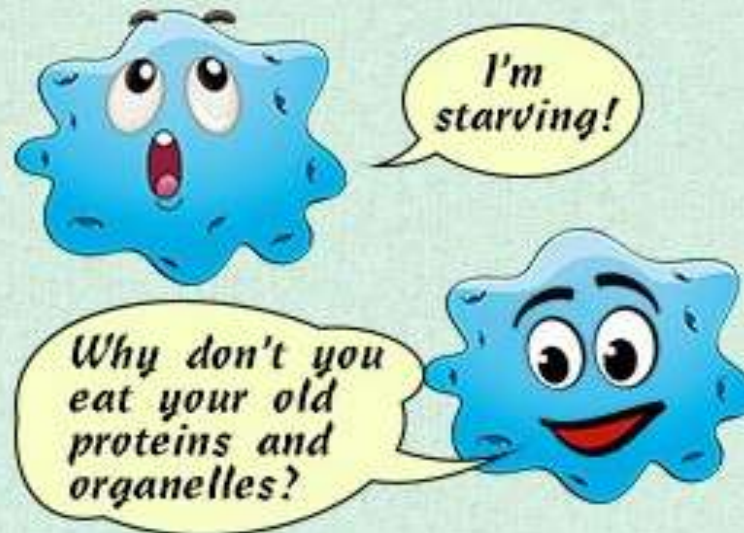
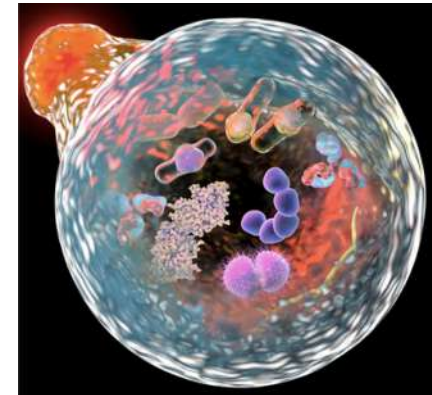


