

HÜCRE KORUYUCU BİR MEKANİZMA: OTOFAJİ
A CYTOPROTECTIVE MECHANISM: AUTOPHAGY

Narin LİMAN^{1*}, Duygu Cemre SUNA²

¹Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

² Kayseri

ÖZ

Otofaji (kendini yeme) hasarlı hücresel proteinleri ve organelleri ortadan kaldıran evrimsel bir süreçtir. Otofaji uyarılınca bozunuma uğrayan sitoplazma ve organeller veziküller içine alınır. Şekillenen veziküller mayalarda vakuole, memeli hücrelerinde lizozoma gönderilir. Açlık veya oksidatif stres gibi durumlarda ya da normal koşullar altında makromoleküllerin bozunumu ve besin dengesinin sağlanması otofaji aracılığıyla düzenlenir. Ökaryotik hücrelerde otofaji, oluşma şekline göre makro-otofaji, mikro-otofaji ve şaperon aracılı otofaji olarak sınıflandırılır. Bunların hepsi lizozomda sitosolik bileşenlerin proteolitik bozunmasını teşvik eder ve otofajiye bağlı genler ve bunlarla ilişkili enzimler aracılığıyla düzenlenirler. Makro-otofaji ve mikro-otofaji bağımlı lizozomal/vakuoler yıkım süreci ya seçici olmaz (non-selektif) ya da seçicidir (selektif). Şaperon aracılı otofaji yanlış katlanmış veya yanlışlıkla oluşturulmuş sitosolik proteinleri indirgemek için kullanılan bir seçici otofajidir. Seçici olmayan makro-otofajide sitoplazma otofagozom oluşumuyla, mikro-otofajide ise çözünebilir intrasellüler substratlar boru biçimindeki invaginasyonlarla lizozom/vakuol içine alınır. Seçici makro- ya da mikro-otofaji sayısı artan ya da hasar görmüş olan çeşitli organeller ile invaziv mikropları hedef alır. Bu durumda otofaji kargo içeriğine göre retikulofoaji veya ERfoaji, pekfzofoaji, mitofajı, lipofajı, zimofajı, nükleofajı, ribofajı, agrefajı ve ksenofajı gibi özel isimlerle tanımlanır. Bu derlemede doğru hücre fonksiyonları korumak için hasarlı organelleri, protein yığınlarını ve hücre içi patojenleri yok eden bir sitoprotektif program olarak işlev gören otofaji ele alınmıştır.

ABSTRACT

Autophagy (self-eating) is an evolutionary process that removes damaged cellular proteins and organelles. When autophagy is induced, degrading cytoplasm and organelles are taken up into vesicles. These vesicles are sent to the vacuolated or lysosomes in the yeast and mammalian cells, respectively. Provision of degradation of macromolecules and nutrient balance under stress conditions, such as starvation or oxidative stress or under normal conditions, is regulated by autophagy. In eukaryotic cells, autophagy is classified as macro-autophagy, micro-autophagy and chaperone-mediated autophagy according to the formation pattern. All of these promote the proteolytic degradation of cytosolic components in the lysosome and are regulated by autophagy-linked genes and their associated enzymes. Macro-autophagy and micro-autophagy dependent lysosomal/vacuolar degradation processes are either non-selective or selective (selective). Chaperone-mediated autophagy is a selective autophagy used to reduce unfolded or misfolded cytosolic proteins. In the non-selective macro-autophagy, the cytoplasm is incorporated into the lysosome/vacuole by autophagosome, while in the micro-autophagy the soluble intracellular substrates are introduced into the lysosome/vacuole via tubular invaginations. The selective macro- or micro-autophagy target invasive microorganisms with various organelles that are either increased in number or damaged. In this case, autophagy is defined by special names such as reticulophagy or ERphagy, pexophagy, mitophagy, lipophagy, zimophagy, nucleophagy, ribophagy, aggrephagy and ksenophagy, according to the contents of the cargo. This review focuses on autophagy that functions as a cytoprotective program that destroys damaged organelles, protein deposits and intracellular pathogens in order to preserve the correct cellular functions.

Anahtar kelimeler: Otofaji, lizozom, vakuol, ULK1, TOR

Keywords: Autophagy, lysosome, vacuole, ULK1, TOR

Makale Geliş Tarihi : 10.07.2017
Makale Kabul Tarihi: 26.09.2017

Corresponding Author: Prof. Dr. Narin LİMAN,
Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve
Embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri 38039

