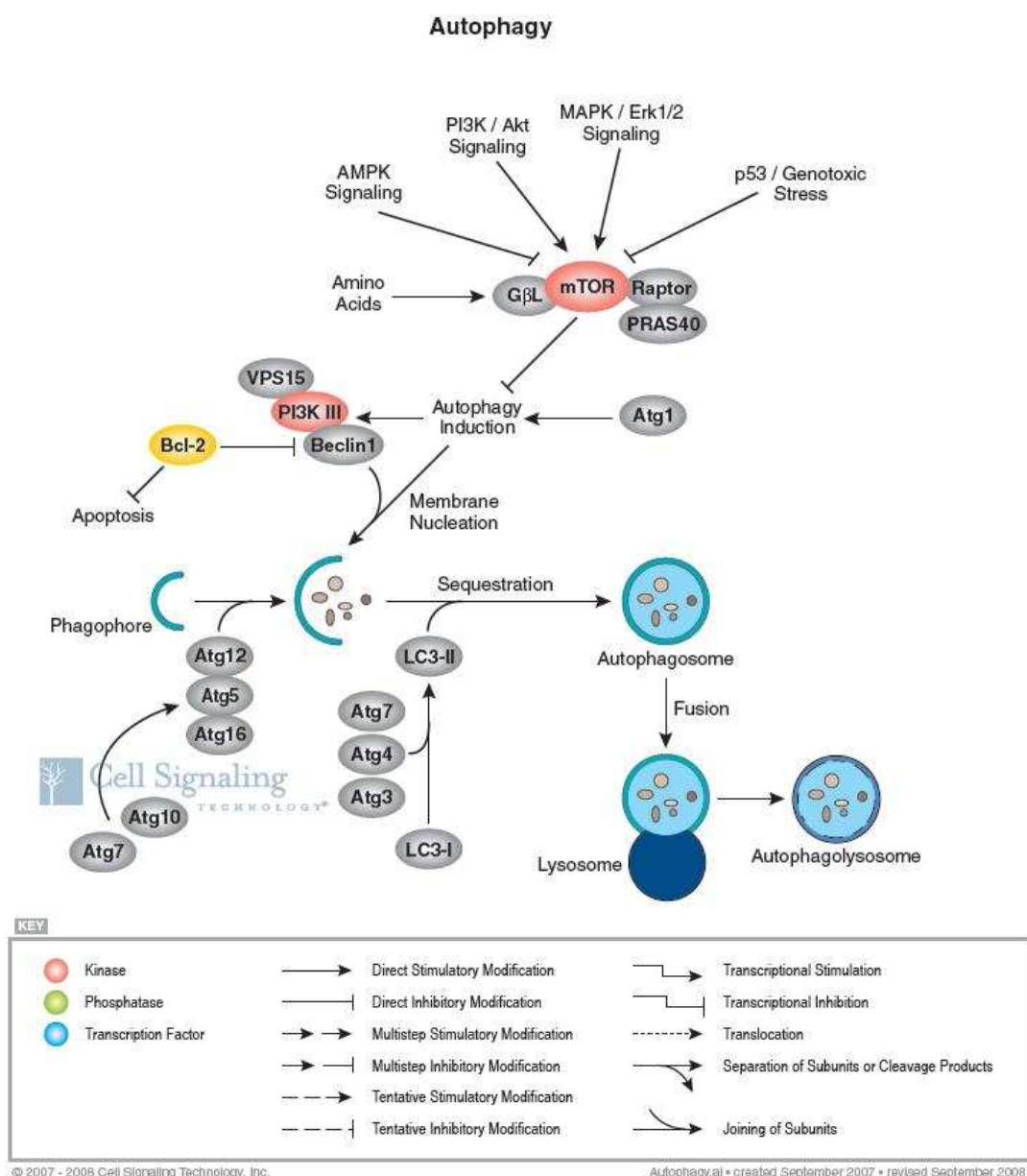


Figure 2. The mTOR pathway.

Πηγή: Mathieu Laplante and David M. Sabatini. mTOR Signaling. Advanced Online Article. Cite this article as Cold Spring Harb Perspect Biol doi: 10.1101/cshperspect.a011593



Πηγή: www.cellsignal.com

Table 1. Identification of Atg genes and their functions in mammals.