Autofagia o autofagocitosi

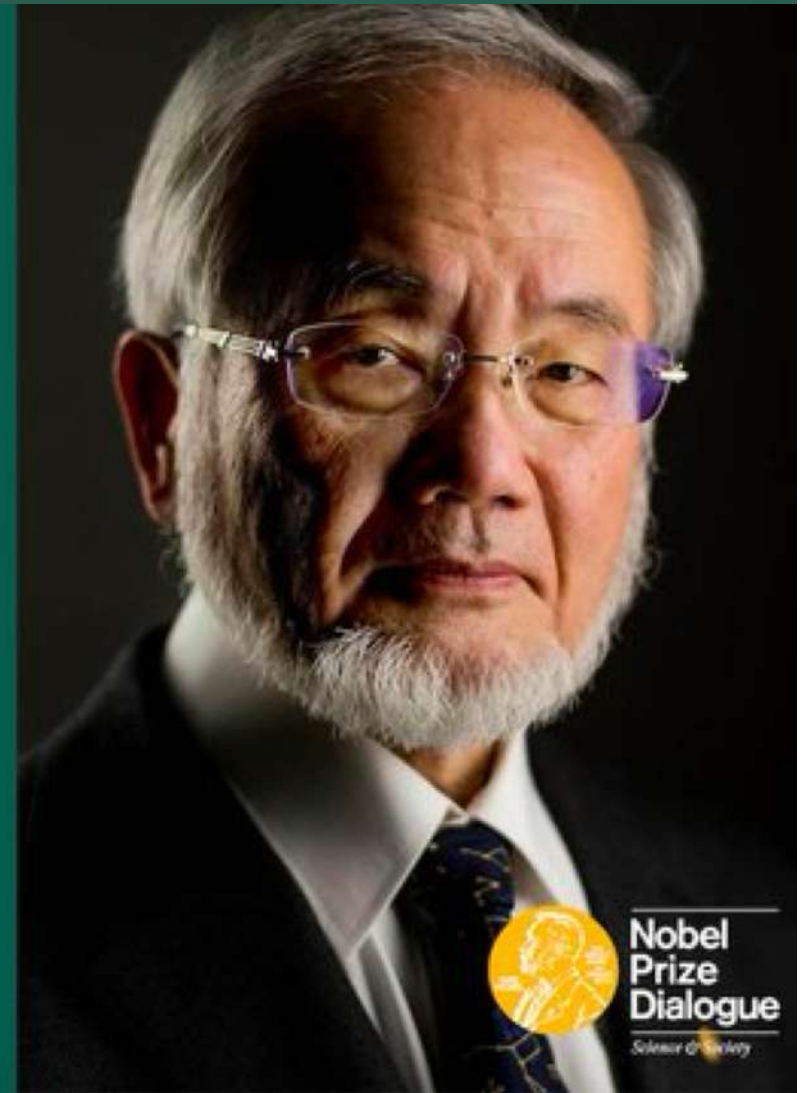


Autophagy (self-eating) is the process used by eukaryotic cells to recycle old or damaged cellular components, in response to cellular stress and damage.



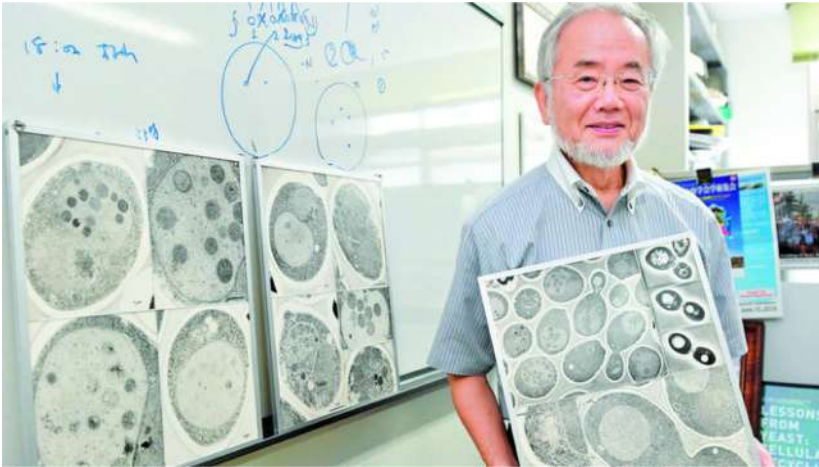
**"Life is an
equilibrium state
between synthesis
and degradation
of proteins."**

Yoshinori Ohsumi, 2016 Nobel Prize
in Physiology or Medicine



"for his discoveries of mechanisms for autophagy"