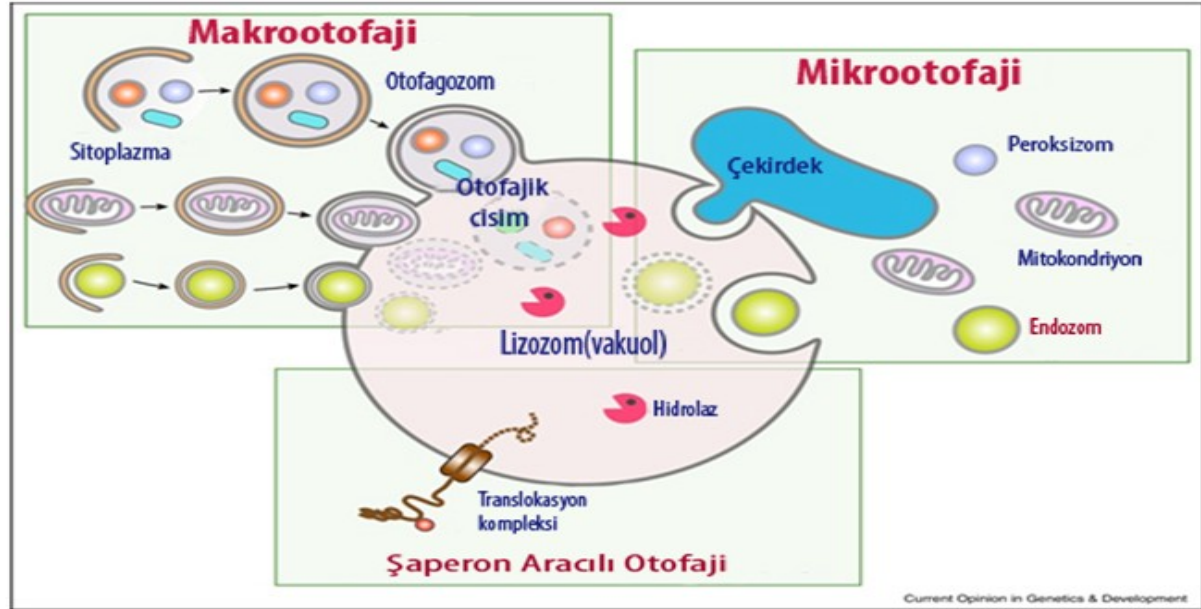
GİRİŞ

'Otofaji' terimi, Yunanca kökenli bir terim olup 'kendini yeme' anlamına gelmektedir. İlk olarak 1963 yılında Christian de Duve tarafından sıçan karaciğer epitel hücrelerinde keşfedilmiştir (1). 2016 Nobel Tıp Ödülü'nün otofajiyi düzenleyen mekanizmaları keşfeden ve aydınlatan Japon bilim adamı Yoshinori Ohsumi'ye verilmesiyle güncel bir konu haline gelmiştir. Otofaji hasarlı hücrel proteinleri ve organelleri ortadan kaldıran evrimsel bir süreçtir (2). Hücre içeriğinin parçalanması ve geri dönüştürülmesinin başlıca yoludur (3). Otofaji indüklenince, bozunuma uğrayan sitoplazma ve organeller veziküller içine alınır ve mayalarda vakuole, memeli hücrelerinde ise lizozoma gönderilir (3). Otofaji açıklık, düşük oksijen seviyeleri ve büyüme faktörü yetersizliği gibi bazı olumsuz koşulların yanı sıra normal koşullar altındaki hücrelerde de bazal bir seviyede oluşur. Bu koşullar altında otofaji, sitoplazmik içerikleri geri dönüştürerek hücrel homeostazı korumaya yardımcı olan bir sitoprotektif program olarak işlev görür. Otofajinin bu şekli seçici olmayan (non-selektif) otofaji olarak tanımlanır (4). Otofajinin diğer bir fonksiyonu,

ken, ikincisi sitosolik bileşenlerin yapısal devinimi için önemlidir (3). Makro-otofaji ve mikro-otofaji bağımlı lizozomal/vakuoler yıkım süreci ya seçici olmaz (non-selektif) ya da seçicidir (selektif). Şaperon aracılı otofaji bir seçici otofajidir. Seçici olmayan makro-otofaji sitoplazmanın otofagozom oluşumuyla, mikro-otofaji ise çözünebilir intrasellüler substratların boru biçimindeki invaginasyonlarla lizozom/vakuol içine alınmasıdır ve memeli hücrelerinde düzenli olarak gözlenir. Bununla birlikte, seçici makro- ya da mikro-otofaji özellikle sayısı artan ya da hasar görmüş olan çeşitli organeller ile invaziv mikropları hedef alırlar. Seçici makro- ve mikro-otofaji kargo içeriğine göre retikulofofaji veya ERfaji (endoplazma retikulumu), pekszofofaji (peroksizom), mitofaji (mitokondriyon), lipofaji (lipid damlacıkları), zimofaji (zimogen granüller) nükleofaji (çekirdek parçaları), ribofaji (ribozomlar), agrefaji (protein yığınları) ve ksenofaji (patojenler) gibi özel isimlerle tanımlanır (12-14) (Şekil 1).

2.1.Makro-Otofaji

Otofajinin bir hücre sağ kalımı mekanizması olduğu



Şekil 1. Otofaji çeşitleri (14) .

doğru hücrel fonksiyonları korumak için hasarlı organelleri, protein yığınlarını ve hücre içi patojenleri yok etmektir. Bu tür otofaji ise seçici (selektif) otofaji olarak adlandırılır (3,5).