Autophagy-related gene (Atg) - products	
Mammalian Atg gene	Functions
ULK1, ULK2	Protein Kinase: Atg1-Atg13-Atg17-Atg29 complex
Atg2	Atg9/Atg2-Atg18 complex
Atg3	E2-like enzyme for Atg8s-lipidation
Atg4A,B,C,D	Cysteine protease: Atg8s-activation and delipidation
Atg5	Atg12-Atg5 conjugate: E3-like activity for Atg8s-lipidation
Beclin-1	Subunit of Vps34 PI3K complex
Atg7	E1-like enzyme for Atg12-and LC3-conjugation
LC3, GATE-16, GABARAP	Modifier: Conjugates to PE to localize to Autophagosome
Atg9L1, L2	Atg9 interacts Atg2-Atg18 complex: membrane-bound
Atg10	E2-like enzyme for Atg12-conjugation
Atg12	Modifier: Conjugates to Atg5
Atg13	mTor signaling: Atg1-Atg13-Atg17-Atg29 complex
Atg14	Subunit of Vps34 PI3K complex
Atg16L	Complex between Atg16 and Atg12-Atg5 conjugate
FIP200	Atg1-Atg13-Atg17-Atg29 complex
WIPI-1,2,3,4	Atg9/Atg2-Atg18 complex

Πηγή: Jong-Ok Pyo, Jihoon Nah and Yong-Keun Jung. Molecules and their functions in autophagy. *Exp. Mol. Med.* Vol. 44(2), 73-80, 2012

Links

Autophagy Database

<http://tp-app.genes.nig.ac.jp/autophagy/index.html>

TP Atlas system

<http://net.genes.nig.ac.jp/networkDB/Ctrl?CI=FBA3&lang=en>

Public Research Centre for Health, HADb Human Autophagy Database

<http://www.autophagy.lu/>

Reactome

<http://www.reactome.org/ReactomeGWT/entrypoint.html>

Kegg Pathway Database

<http://www.genome.jp/kegg/pathway/ko/ko04140.html>

Cell Signaling Technology

<http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Autophagy.html>

PhosphositePlus

<http://www.phosphosite.org/homeAction.do>

Biocarta

http://www.biocarta.com/pathfiles/h_mTORPathway.asp

Horst Ibelgauf's COPE: Cytokines and Cells Online Pathfinder Encyclopedia

<http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=KFERQ>

Science Watch

<http://sciencewatch.com/ana/st/autophagy/rfmap1/>

Autophagy on YouTube

http://www.youtube.com/watch?feature=player_embedded&v=ewgLd9N3s-4

<http://www.youtube.com/watch?v=r7GoZ9vFCY8&feature=relmfu>

<http://www.youtube.com/watch?v=muSA-5LG3gg&feature=related>

<http://www.youtube.com/watch?v=QLwWh7AHp1o&feature=related>

<http://www.youtube.com/watch?v=puEdyfy-vp0&feature=relmfu>

<http://www.youtube.com/watch?v=0kiZdHhCtZQ&feature=relmfu>

<http://www.youtube.com/watch?v=qskZq2-X7-I&feature=related>

7.2 Βιβλιογραφία

1. Alicia Meléndez and Thomas P. Neufeld. The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story. *Development* 2008; 135(14): 2347–2360. doi:10.1242/dev.016105.
2. Per E. Stromhaug and Daniel J. Klionsky. Review Approaching the molecular mechanism of autophagy. *Traffic* 2001; 2: 524-531
3. J. Fred Dice. Review Chaperone-Mediated Autophagy. *Autophagy* 2007; 3-4: 295-299
4. Patrick F. Finn and J. Fred Dice. Ketone bodies stimulate Chaperone-mediated Autophagy. *JBC* 2005; 280(27): 25864-25870
5. Usha Nair and Daniel J. Klionsky. Molecular mechanisms and regulation of specific and nonspecific autophagy pathways in yeast. *JBC* 2005; 280(51): 41785-41788
6. Sharon A. Tooze, Harold B. J. Jefferies, Eyal Kalie, Andrea Longatti, Fiona E. Mcalpine, Nicole C. Mcknight, Andrea Orsi, Hannah E. J. Polson, Minoo Razi, Deborah J. Robinson, and Jemma L. Webber. Critical Review Trafficking and signaling in mammalian autophagy. *Life* 2010; 62(7): 503–508
7. Anne Simonsen and Sharon A. Tooze. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J. Cell Biol.* 2009; 186(6): 773-782
8. Congcong He and Daniel J. Klionsky. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet.* 2009 ; 43: 67–93. doi:10.1146/annurev-genet-102808-114910
9. A Longatti and SA Tooze. Review Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell Death and Differentiation* 2009; 16: 956–965
10. T Yorimitsu and DJ Klionsky. Review Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death and Differentiation* 2005; 12: 1542–1552
11. Aniek van der Vaart, Muriel Mari and Fulvio Reggiori. Review A Picky Eater: Exploring the mechanisms of selective autophagy in human pathologies. *Traffic* 2008; 9: 281–289
12. R Kang, HJ Zeh, MT Lotze and D Tang. Review The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 2011; 18: 571–580
13. Brinda Ravikumar, Sovan Sarkar , Janet E. Davies, Marie Futter, Moises Garcia-Arencibia, Zeyn W. Green-Thompson , Maria Jimenez-Sanchez, Viktor I. Korolchuk, Maike Lichtenberg, Shouqing Luo, Dunecan C.O. Massey, Fiona M. Menzies, Kevin Moreau, Usha Narayanan, Maurizio Renna, Farah H. Siddiqi, Benjamin R. Underwood, Ashley R. Winslow and David C. Rubinsztein. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2010; 90: 1383–1435
14. Sharon A. Tooze and Minoo Razi. The essential role of early endosomes in autophagy is revealed by loss of COPI function. *Autophagy* 2009; 5-6: 874-875