Definizione di autofagia

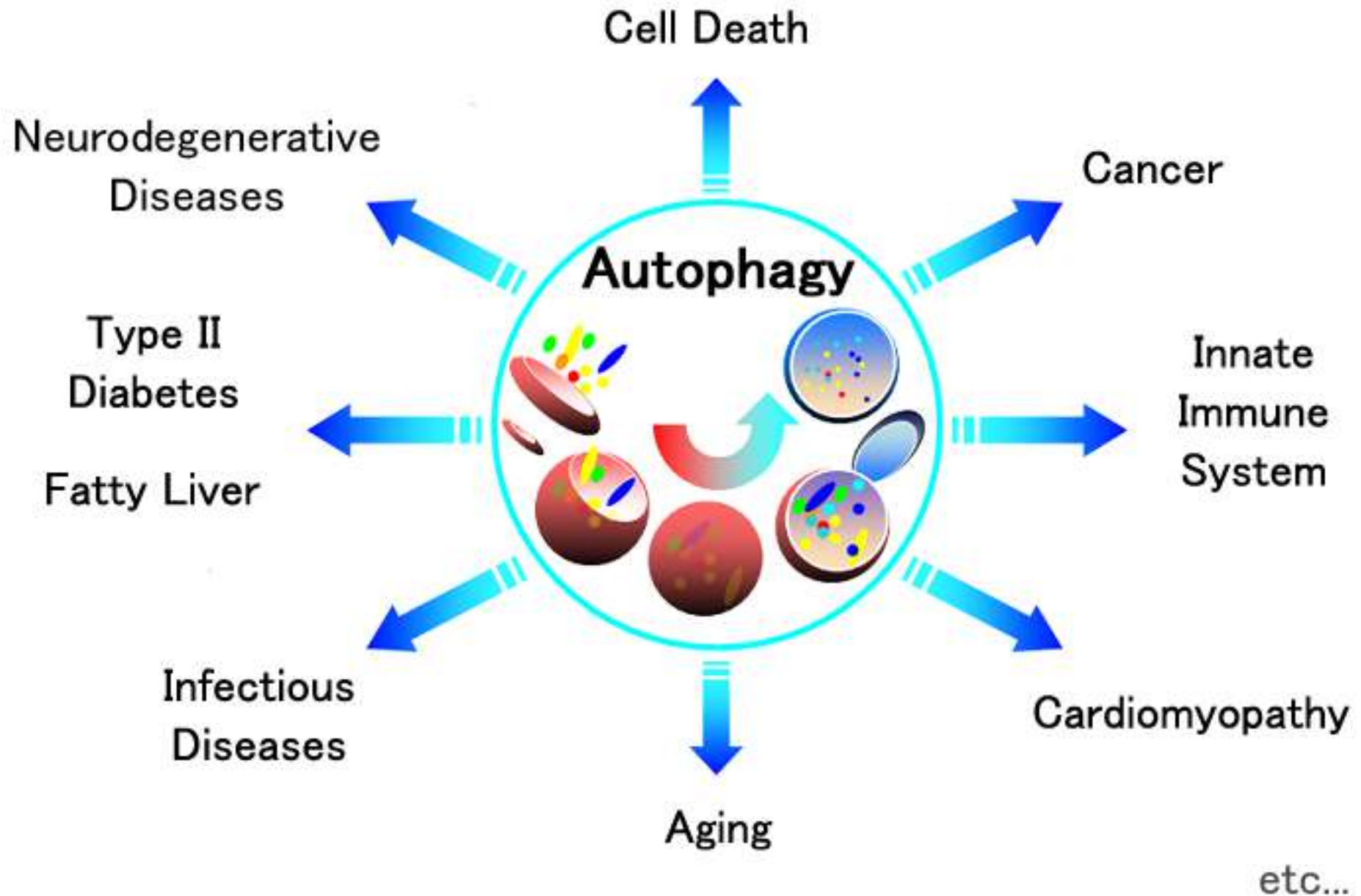


Hoshinori Ohsumi Nobel 2016

(biologo giapponese che ha identificato in lievito i geni ed il meccanismo dell'autofagia)