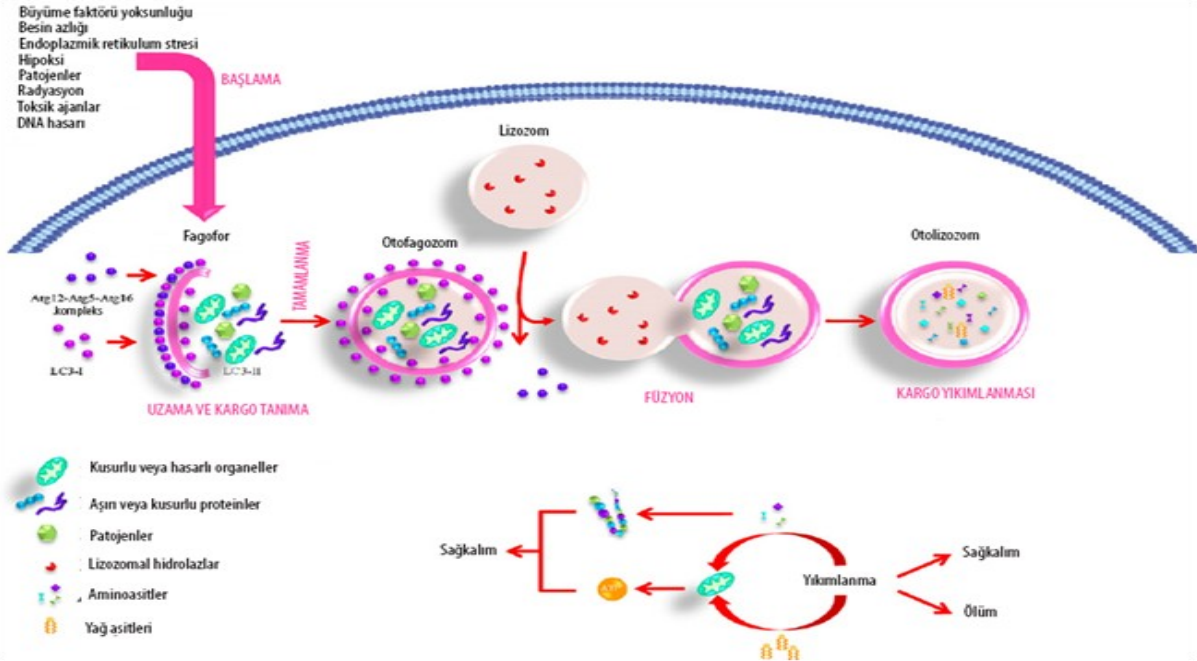
1. Otofaji Çeşitleri

Ökaryotik hücrelerde otofaji oluşma şekline göre makro-otofaji, mikro-otofaji ve şaperon aracılı otofaji olarak sınıflandırılır (6,7). Bunların hepsi lizozomda sitosolik bileşenlerin proteolitik bozunmasını teşvik eder ve otofaji ile ilişkili genler (Atg) ve bunlar aracılı enzimler vasıtasıyla düzenlenir (8-11). Aksi belirtilmediği sürece "otofaji" terimi genellikle makro-otofajiyi belirtir. Bunların yanısıra otofajinin çeşitli rollerini anlamak için, makro-otofajiyi "indüklenmiş otofaji" ve "bazal otofaji" olarak alt sınıflara ayırmak yararlı olabilir. Birincisi, açıklığın ardından aminoasitler üretmek için kullanılır-

bilinmekte olup otofajinin programlanmış hücre ölümünü veya apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, bazı araştırmalar, makro-otofaji tarafından hücre ölümünün indüksiyonunu göstermiş ve böylece otofajinin hücrelerin intihar ettiği mekanizmalardan biri olduğunu öne sürmüşlerdir. Tarihsel süreçte hücre ölümünün üç ana türü tanımlanmıştır: tip I programlanmış hücre ölümü veya apoptoz, tip II hücre ölümü veya otofaji ve tip III hücre ölümü veya nekroz (15). Son yıllarda alternatif hücre ölüm mekanizması olarak entozis tanımlanmıştır. Entozis bir hücrenin başka bir hücrenin sitoplazması içine invaze olarak onu öldürmesidir (16). Makro-otofaji hücrenin hayatta kalması için gerekli olan anahtar proteinlerin veya organellerin toplu şekilde parçalanması ve hücrenin içinde birkaç otofagozom birikimi ile karakterizedir. Bu tip hücre ölümleri otofajik hücre ölümü (autophagic cell death/ACD) olarak adlan-

dırılır. Bununla birlikte, ACD'ye yol açan kesin mekanizmalar ve otofaji ile apoptoz arasındaki bağlantı henüz tam olarak aydınlatılmamıştır (15). Makro-otofaji, otofagozom adı verilen benzersiz bir organelle yönlendirilir (3). Otofaji organelleri de içeren

lekülleri gibi temel yapı taşlarına yıkımlanır (kargo yıkımı). Bunlar daha sonra yeni moleküller oluşturmak için sitosole salınır ve hücrelerin metabolik süreçlerini tetikleyen bir enerji kaynağı olarak kullanılırlar (11) (Şekil 2).



Şekil 2. Makro-otofajinin aşamaları (20).