15. Ya-ping Yang, Zhong-qin Liang, Zhen-lun Gu, Zheng-hong Qin. Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacologica Sinica* 2005; 26 (12): 1421–1434
16. Jong-Ok Pyo, Jihoon Nah and Yong-Keun Jung. Molecules and their functions in autophagy. *Exp. Mol. Med.* 2012; 44(2): 73-80
17. Fulvio Reggiori and Daniel J. Klionsky. Autophagy in the Eukaryotic cell. *Eukaryotic Cell* 2002; 1(1): 11–21
18. Chao-Ween Wang and Daniel Klionsky. The molecular mechanism of autophagy. *Molecularmedicine* 2003; 9(3-4): 65-76
19. Alicia Meléndez and Thomas P. Neufeld. The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story. *Development* 2008; 135: 2347-2360 doi:10.1242/dev.016105
20. Zhifen Yang and Daniel J. Klionsky. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2010; 22(2): 124–131. doi:10.1016/j.ceb.2009.11.014.
21. Brinda Ravikumar, Marie Futter, Luca Jahreiss, Viktor I. Korolchuk, Maike Lichtenberg, Shouqing Luo, Dunecan C. O. Massey, Fiona M. Menzies, Usha, Narayanan, Maurizio Renna, Maria Jimenez-Sanchez, Sovan Sarkar, Benjamin Underwood, Ashley Winslow and David C. Rubinsztein. Mammalian macroautophagy at a glance. *Journal of Cell Science* 2009; 122: 1707-1711 doi:10.1242/jcs.031773
22. Mathieu Laplante and David M. Sabatini. mTOR Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011 doi: 10.1101/cshperspect.a011593
23. Pankaj Kapahi, Di Chen, Aric N. Rogers, Subhash D. Katewa, Patrick Wai-Lun Li, Emma L. Thomas, and Lutz Kockel. With TOR less is more: a key role for the conserved nutrient sensing TOR pathway in aging. *Cell Metab.* 2010; 11(6): 453–465. doi:10.1016/j.cmet.2010.05.001.
24. Mathieu Laplante and David M. Sabatini. mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science* 2009; 122: 3589-3594, doi:10.1242/jcs.051011
25. Ian G. Ganley, DuH. Lam, Junru Wang, Xiaojun Ding, She Chen, and Xuejun Jiang. ULK1_ATG13_FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *JBC* 2009; 284(18): 12297-12305
26. Nao Hosokawa, Taichi Hara, Takeshi Kaizuka, Chieko Kishi, Akito Takamura, Yutaka Miura, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Kenji Takehana, Naoyuki Yamada, Jun-Lin Guan, Noriko Oshiro, and Noboru Mizushima. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1–Atg13–FIP200 complex required for autophagy. *Molecular Biology of the Cell* 2009; 20: 1981–1991