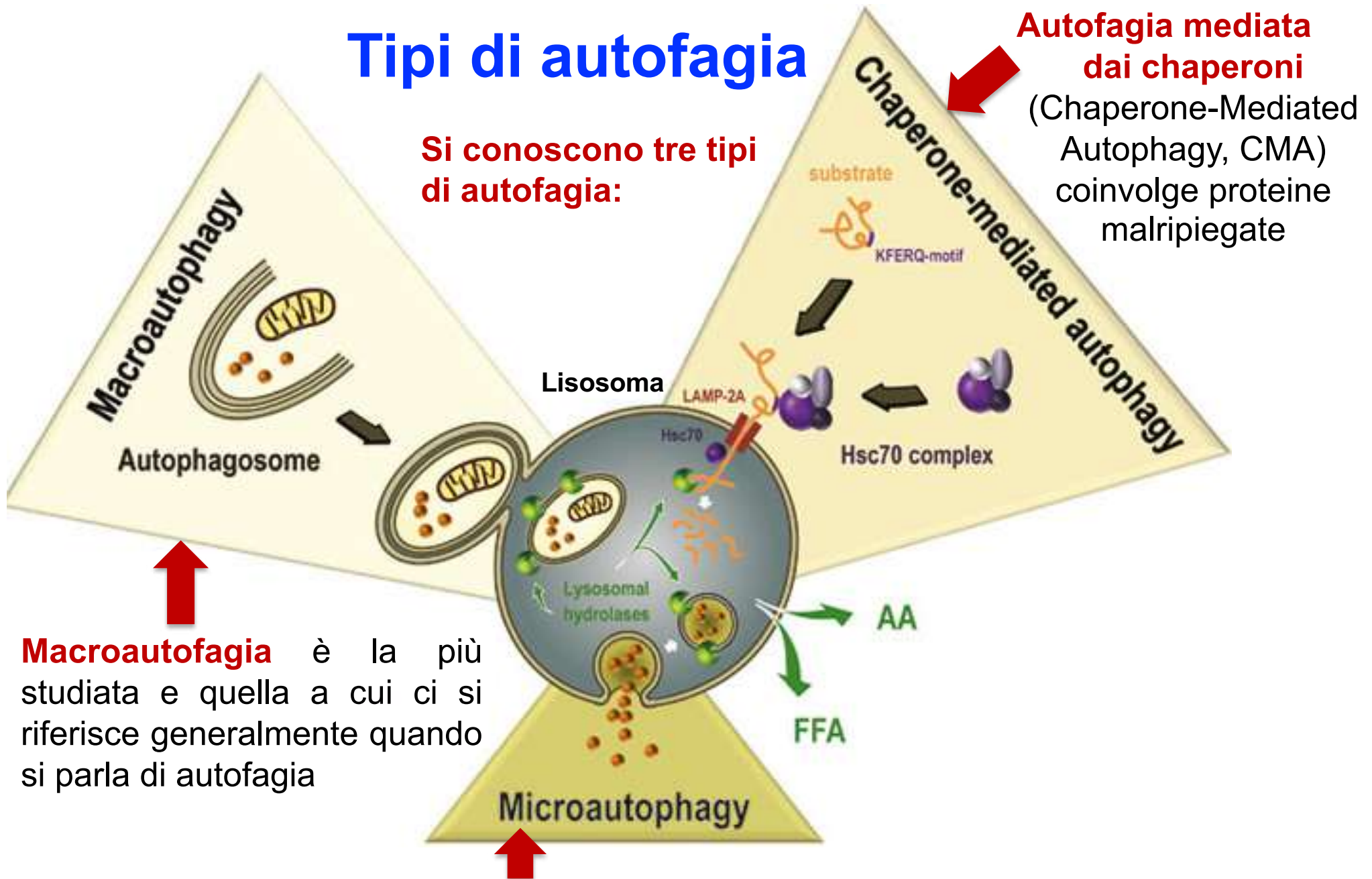
- L'autofagia è un termine che deriva dal greco e significa "mangiare sé stessi".
- E' un processo fisiologico che si presenta come una strategia di sopravvivenza della cellula che si trova in carenza di nutrienti o energia e quindi digerisce i propri componenti e ricicla i precursori biosintetici presenti nelle macromolecole.
- Questo processo che coinvolge i lisosomi, è richiesto per l'omeostasi cellulare oppure è il risultato di stress o danno cellulare.
- Quindi, l'autofagia risulta essenziale per la rimozione selettiva, attraverso degradazione, di organelli danneggiati/invecchiati e non più funzionali, di inclusioni citoplasmatiche dovute ad invecchiamento o ad accumulo di proteine malripiegate o anche per l'eliminazione dei patogeni.

L'autofagia è implicata in processi fisiologici e patologici



Tipi di autofagia

Si conoscono tre tipi di autofagia:

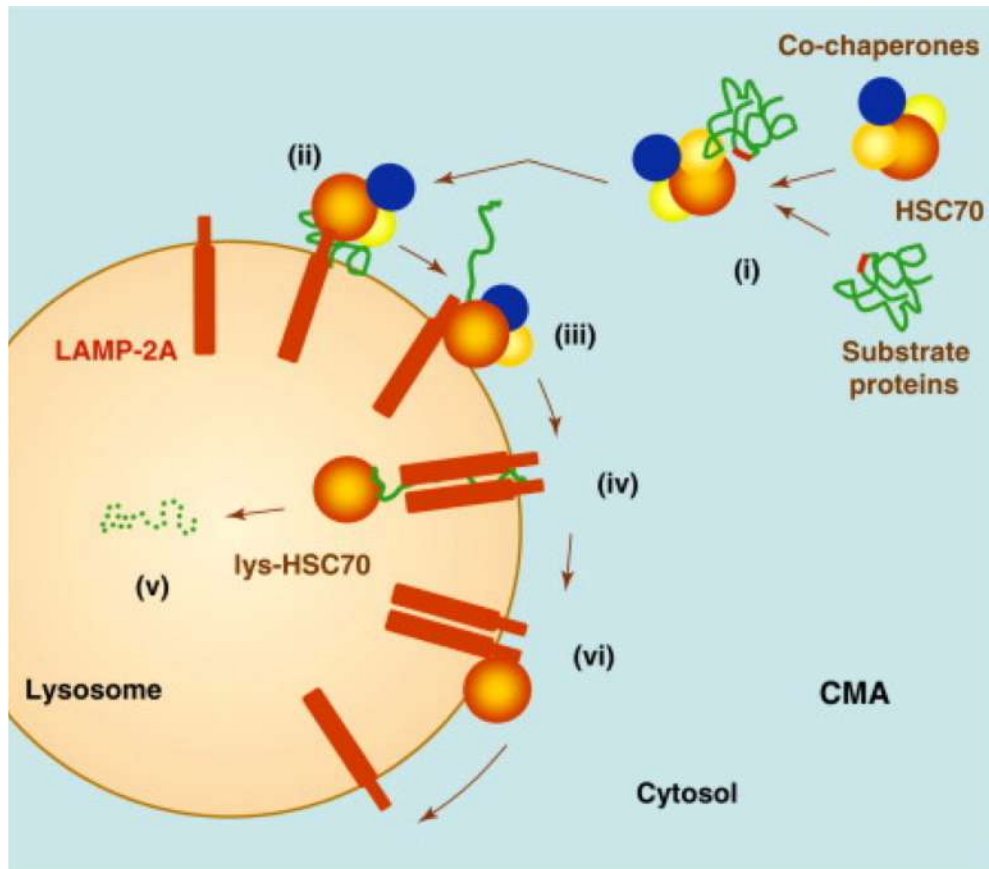


Autofagia mediata dai chaperoni (Chaperone-Mediated Autophagy, CMA) coinvolge proteine malripiegate

Macroautofagia è la più studiata e quella a cui ci si riferisce generalmente quando si parla di autofagia

Microautofagia il materiale da degradare è direttamente fagocitato dal lisosoma, attraverso invaginazioni o protrusioni della sua membrana

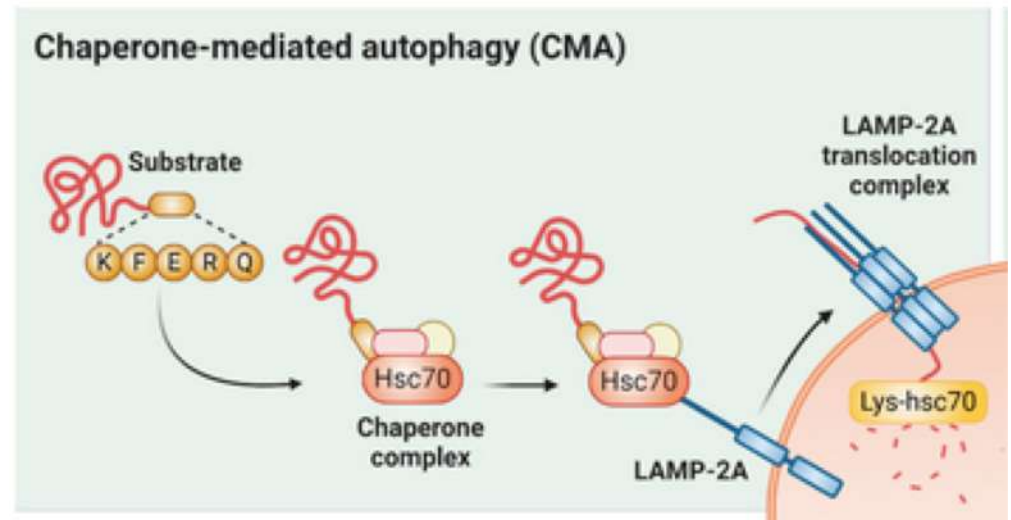
Autofagia mediata dai chaperoni



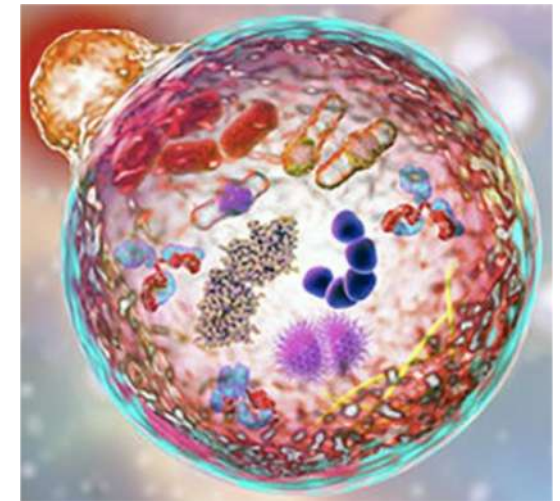
TRENDS in Endocrinology & Metabolism

Chaperone-Mediated Autophagy (**CMA**): le proteine non correttamente ripiegate possono esporre il motivo **KFERQ** (il 30% delle proteine cellulari possiede questa sequenza aminoacidica) che permette il riconoscimento da parte di un sistema di chaperoni e co-chaperoni come ad esempio HSC70 (HSPA8).