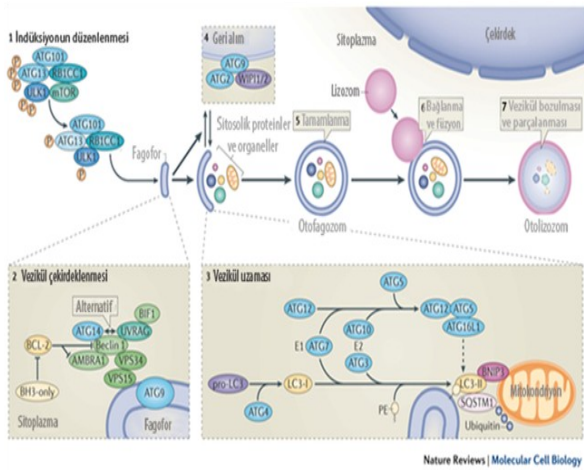
sitoplazmanın bir kısmının, bir otofagozom şekillendirmek üzere muhtemelen iki lipid katmanından oluşan otofagofor (izolasyon membranı) olarak adlandırılan bir izolasyon membranı ile kuşatılmasıyla başlar (başlama evresi) (17,18). Fagoforların başlangıçtaki oluşumuna katılan membranların kaynağı hala tam olarak anlaşılmamıştır. Ancak endoplazmik retikulum, Golgi, çekirdek, mitokondri ve plazma membranı da dahil olmak üzere birçok organelin lipid verici olarak hareket ettiği gösterilmiştir (19). Bu fagofor genellikle sitosolün bir kısmını, hasar görmüş proteinleri, eski veya hasar görmüş organelleri içeren kargoyu çevrelemek için uzayarak bardak (kase) şeklinde genişler (uzama evresi). Takiben fagofor membranının uçları birbiriyle kaynaşır ve otofagozom adı verilen çift-membranlı bir vezikül oluşturarak taşıdığı kargoyu salıverir (tamamlanma evresi). Otofagozom şekillendikten sonra otofagozom membranını oluşturmada yer alan proteinler sitosol içine salınır. Bu proteinler, gerektiğinde yeni fagofor oluşumuna yardımcı olmak için serbest bırakılır. Otofagozomun görevi, kargoyu lizozomlara iletmektir. Bu amaçla otofagozom hücrenin sitoplazması boyunca lizozoma doğru hareket eder (olgunlaşma evresi) ve otofagozomun dış membranı lizozomal membranla birleşir. Böylece tek katmanlı bir vezikül lizozom içine salınmış olur (kaynaşma evresi). İki organelin birleşmesiyle otolizozom (otofagolizozom) şekillenir (11,20). Bir diğer şekilde otofagozom endozomlar ile de kaynaşarak olgunlaşır ve amfizomu şekillendirir. Amfizom da lizozom ile kaynaşır ve otolizozom oluşur. Lizozom içindeki kargo, proteazlar, lipazlar ve hidrolazlar gibi litik enzimler aracılığıyla aminoasitler, şekerler ve lipid mo-

Makro-otofaji sürecinde gerçekleşen bir dizi olayın düzenlenmesinde birçok otofaji ile ilişkili proteinler (autophagy-related protein/Atg) işlev görür. Otofagozom şekillenmesinde 18 faktör görevli olup bunlar fonksiyonel olarak 6 grupta sınıflandırılabilirler: Memelilerde induksiyon: Otofajinin başlatılmasında iki protein kompleksinde şekillenen bir dizi sinyalleşme süreci rol oynar: ULK1 protein kinaz kompleksi ve PI3KC3-C1 (sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz kompleksi I) lipid kinaz kompleksi (28). Memeli hücrelerinde Atg1'in homoloğu ULK (UNC-51-like kinase) olarak bilinir. ULK proteinlerinden ULK1, ULK2 ve ULK3 makro-otofajinin düzenlenmesinde görev alırlar. Son yıllarda yapılan çalışmalar, memelilerde Atg13'ün homoloğunun ULK1 ve ULK2 ile etkileşime girdiğini ve otofagozom oluşumunda önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur (22,29-31). Öte yandan, Atg17'nin memeli muadili açıkça tanımlanmamıştır. FIP200 (aynı zamanda RB1-inducible coiled-coil 1/RB1CC1 olarak da anılır), ULK1 ve ULK2 ile etkileşen ve otofagozom oluşumu için önemli rol oynayan protein olarak tanımlanmıştır (32). FIP200, yüksek dizi benzerliği göstermemekle birlikte, mayadaki Atg17'ye işlevsel benzerliği göz önüne alındığında, memeli hücrelerinde Atg17'nin bir karşılığı olarak önerilmiştir (32). Memelilerde besinden zengin koşulların varlığında memeli rapamisin hedefi kompleks 1 (mammalian target of rapamycin complex 1/TORC1, ULK1/2 ve Atg13'ü fosforile eder ve ULK1/2'nin kinaz etkinliğini engeller. Açlık koşullarında ise, mTORC1 inhibe olduğundan ULK kompleksinin mTORC1 tarafından fosforilasyonu bastırılır. Bu durum ULK'nın Atg13,

FIP200 ve kendisini fosforile etmesini indükler. Böylece ULK aktive olur ve otofaji indüklenir (33).