27. Chang Hwa Jung, Seung-Hyun Ro, Jing Cao, Neil Michael Otto and Do-Hyung Kim. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* 2010; 584(7): 1287–1295. doi:10.1016/j.febslet.2010.01.017.
28. Shomit Sengupta, Timothy R. Peterson and David M. Sabatini. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Molecular Cell* 2010; 40: 310–322. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.026
29. Mathieu Laplante and David M. Sabatini. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012; 149: 274–293 doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017
30. Brendan D. Manning and Lewis C. Cantley. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007; 129(7): 1261–1274. doi:10.1016/j.cell.2007.06.009.
31. Roberto Zoncu, Alejo Efeyan and David M. Sabatini. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* | AOP, published online 15 December 2010; doi:10.1038/nrm3025
32. Daniel F. Egan, David B. Shackelford, Maria M. Mihaylova, Sara R. Gelino, Rebecca A. Kohnz, William Mair, Debbie S. Vasquez, Aashish Joshi, Dana M. Gwinn, Rebecca Taylor, John M. Asara, James Fitzpatrick, Andrew Dillin, Benoit Viollet, Mondira Kundu, Malene Hansen, and Reuben J. Shaw. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science.* 2011; 331(6016): 456–461. doi:10.1126/science.1196371.
33. Libin Shang, She Chen, Fenghe Du, Shen Li, Liping Zhao and Xiaodong Wang. Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *PNAS* 2011; 108(12): 4788–4793 doi:10.1073/pnas.1100844108
34. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of ULK1. *Nat Cell Biol.* 2011;13(2):132–41.
35. Sebastian Alers, Antje S Löffler, Sebastian Wesselborg and Björn Stork. The incredible ULKs. *Cell Communication and Signaling* 2012; 10:7 <http://www.biosignaling.com/content/10/1/7>
36. Rajat Singh and Ana Maria Cuervo. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metabolism* 2011; 13: 495–504 doi: 10.1016/j.cmet.2011.04.004
37. Löffler AS, Alers S, Dieterle AM, Keppeler H, Franz-Wachtel M, Kundu M, Campbell DG, Wesselborg S, Alessi DR, Stork B. ULK1-mediated phosphorylation of AMPK constitutes a negative regulatory feedback loop. *Autophagy.* 2011;7(7):696–706
38. Maria Høyer-Hansen, Lone Bastholm, Piotr Szyniarowski, Michelangelo Campanella, György Szabadkai, Thomas Farkas, Katuscia Bianchi, Nicole Fehrenbacher, Folmer

- Elling, Rosario Rizzuto, Ida Stenfeldt Mathiasen, and Marja Ja“ a“ ttela“. Control of macroautophagy by Calcium, Calmodulin-Dependent Kinase Kinase-b, and Bcl-2. *Molecular Cell* 2007; 25: 193–205, doi: 10.1016/j.molcel.2006.12.009
39. Paul Nicklin, Philip Bergman, Bailin Zhang, Ellen Triantafellow, Henry Wang, Beat Nyfeler, Haidi Yang, Marc Hild, Charles Kung, Christopher Wilson, Vic E. Myer, Jeffrey P. MacKeigan, Jeffrey A. Porter, Y. Karen Wang, Lewis C. Cantley, Peter M. Finan, and Leon O. Murphy. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 2009; 136: 521–534, doi: 10.1016/j.cell.2008.11.044
 40. Joseph Avruch, Xiaomeng Long, Sara Ortiz-Vega, Joseph Rapley, Angela Papageorgiou, and Ning Dai, Amino acid regulation of TOR complex 1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: 592–602 doi:10.1152/ajpendo.90645.2008.
 41. Lijun Yan, Virginie Mieulet¹ and Richard F. Lamb. Nutrient regulation of mTORC1 and cell growth. *Cell Cycle* 2010; 9(13): 2473-2474 doi: 10.4161/cc.9.13.12124
 42. Greg M. Findlay, Lijun Yan, Julia Procter, Virginie Mieulet and Richard F. Lamb. A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling. *Biochem. J.* 2007; 403: 13–20 doi:10.1042/BJ20061881
 43. Takahiro Nobukuni, Manel Joaquin, Marta Roccio, Stephen G. Dann, So Young Kim, Pawan Gulati, Maya P. Byfield, Jonathan M. Backer, Francois Natt, Johannes L. Bos, Fried J. T. Zwartkruis, and George Thomas. Amino acids mediate mTOR_raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *PNAS* 2005; 102 (40):14238-14243 doi:10.1073_pnas.0506925102
 44. James Brugarolas, Kui Lei, Rebecca L. Hurley, Brendan D. Manning, Jan H. Reiling, Ernst Hafen, Lee A. Witters, Leif W. Ellisen, and William G. Kaelin Jr. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes & Development* 2004; 18:2893–2904 doi:10.1101/gad.1256804.
 45. Ju Huang, Grace Y. Lam, and John H. Brumell. Autophagy signaling through Reactive Oxygen Species. *Antioxidants and Redox Signaling* 2011; 14(11): 2215-2231 doi: 10.1089=ars.2010.3554
 46. Ruth Scherz-Shouval, Elena Shvets, Ephraim Fass, Hagai Shorer, Lidor Gil and Zvulun Elazar. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO Journal* 2007; 26: 1749–1760
 47. Pawan Gulati, Lawrence D. Gaspers, Stephen G. Dann, Manel Joaquin, Takahiro Nobukuni, Francois Natt, Sara C. Kozma, Andrew P. Thomas, and George Thomas. Amino acids activate mTOR complex 1 via Ca²⁺/CaM signaling to hVps34. *Cell Metabolism* 2008;7: 456–465 doi: 10.1016/j.cmet.2008.03.002