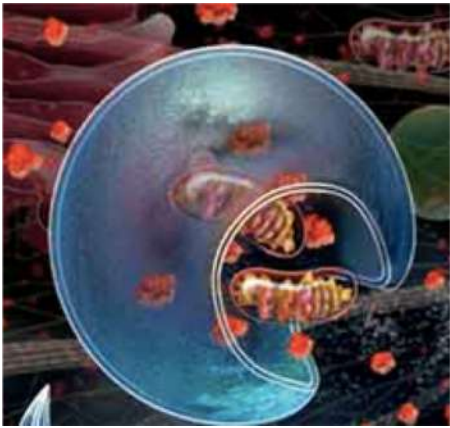
Il complesso si lega a LAMP2A sulla membrana del lisosoma che trasloca la proteina malripiegata nel lume lisosomiale dove sarà degradata.



Autofagia e morte cellulare



- In risposta allo stress e durante lo sviluppo, le cellule eucariotiche spesso attivano il processo autofagico, un meccanismo per cui gli organelli o porzioni del citoplasma vengono sequestrati in vescicole a doppia membrana (autofagosomi) che vengono portate ai lisosomi per la degradazione.
- L'autofagia indotta da stress **spesso esercita funzioni citoprotettive e favorisce il ripristino dell'omeostasi e la sopravvivenza.**
- In questo setting, l'inibizione farmacologica dell'autofagia accelera la morte.



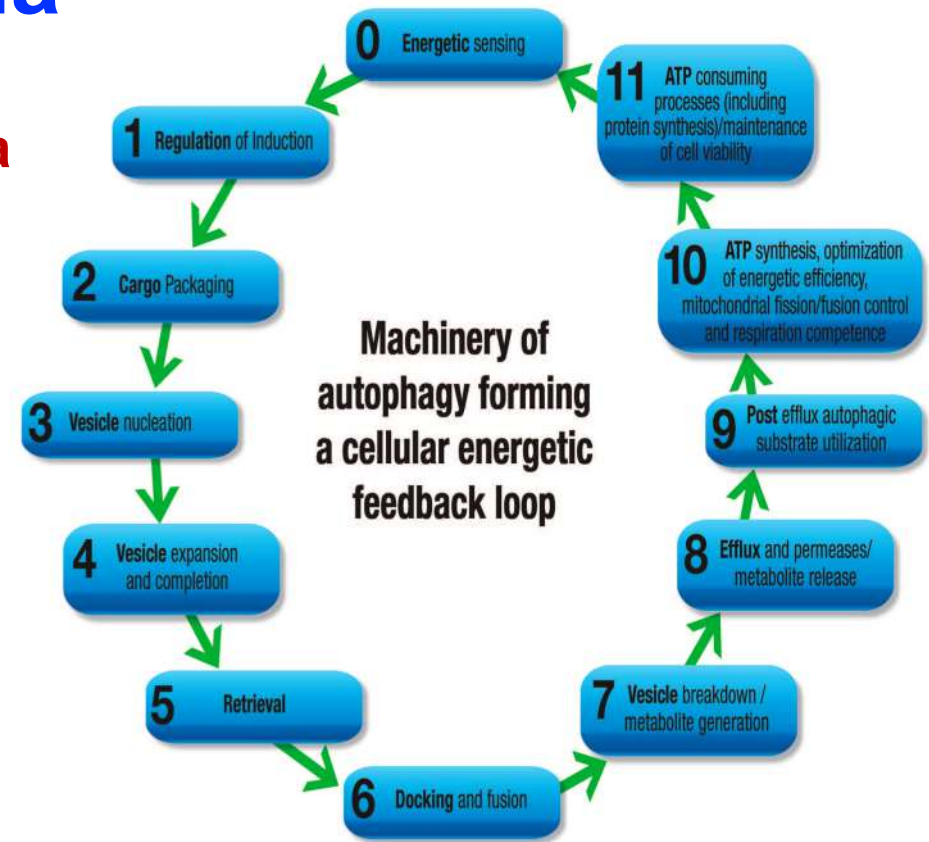
Caratteristiche dell'autofagia

- L'autofagia è regolata da un gruppo di geni chiamati: **AuTophagy-related (ATG) genes** ed è eseguita a livello basale in tutte le cellule come meccanismo omeostatico per mantenere l'integrità cellulare.
- I livelli e i cargos dell'autofagia possono essere modulati in risposta ad una varietà di stimoli intra e extracellulari.
- Alterazioni nei pathways dell'autofagia sono spesso associati ai tumori, alle malattie neurodegenerative ed a molte altre patologie.