Fagofor oluşumu veya vezikül çekirdeklenmesi: Vezikül çekirdeklenmesi fosfatidilinositol-3-fosfat üretmek için fosfatidilinositol 3-kinaz (Phosphatidylinositol 3-kinase/PtdIns3K) vakuoler protein sınıflandırması ile ilişkili protein 34'ü (*Vacuolar protein sorting-associated protein 34/VPS34* veya phosphoinositide 3-kinases/PIK3C3 olarak da bilinir) içeren sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz (PtdIns3K) kompleksinin aktivasyonunu içerir. VPS34 aktivasyonu, vakuoler protein sınıflandırma protein 15 (*Vacuolar Protein Sorting 15/VPS15* veya phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4/PIK3R4 olarak da bilinir), mayalardaki Atg6'nın karşılığı olan beclin 1 (coiled-coil, moesin-like BCL2-interacting protein/BECN1), AMBRA1 (activating molecule in BECN1 regulated autophagy protein 1), ATG14 veya ultraviyole ışınlama direnci ile ilişkili gen (*Ultraviolet irradiation resistance-associated gene / UVRAG*) ve Bax (*Bcl-2-associated X protein*) ile etkileşen faktör (BIF1, SH3 Domain Containing GRB2 Like, Endophilin B1 endophilin B1/SH3GLB1 olarak da bilinir)'ü içeren bir kompleksin oluşmasına bağlıdır. Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), beclin 1 ve AMBRA1'i bağlayarak ve inhibe ederek otofajinin indüksiyonunu engeller. Bcl-2'nin BCL-2 homolog 3 (BH3)-only proteinleriyle yer değiştirmesiyle VPS34 kompleksi aktif hale gelir (23). Aktifleşen VPS34 kompleksi Atg5-Atg12 konjugasyonunu regüle eder (34).

Otofagozom oluşumu: Atg genleri, Atg12-Atg5 ve mikrotübül ile ilişkili protein 1A/1B hafif zincir 3-II (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-phosphatidylethanolamine conjugate/LC3-II*) (mayada Atg8-II) kompleksleri (Şekil 3)



Şekil 3. Makro-otofaji sürecine katılan Atg genleri (37).

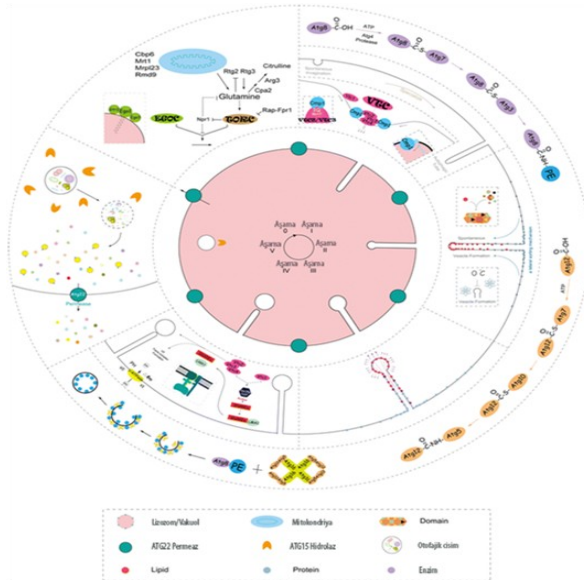
yoluyla otofagozom oluşumunu kontrol eder. İki ubiquitin benzeri konjugasyon sistemi, vezikül uzatma sürecinin bir parçasıdır. Birinci yolda, sırasıyla Atg7 ve Atg10 yardımıyla Atg12'nin Atg5'e kovalent konjugasyonunu içerir. Atg12-Atg5 konjugatı daha sonra daha büyük bir kompleks oluşturmak için kovalent olmayan şekilde Atg16 benzeri 1 (Atg16L1) ile etkileşir. Bu kompleks ikinci konjugasyon reaksiyonunu teşvik etmek için bir E3 benzeri ligaz görevi görebilir. İkinci yolda, sitosolik LC3-I' i üretmek için LC3/Atg8 proteaz

Atg4 tarafından bölünür (35). LC3-I, Atg7 ve Atg3 (sırasıyla E1 ve E2 benzeri enzimler)'ün ardışık eylemiyle ubiquitin benzeri bir reaksiyonda fosfatidiletanolamin'e (PE) konjuge edilir. LC3-II olarak bilinen lipidlenmiş LC3 formu otofagozom zarına bağlanır. LC3-II, fagofor genişlemesinde ve aynı zamanda kargo tanımda işlev görür. BNP3 (BCL2 and adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3) ve BNP3-benzeri protein (BNIP3L veya NIX olarak da bilinir) gibi reseptör proteinleri fagofor üzerindeki LC3-II ile direkt olarak etkileşir. Fagofor ve otofagozomun oluşmasına katılan proteinlerin çoğu tamamlanmış vezikül ile ilişkili kalmaz, yeniden kullanılmak üzere tekrar sitosole bırakılır. Fagofor genişlemesi tam olarak aydınlatılamamış olup, Atg9-Atg2-WIP1 (WD tekrar bölgesi, fosfoinositid ile etkileşen 1) ve/veya WIP12 komplekslerinin, Atg9'un genişleme bölgesi ile donör arasında doluşmasına izin vererek büyüyen fagofora donör membranların sağlanmasında bir rolü olabileceği düşünülmektedir (36). Bir otofagozom tamamlandıktan sonra, genişleyen fagofor ile ilişkili olan Atg proteinleri sitoplazmada serbest bırakılır ve yeni veziküllerin biyogenezini için tekrar kullanılır (23). Otofagozomlar lizozomlarla füzyon yoluyla olgunlaşarak otolizozomu oluştururlar. Otofagozom-lizozom füzyonuna, homotipik vakuol membran füzyonunda yer alan mekanizmalar aracılık eder. Memeli hücrelerinde füzyon olayı lizozomal membran proteini-2 (*Lysosome-associated membrane protein 2/LAMP-2*)'yi ve küçük guanozin trifosfataz Rab7 (small guanosine triphosphatase (GTPase) Rab7)'yi gerektirir. Füzyon sonrasında, iç vezikülün parçalanması, mayada A ve B proteinazları (sırasıyla PEP4 ve PRB1 olarak kodlanır) ve lipaz Atg15 ve memelilerde katepsin B, D ve L gibi vakuoler/lizozomal asit hidrolazlara bağlıdır. Otolizozomlarda lizozomal enzimler tarafından yıkılma sonucu oluşan küçük moleküller, özellikle amino asitler, protein sentezi ve açık koşulları altında hücre fonksiyonlarının devamlılığı için sitosole geri taşınır (23,27).