48. Sovan Sarkar, David C. Rubinsztein. Inositol and IP3 levels regulate autophagy, Biology and therapeutic speculations. *Autophagy* 2006; 2(2): 132-134
49. M Høyer-Hansen¹ and M Jäättelä². Review Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death and Differentiation* 2007; 14: 1576–1582
50. Andrea Williams, Sovan Sarkar, Paul Cuddon, Evangelia K Ttofi, Shinji Saiki, Farah H Siddiqi, Luca Jahreiss, Angeleen Fleming, Dean Pask, Paul Goldsmith, Cahir J O’Kane, Rodrigo Andres Floto & David C Rubinsztein. Novel targets for Huntington’s disease in an mTOR independent autophagy pathway. *Nature chemical biology* 2008; 14: 295-305 doi:10.1038/nchembio.79
51. Alfred J. Meijer, Patrice Codogno. Autophagy: Regulation and role in disease. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2009; 46(4): 210–240. doi: 10.1080/10408360903044068
52. Thomas P. Neufeld. TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds. *Curr Opin Cell Biol.* 2010; 22(2): 157–168. doi:10.1016/j.ceb.2009.11.005.
53. C Liang. Negative regulation of autophagy. *Cell Death Differ.* 2010; 17(12): 1807–1815. doi:10.1038/cdd.2010.115.
54. Itay Koren, Eran Reem and Adi Kimchi. Autophagy gets a brake. DAP1, a novel mTOR substrate, is activated to suppress the autophagic process. *Autophagy* 2010; 6(8): 1179-1180
55. Itay Koren, Eran Reem and Adi Kimchi. DAP1, a novel substrate of mTOR, negatively regulates autophagy. *Current Biology* 2010; 20: 1093–1098
56. Kathryn G. Foster and Diane C. Fingar. Mammalian Target of Rapamycin (mTOR): Conducting the cellular signaling symphony. *The Journal of Biological Chemistry* 2010; 285(19): 14071–14077
57. Noboru Mizushima, Akitsugu Yamamoto, Makoto Matsui, Tamotsu Yoshimori, and Yoshinori Ohsumi. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular Biology of the Cell* 2004; 15: 1101–1111
58. Joshua D. Rabinowitz and Eileen White. Autophagy and metabolism. *Science* 2010; 330(6009): 1344–1348. doi:10.1126/science.1193497.
59. Russell L. Deter, Pierre Baudhuin, and Christian De Duve. Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. *Communications* 1967:11-16
60. P Codogno and AJ Meijer. Review Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death and Differentiation* 2005; 12: 1509–1518

61. Li Yu, Christina K. McPhee, Lixin Zheng, Gonzalo A. Mardones, Yueguang Rong, Junya Peng, Na Mi, Ying Zhao, Zhihua Liu, Fengyi Wan, Dale W. Hailey, Viola Oorschot, Judith Klumperman, Eric H. Baehrecke and Michael J. Lenardo. Autophagy termination and lysosome reformation regulated by mTOR. *Nature*. 2010; 465(7300): 942–946. doi:10.1038/nature09076.
62. Rajat Singh and AnaMaria Cuervo. Lipophagy: Connecting autophagy and lipid metabolism. *International Journal of Cell Biology* 2012, Article ID 282041, doi:10.1155/2012/282041
63. Julian J. Lum, Daniel E. Bauer, Mei Kong, Marian H. Harris, Chi Li, Tullia Lindsten and Craig B. Thompson. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 2005; (120): 237–248
64. Jun Onodera and Yoshinori Ohsumi. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(36): 31582–31586 doi: 10.1074/jbc.M506736200
65. Julia Kovsan, Nava Bashan, Andrew S. Greenberg, and Assaf Rudich. Potential role of autophagy in modulation of lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298: E1–E7
66. Mark J. Czaja. Autophagy in health and disease. 2. Regulation of lipid metabolism and storage by autophagy: pathophysiological implications. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 298: C973–C978
67. Yi Guo¹, Kimberly R. Cordes, Robert V. Farese, Jr and Tobias C. Walther. Lipid droplets at a glance. *Journal of Cell Science* 2009;122: 749-752 doi:10.1242/jcs.037630
68. Hiroshi Koga, Susmita Kaushik, and Ana Maria Cuervo. Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *FASEB J*. 2010; 24: 3052–3065
69. Rajat Singh, Susmita Kaushik, Yongjun Wang, Youqing Xiang, Inna Novak, Masaaki Komatsu, Keiji Tanaka, Ana Maria Cuervo and Mark J. Czaja. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 2009; 458(7242): 1131–1135. doi:10.1038/nature07976.
70. Rajat Singh, Youqing Xiang, Yongjun Wang, Kiran Baikati, Ana Maria Cuervo, Yen K. Luu, Yan Tang, Jeffrey E. Pessin Gary J. Schwartz, and Mark J. Czaja. Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J. Clin. Invest.* 2009; 119:3329–3339 doi:10.1172/JCI39228.
71. Yong Zhang, Scott Goldman, Rebecca Baerga, Yun Zhao, Masaaki Komatsu, and Shengkan Jin. Adipose-specific deletion of autophagy-related gene7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis. *PNAS*, 2009; 106(47): 19860-19865 doi:10.1073_pnas.0906048106