Induzione della autofagia

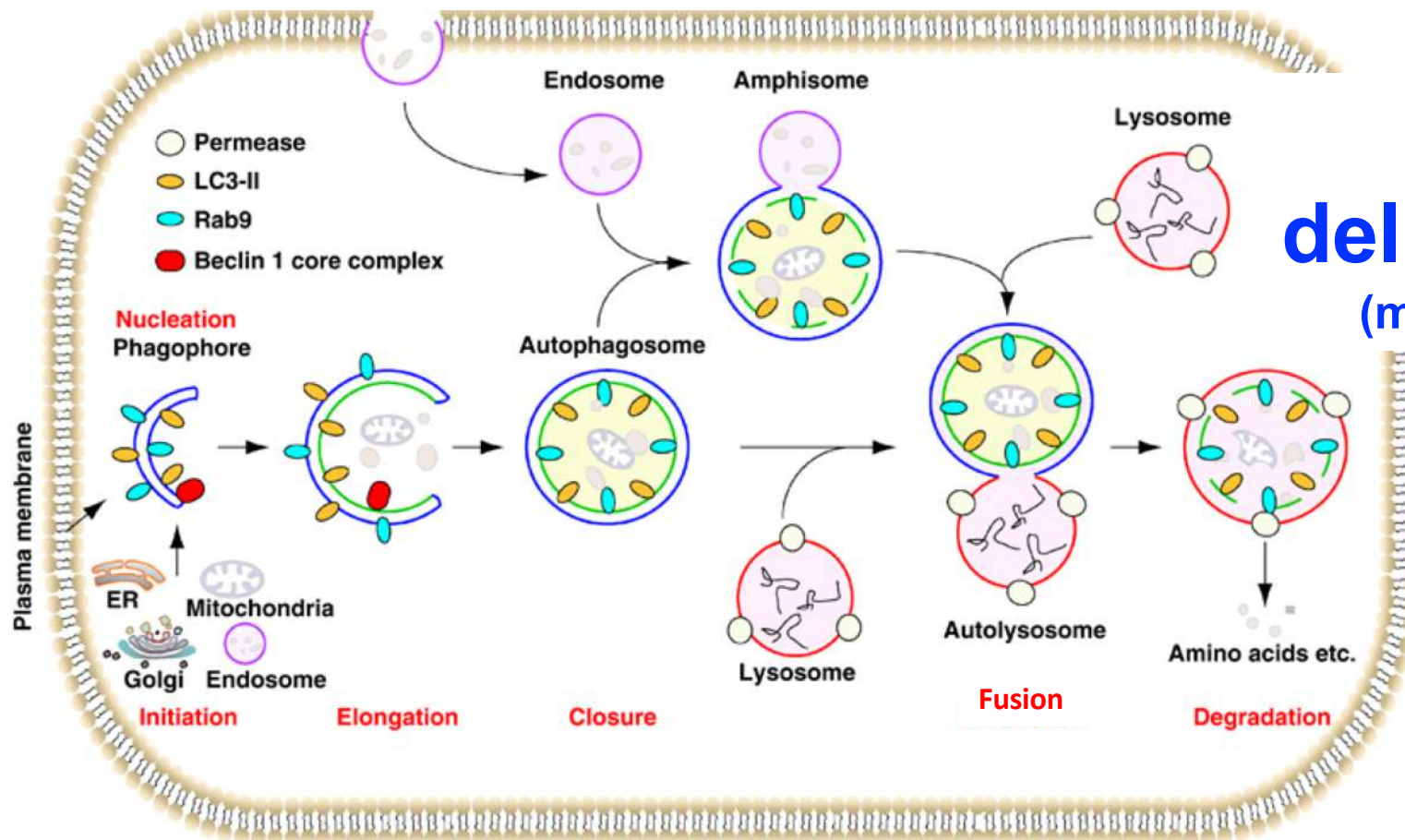
Stimoli in grado di regolare l'autofagia