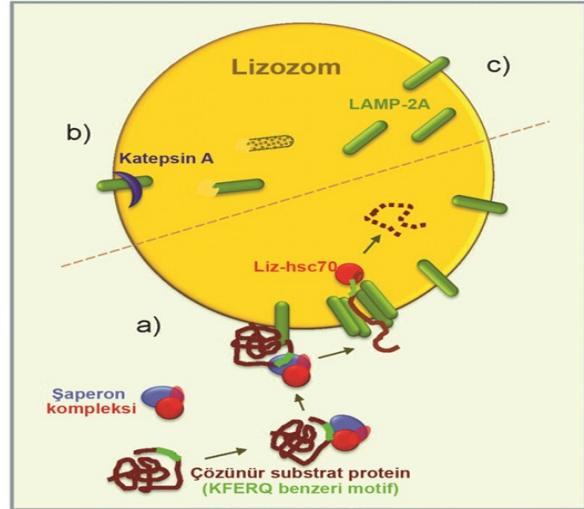
2.2.Mikro-Otofaji

DeDuve ve Wattiaux 1966 yılında sıçan karaciğinde hem makro-otofaji, hem de mikro-otofaji olgusunu tarif etmişlerdir, ancak 1983 yılına kadar mikro-otofaji tanımı kullanılmamıştır (38). Memeli hücrelerindeki mikro-otofaji geleneksel olarak otofajinin bir formu olarak kabul edilmesine rağmen, kargo seçiminin mekanizması ve düzenlenmesi hakkında çok az şey bilinmektedir. Memeli sistemlerde mikro-otofajiyi doğrudan tespit etmek için elektron mikroskopisi dışında spesifik yaklaşımların bulunmaması, mikro-otofajinin fizyolojik rollerine ve belirli hastalık durumlarına olası katkıları hakkında bilgi edinilmesini kısıtlamaktadır. Mikro-otofaji, sitosolik proteinlerin memelilerde lizozom, bitki ve mayalarda ise vakuol (lizozomun karşılığıdır) tarafından doğrudan yutulması olarak tanımlanır (Şekil 4). Sitosolik moleküller, örneğin glikojen, protein yığınları, yanlış katlanmış proteinler ve organeller mikro-otofaji yoluyla bozunabilir (39). Mikro-otofaji benzersiz membran dinamikleri içerir ve şu şekilde gelişir: Mikro-otofajik invaginasyon dynamin ile ilişkili guanozin-5'-trifosfataz (GTPaz) Vps1p tarafından düzenlenir (40). Mikro-otofajinin erken safhasında lizozom veya vakuol

membranında bulunan bazı lipidler ve lipid modifiye edici proteinler hücre içi ortamdan bağımsız olarak kendiliğinden bir invaginasyon oluşturma eğilimindedirler. Mikro-otofaji lizozomal/vakuoler membranda rasgele invaginasyonların oluşumuyla başlar. Makro-otofajide olduğu gibi mikro-otofaji de açlık ve TOR kinaz sinyalini inhibe eden bir farmakolojik ajan olan Rapamisin ile indüklenir. İnvaginasyon sıklığı, beslenme koşullarına bağlıdır. Açlık invaginasyonun başlatılmasına neden olur. İnvaginasyon, benzersiz yapısı ve otofajiye bağlı fonksiyonu nedeniyle otofajik tüp olarak adlandırılan karakteristik bir tüp şeklinde lizozom içine doğru uzar ve farklılaşır (Şekil 4). Otofajik tüp boyunca tüpün uç kısmına doğru intramembranöz protein yoğunluğunda belirgin bir azalma görülür. Otofajik tüp şekillenmesi ATP bağımlıdır ve aktif bir olgudur. Mikro-otofajide kalmodulin'in tüp şekillenmesini için gerekli olduğu gösterilmiştir (40). Atg proteinleri, çözünür bileşenlerin mikro-otofajik alımından doğrudan sorumlu görünmemektedir (41,42), ancak Atg'ye bağlı makro-otofaji, çözünebilir bileşenlerin mikro-otofajisi için bir ön şarttır (42). Tüpün uç kısmı lümenine doğru tomurcuklanarak vezikülleri oluşturur. Benzer olan veziküllerin kaynaşmasıyla vezikül genişler, böylece, lizozom/vakuol lümeninde ileri geri sarkan oldukça dinamik balon benzeri bir pre-vezikül yapı oluşur. Otofajik cismin erken safhası olarak, pre-vezikül yapı otofajik tüpten henüz ayrılmamıştır. Pre-vezikül yapı protein içermez, ancak yüksek oranda lipidlere sahiptir. Sadece bir veya iki vezikül lizozom/vakuol lümenine tomurcuklanır. Takiben otofajik tüpten ayrılan veziküller, lümeninde yüksek bir hızda serbestçe hareket ederler. Atg15p ve diğer hidrolitik enzimler vezikülün parçalanmasını sağlar (42), daha sonra Atg22p besin maddelerinin ve enerjinin geri dönüşümü için bir permeaz olarak görev yapar (43).