72. Jan Nedergaard, Tore Bengtsson, and Barbara Cannon. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E444–E452
73. Kirsi A. Virtanen, Martin E. Lidell, Janne Orava, Mikael Heglind, Rickard Westergren, Tarja Niemi, Markku Taittonen, Jukka Laine, Nina-Johanna Savisto, Sven Enerb and Pirjo Nuutila. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 2009;360:1518-25.
74. Martino L, Masini M, Novelli M, Beffy P, Bugliani M, et al. Palmitate activates autophagy in INS-1E b-Cells and in isolated rat and human pancreatic islets. *PLoS ONE* 2012; 7(5): e36188 doi:10.1371/journal.pone.0036188
75. Shi Hao Tan, Guanghou Shui, Jing Zhou, Jasmine Jia'En Li, Boon-Huat Bay, Markus R Wenk, Han-Ming Shen. Induction of autophagy by palmitic acid via a PKC-mediated signalling pathway independent of mTOR. *JBC Papers in Press*. Published on March 9, 2012 as Manuscript M111.294157 The latest version is at <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M111.294157>
76. Ze-fang Chen, Yan-bo Li, Jun-yong Han, Jing Wang, Jia-jing Yin, Jing-bo Li and Hui Tian. The double-edged effect of autophagy in pancreatic beta cells and diabetes. *Autophagy* 2011; 7(1): 12-16
77. Kedi Xu , Yi Yang , Ming Yan , Jianan Zhan , Xiao Fu, and Xiaoxiang Zheng. Autophagy plays a protective role in free cholesterol overload-induced death of smooth muscle cells. *J. Lipid Res.* 2010; 51: 2581–2590.
78. Rajat Singh. Hypothalamic lipophagy and energetic balance. *Aging*, 2011; 3(10): 934-942
79. Be´ renge` re Coupe´ , Yuko Ishii, Marcelo O. Dietrich, Masaaki Komatsu, Tamas L. Horvath, and Sebastien G. Bouret. Loss of autophagy in pro-opiomelanocortin neurons perturbs axon growth and causes metabolic dysregulation. *Cell Metabolism* 2012; 15: 247–255 doi:10.1016/j.cmet.2011.12.016
80. J. Julie Wu, Celia Quijano, Jiamei Wang and Toren Finkel. Metabolism meets autophagy. *Cell Cycle* 2010; 9(24): 4780-4781
81. Yoshio Fujitani, Takashi Ueno, and Hirotaka Watada. Autophagy in health and disease. 4. The role of pancreatic β -cell autophagy in health and diabetes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299: C1–C6
82. Chie Ebato, Toyoyoshi Uchida, Masayuki Arakawa, Masaaki Komatsu, Takashi Ueno, Koji Komiya, Kosuke Azuma, Takahisa Hirose, Keiji Tanaka, Eiki Kominami, Ryuzo Kawamori, Yoshio Fujitani and Hirotaka Watada. Autophagy is important in islet

- homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metabolism* 2008;8: 325–332
83. Hye Seung Jung and Myung-Shik Lee. Macroautophagy in homeostasis of pancreatic β -cell. *Autophagy* 2009; 5(2): 241-243
 84. Brad J. Marsh, Chad Soden, Cristina Alarco' n, Barton L. Wicksteed, Kazuro Yaekura, Adam J. Costin, Garry P. Morgan, and Christopher J. Rhodes. Regulated autophagy controls hormone content in secretory-deficient pancreatic endocrine β -cells. *Molecular Endocrinology* 2007; 21: 2255–2269
 85. J. Julie Wu et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress mediate the physiological impairment induced by the disruption of autophagy. *Aging* 2009; 1(4): 425-437
 86. Matilde Masini, Roberto Lupi, Marco Bugliani, Ugo Boggi, Franco Filipponi, Pellegrino Masiello and Piero Marchetti. A role for autophagy in β -cell life and death. *Islets* 2009; 1-2: 157-159
 87. Kei Fujimoto, Piia T. Hanson, Hung Tran, Eric L. Ford, Zhiqiang Han, James D. Johnson, Robert E. Schmidt, Karen G. Green, Burton M. Wice, and Kenneth S. Polonsky. Autophagy regulates pancreatic beta cell death in response to Pdx1 deficiency and nutrient deprivation. *HE Journal of Biological Chemistry* 2009; 284(40): 27664–27673
 88. Yoshio Fujitani, Ryuzo Kawamori and Hiroataka Watada. The role of autophagy in pancreatic β -cell and diabetes. *Autophagy* 2009; 5(2): 280-282
 89. Dalibor Mijaljica, Mark Prescott and Rodney J. Devenish. The intriguing life of autophagosomes. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13: 3618-3635 doi:10.3390/ijms13033618
 90. Reuben J. Shaw. LKB1 and AMPK control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009; 196(1): 65–80 doi:10.1111/j.1748-1716.2009.01972.x.
 91. Meng Q, Cai D. Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the IkappaB kinase beta (IKKbeta)/NF-kappaB pathway. *J Biol Chem*. 2011 16;286(37):32324-32.
 92. Tony KT Lam, Gary J Schwartz and Luciano Rossetti. Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nature Neuroscience* 2005; 18(5): 579-584 doi:10.1038/nn1456
 93. Las G, Serada SB, Wikstrom JD, Twig G, Shirihai OS. Fatty acids suppress autophagic turnover in β -cells. *J Biol Chem*. 2011, 9;286(49):42534-44.
 94. Kotoulas OB, Kalamidas SA, Kondomerkos DJ. Glycogen autophagy in glucose homeostasis. *Pathol Res Pract*. 2006;202(9):631-8.
 95. K. Κανταρτζής. Μοριακοί μηχανισμοί έκκρισης ινσουλίνης από το β -κύτταρο. *Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά* 2009; 22(2): 94-97

96. Cheng J, Ohsaki Y, Tauchi-Sato K, Fujita A, Fujimoto T. Cholesterol depletion induces autophagy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 351(1):246-52.
97. Rajat Singh, Autophagy in the control of food intake. *Adipocyte* 2012; 1(2)
98. Shuang Mei, Hong-Min Ni, Sharon Manley, Abigail Bockus, Karen M. Kassel, James P. Luyendyk, Bryan L. Copple and Wen-Xing Ding. Differential roles of unsaturated and saturated fatty acids on autophagy and apoptosis in hepatocytes. *JPET* 2011; 339(2): 487-498 doi:10.1124/jpet.111.184341.
99. Claudio D. Gonzalez, Myung-Shik Lee, Piero Marchetti, Massimo Pietropaolo, Roberto Towns, Maria I. Vaccaro, Hirota Watada and John W. Wiley. The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Autophagy* 2011; 7(1): 2-11
100. Shibata M, Yoshimura K, Furuya N, Koike M, Ueno T, Komatsu M, Arai H, Tanaka K, Kominami E, Uchiyama Y. The MAP1-LC3 conjugation system is involved in lipid droplet formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 382(2): 419-23.
101. Scott Goldman, Yong Zhang, and Shengkan Jin. Autophagy and adipogenesis Implications in obesity and type II diabetes. *Autophagy*. 2010; 6(1): 179–181.
102. A. M. Cuervo, E. Knecht, S. R. Terlecky and J. F. Dice. Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am J Physiol Cell Physiol* 1995; 269(5): C1200-C1208
103. Hansen M, Chandra A, Mitic LL, Onken B, Driscoll M, et al. A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in *C. elegans*. *PLoS Genet* 2008; 4(2): e24 doi:10.1371/journal.pgen.0040024
104. Leonard Guarente and Frédéric Picard. Calorie restriction—the SIR2 connection. *Cell* 2005; 120: 473–482
105. Adrienne M. Hannigan and Sharon M. Gorski. Macroautophagy: The key ingredient to a healthy diet? *Autophagy*. 2009; 5(2): 140–151.
106. Keith Singletary and John Milner. Diet, autophagy, and cancer: A Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17:1596-1610. doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-2917
107. Ana Maria Cuervo, Ettore Bergamini, Ulf T Brunk, Wulf Dröge, Martine Ffrench, Alexei Terman. Autophagy and aging The importance of maintaining “clean” cells. *Autophagy* 2005; 1-3: 131-140
108. Kueck A, Opipari AW Jr, Griffith KA, Tan L, Choi M, Huang J, Wahl H, Liu JR. Resveratrol inhibits glucose metabolism in human ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol*. 2007; 107(3):450-7.
109. Narasimman Gurusamy, Istvan Lekli, Subhendu Mukherjee, Diptarka Ray, Md. Kaimul Ahsan, Mihaela Gherghiceanu, Lawrence M. Popescu, and Dipak K. Das. Cardioprotection