Şekil 4. Mikro-otofajinin aşamaları; düzenleyici sinyal kompleksleri (örn. TOR ve EGO), membran invaginasyonu, otofajik tüp oluşumu, vezikül oluşumu, vezikül genişlemesi, vezikül parçalanması, otofajik cismin parçalanması, enerji ve besin maddelerinin geri dönüştürülmesi dahil olmak üzere lizozom / vakuol etrafında bir daire halinde gösterilmektedir (13).



Şekil 5. Şaperon aracılı otofajinin (CMA) temel bileşenleri ve düzenlenmesi. (a) CMA'nın aşamaları: CMA'nın iki temel bileşeni sitoplazmadaki kargo tanıma kompleksi ve lizozom membranındaki kargo translokasyon kompleksidir. Substrat proteindeki CMA-hedef motifi (KFERQ-benzeri) kargo tanıma kompleksinin ana bileşeni olan sitosolik hsc70 tarafından tanınır ve lizozom yüzeyine gönderilerek LAMP-2A'ya bağlanır. Bu membran proteini ve hsc70'in luminal formu kargo translokasyon kompleksinin ana bileşenleridir. Lizozom lümenine girildikten hemen sonra substrat hızla parçalanır. (b ve c) CMA'nın düzenlenmesi: CMA aktivitesi lizozom membranındaki LAMP-2A moleküllerinin miktarına direkt olarak bağlıdır. LAMP-2A düzeyleri lizozom membranındaki düzenlenmiş Katepsin A bağımlı bozunumdaki değişikliklerle (b) ve lizozom lümenindeki LAMP-2A'nın lizozom membranına direkt sokulmasıyla de novo sentezle düzenlenir.

2. 4. Şaperon Aracılı Otofaji

Şaperon aracılı otofaji (Chaperone-mediated autophagy, CMA) yalnızca yanlış katlanmış veya yanlışlıkla oluşturulmuş sitosolik proteinlerin belirli bir grubunu indirgemek üzere işlev görür. Proteinler, şaperonlar olarak adlandırılan sitosolik moleküler asistanlar aracılığıyla tanınırlar ve lizozoma yönlendirilirler. CMA çözünebilir proteinlerin lizozomlarda seçici olarak parçalanmasına izin veren tek otofajik yoldur (8). CMA diğer otofaji tiplerinden önemli ölçüde farklıdır, çünkü protein materyalinin yerini değiştirir ve hangi materyalin lizozomal bariyerden geçeceği konusunda oldukça seçicidir (44,45). Otofajinin diğer memeli formlarının aksine, CMA vezikül oluşumuna veya lizozomal membranda büyük değişikliğe ihtiyaç duymaz (Şekil 5). CMA ile bozunacak olan proteinler, pentapeptid KFERQ ile biyokimyasal olarak ilişkili benzersiz bir motif içerirler. Protein doğru katlanmadığında veya hasarlandığında bu motif açığa çıkar ve 70 kDa'lık bir ısı şoku proteini olan hsc70 (Heat shock cognate protein 70) adlı bir moleküler şaperon tarafından tanınır. Hsc70, bu benzersiz motife bağlanır ve substrat-hsc70 kompleksini oluşturarak proteini veya CMA substratını lizozomal yüzeye yönlendirir. Lizozomal yüzey, membrana gömülü olarak, lizozomal membran protein 2A (LAMP-2A) adı verilen bir proteine sahiptir. Bu protein, substrat-hsc70 kompleksi için bir reseptör görevi görür (45). Substrat-hsc70 kompleksi LAMP-2A monomerine bağlandığında hsc70'in yanı sıra diğer membran molekülleri ve

şaperonlar, örneğin ısı şok proteini 90 (Heat shock protein 90/hsp90) substrat proteinini açar. Ayrıca, LAMP-2A proteini, CMA translokasyon kompleksi adı verilen içi boş, silindirik bir nakil yapısını oluşturmak için yapısal değişiklikler oluşturur ve multimerizasyona uğrar. Katlanmamış substrat translokasyon kompleksinden geçer ve lizozomal lümenine girer. Lizozom lümeninde lizozomal hsc70 olarak adlandırılan hsc70'in bir varyantı bulunur. Bu substratın lizozom içine çekilmesine yardımcı olur ve aynı zamanda sitosole dönmesini de önler. Substrat lizozomal lümenine girdikten sonra, CMA translokasyon kompleksi hsc70, hsp 90 ve lizozomal membranda bulunan diğer proteinler tarafından hemen parçalarına ayrılır. Substrat lümeninde bulunan proteazlar tarafından bozundurulur ve oluşan amino asitler sitosol içine salınır (8).