- by resveratrol: a novel mechanism via autophagy involving the mTORC2 pathway. *Cardiovascular Research* 2010; 86: 103–112 doi:10.1093/cvr/cvp384
110. L. Kathleen Mahan, Sylvia Escott-Stump. Krause's Food, nutrition and diet therapy
 111. Seyun Kim, et al. Amino acid signaling to mTOR mediated by inositol polyphosphate multikinase. *Cell Metabolism* 2011; 13: 215–221 doi: 10.1016/j.cmet.2011.01.007
 112. Chang Hwa Jung, Minchul Seo, Neil Michael Otto and Do-Hyung Kim. ULK1 inhibits the kinase activity of mTORC1 and cell proliferation. *Autophagy* 2011; 7-10: 1212-1221
 113. Susmita Kaushik, Urmi Bandyopadhyay, Sunandini Sridhar, Roberta Kiffin, Marta Martinez-Vicente, Maria Kon, Samantha J. Orenstein, Esther Wong and Ana Maria Cuervo. Chaperone-mediated autophagy at a glance. *Journal of Cell Science* 2011; 124: 495-499
 114. Daniel J. Klionsky. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Molecular Cell Biology* 2007; 8: 931-937
 115. Danielle Glick, Sandra Barth and Kay F. Macleod. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010; 221(1): 3–12 doi:10.1002/path.2697.
 116. Yasuo Uchiyama, Masahiro Shibata, Masato Koike, Kentaro Yoshimura, Mitsuho Sasaki. Autophagy–physiology and pathophysiology. *Histochem Cell Biol* 2008; 129: 407–420
 117. Zhifen Yang and Daniel J. Klionsky. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009 ; 335: 1–32 doi:10.1007/978-3-642-00302-8_1.
 118. Maryam Mehrpour, Audrey Esclatine, Isabelle Beau, Patrice Codogno. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Research* 2010; 20: 748-762.
 119. Congcong He and Beth Levine. The Beclin 1 interactome. *Curr Opin Cell Biol.* 2010; 22(2): 140–149 doi:10.1016/j.ceb.2010.01.001.
 120. Etienne Caron, Samik Ghosh, Yukiko Matsuoka, Dariel Ashton-Beaucage, Marc Therrien, Se´bastien Lemieux, Claude Perreault, Philippe P Roux and Hiroaki Kitano. A comprehensive map of the mTOR signaling network. *Molecular Systems Biology* 2010; 6:453
 121. Mhairi C. Towler and D. Grahame Hardie. AMP-activated protein Kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circulation Research* 2007; 100: 328-341
 122. Savitha Sridharan, Kirti Jain and Alakananda Basu. Regulation of autophagy by kinases. *Cancers* 2011; 3: 2630-2654 doi:10.3390/cancers3022630
 123. Yu-Yun Chang, Ga´ bor Juha´ sz, Pankuri Goraksha-Hicks, Andrew M. Arsham, Daniel R. Mallin, Laura K. Muller and Thomas P. Neufeld. Nutrient-dependent regulation of

- autophagy through the target of rapamycin pathway. *Biochem. Soc. Trans.* 2009; 37: 232–236 doi:10.1042/BST0370232
124. Kaipeng Jing^{1,3} and Kyu Lim. Why is autophagy important in human diseases? *Exp. Mol. Med.* 2012; 44(2):, 69-72
 125. Noboru Mizushima, Beth Levine, Ana Maria Cuervo, Daniel Klionsky. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008; 451: 1069-1075 doi:10.1038/nature06639
 126. Julia Kopsan, Matthias Bluher, Tanya Tarnovscki, Nora Klotting, Boris Kirshtein, Liron Madar, Iris Shai, Rachel Golan, Ilana Harman-Boehm, Michael R. Schoon, Andrew S. Greenberg, Zvulun Elazar, Nava Bashan, and Assaf Rudich. Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: E268–E277
 127. Eva Masiero, Lisa Agatea, Cristina Mammucari, Bert Blaauw, Emanuele Loro, Masaaki Komatsu, Daniel Metzger, Carlo Reggiani, Stefano Schiaffino and Marco Sandri. Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metabolism* 2009; 10: 507–515 doi: 10.1016/j.cmet.2009.10.008