Memelilerde 1000'den fazla genin dahil olduğu ubiquitin-proteazom sistemi ile karşılaştırıldığında, otofaji oldukça basit görünmektedir. Bununla birlikte, bu derlemede tartışıldığı gibi, otofaji temel süreçlerine dayanarak incelenmelidir. Son 10 yılda yapılan çalışmalar otofajinin insan ve memeli hayvanlardaki çeşitli fizyolojik süreçleri ve hastalıkları yöneten önemli bir süreç olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu sürecin fizyolojik ve patolojik rollerinin daha iyi anlaşılması önemli olduğundan otofajiyi düzenleyen temel hücre biyolojisi ve sinyal yolları hakkında daha fazla bilginin elde edilebilmesi insan sağlığını tehdit eden önemli hastalıklara moleküler temelli çözümler üretilerek yeni tedavi araçlarının bulunmasına yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Deter RL, De Duve C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol* 1967; 33:437-449.
- Ferraro E, Cecconi F. Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 2007; 462:210-219.
- Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 2007; 21:2861-2873.
- Murrow L, Debnath J. Autophagy as a stress response and quality control mechanism—implications for cell injury and human disease. *Annu Rev Pathol* 2013; 8:105-137.
- Kraft C, Peter M, Hofmann K. Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nature cell biology* 2010; 12:836-841.
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; 27:107-132.
- Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci* 2005; 118:7-18.
- Massey AC, Zhang C, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol* 2006; 73:205-235.
- Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1102-1109.
- Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J* 2012; 441:523-540.
- Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct* 2002; 27:421-429.
- Klionsky DJ, Cuervo AM, Dunn WA, et al. How shall I eat thee? *Autophagy* 2007; 3:413-416.
- Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69:1125-1136.
- Wada Y, Sun-Wada G-H, Kawamura N, Aoyama M. Role of autophagy in embryogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2014; 27:60-66.
- Aburto MR, Hurlé JM, Varela-Nieto I, Magariños M. Autophagy during vertebrate development. *Cell* 2012; 1:428-448.
- Overholtzer M, Mailleux A.A., Mouneimne G, et al. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell* 2007; 131:966-979.
- Axe EL, Walker SA, Manifava M, et al. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 2008; 182:685-701.
- Simonsen A, Tooze SA. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J Cell Biol* 2009; 186:773-782.
- Pavel M, Rubinsztein DC. Mammalian autophagy and the plasma membrane. *FEBS J* 2017; 284:672-679.
- Rodriguez-Rocha H, Garcia-Garcia A, Panayiotidis MI, Franco R. DNA damage and autophagy. *Mutat Res* 2011; 711: 158-166.
- Ganley IG, Lam DH, Wang J, et al. ULK1-ATG13-FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem* 2009; 284:12297-12305.
- Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB. A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy* 2009; 5:649-662.
- He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009; 43:67-93.
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL, AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011; 13:132-141.
- Suzuki K, Ohsumi Y. Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 2007; 581:2156-2161.
- Suzuki K, Kubota Y, Sekito T, Ohsumi Y. Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells* 2007; 12:209-218.
- Kamada Y, Yoshino K, Kondo C, et al. Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy. *Mol Cell Biol* 2010; 30:1049-1058.
- Hurley JH, Young LN. Mechanism of autophagy initiation. *Annu Rev Biochem* 2017; 86:225-244.
- Jung CH, Jun CB, Ro SH, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 2009; 20:1992-2003.
- Chan EY, Longatti A, McKnight NC, Tooze SA. Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via

- their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Mol Cell Biol* 2009; 29:157-171.
31. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Cell Biol* 2009; 20:1981-1991.
 32. Hara T, Takamura A, Kishi C, et al. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol* 2008; 181:497-510.
 33. Bento CF, Renna M, Ghislat G, et al. Mammalian autophagy: How does it work? *Annu Rev Biochem* 2016; 85:685-713.
 34. Amaya C, Marcelo C, Fader M, Colombo MI. Autophagy and proteins involved in vesicular trafficking. *FEBS Letters* 2015; 589:3343-3353.
 35. Reggiori F, Ungermann C. Autophagosome maturation and fusion. *J Mol Biol* 2017; 429:486-496.
 36. Feng Y, Klionsky DJ. Autophagic membrane delivery through ATG9. *Cell* 2017; 27:161-162.
 37. Füllgrabe J, Klionsky DJ, Joseph B. The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15:65-74.
 38. deDuve C, Wattiaux R. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* 1966; 28: 435-492.
 39. Castro-Obregon S. The discovery of lysosomes and autophagy. *Nature Education* 2010; 3:49.
 40. Uttenweiler A, Schwarz H, Mayer A. Microautophagic vacuole invagination requires calmodulin in a Ca²⁺ independent function. *J Biol Chem* 2005; 280:33289-33297.
 41. Müller O, Sattler T, Flötenmeyer M, et al. Autophagic tubes: Vacuolar invaginations involved in lateral membrane sorting and inverse vesicle budding - laboratorium der Max-Planck. *J Cell Biol* 2000; 151:519-528.
 42. Sattler T, Mayer A. Cell-Free Reconstitution of Microautophagic Vacuole Invagination and Vesicle Formation. *J Cell Biol* 2000; 151:529-538.
 43. Yang Z, Klionsky DJ. Permeases recycle amino acids resulting from autophagy. *Autophagy* 2007; 3:149-150.
 44. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 2011; 469:323-335.
 45. Kon M, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy in health and disease. *FEBS Letters* 2010; 584:1399-1404