- aminoacidi ↓
- nutrienti ↓
- fattori di crescita ↓
- ormoni ↓
- livelli intracellulari di calcio ↑
- livelli di adenosina trifosfato (ATP) ↓
- ipossia
- accumulo di proteine malripiegate ↑
- stress di varia natura (patogeni, composti chimici)



**Aspetti funzionali:
31 proteine ATG coinvolte**

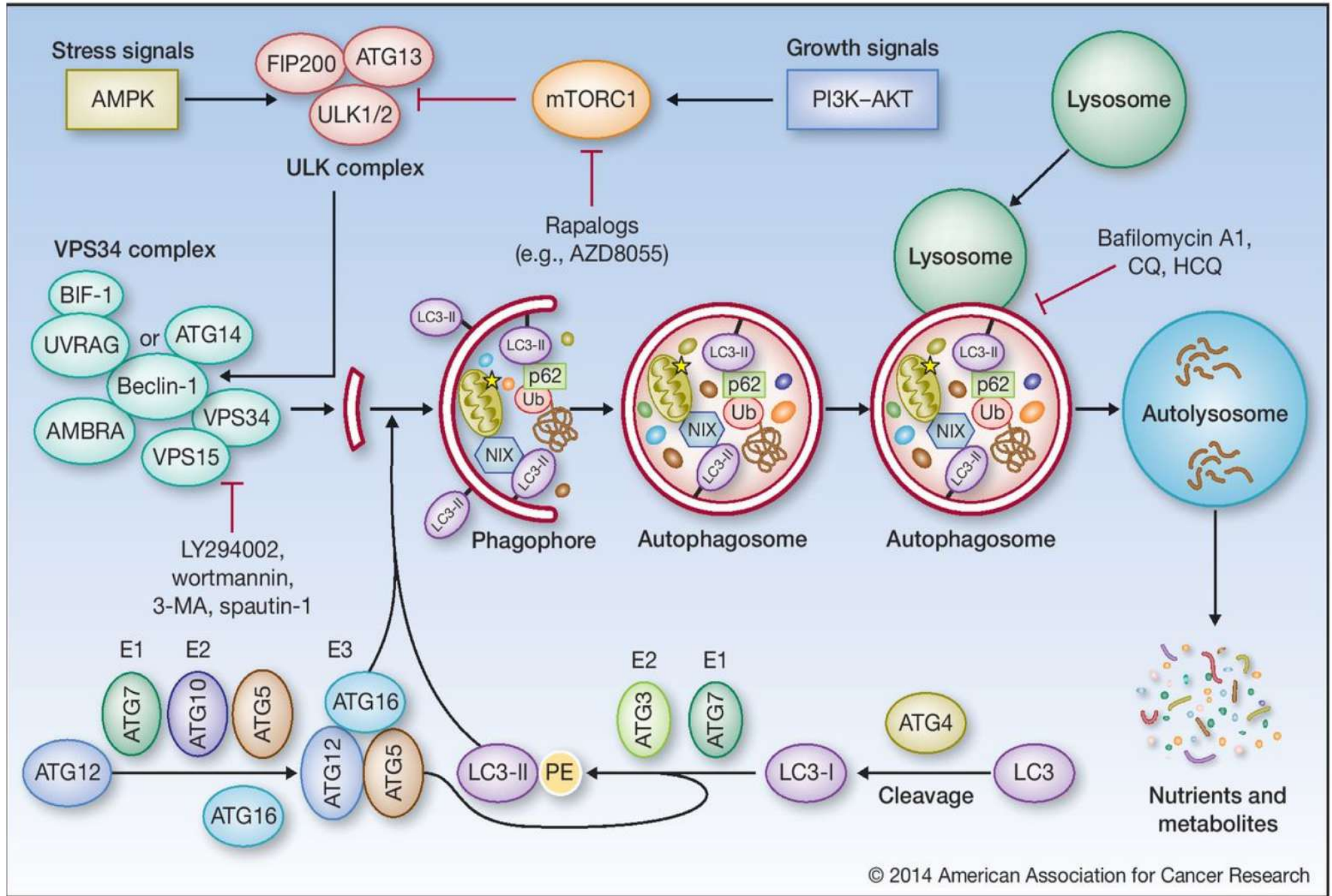
Stadi dell'autofagia (macroautofagia)

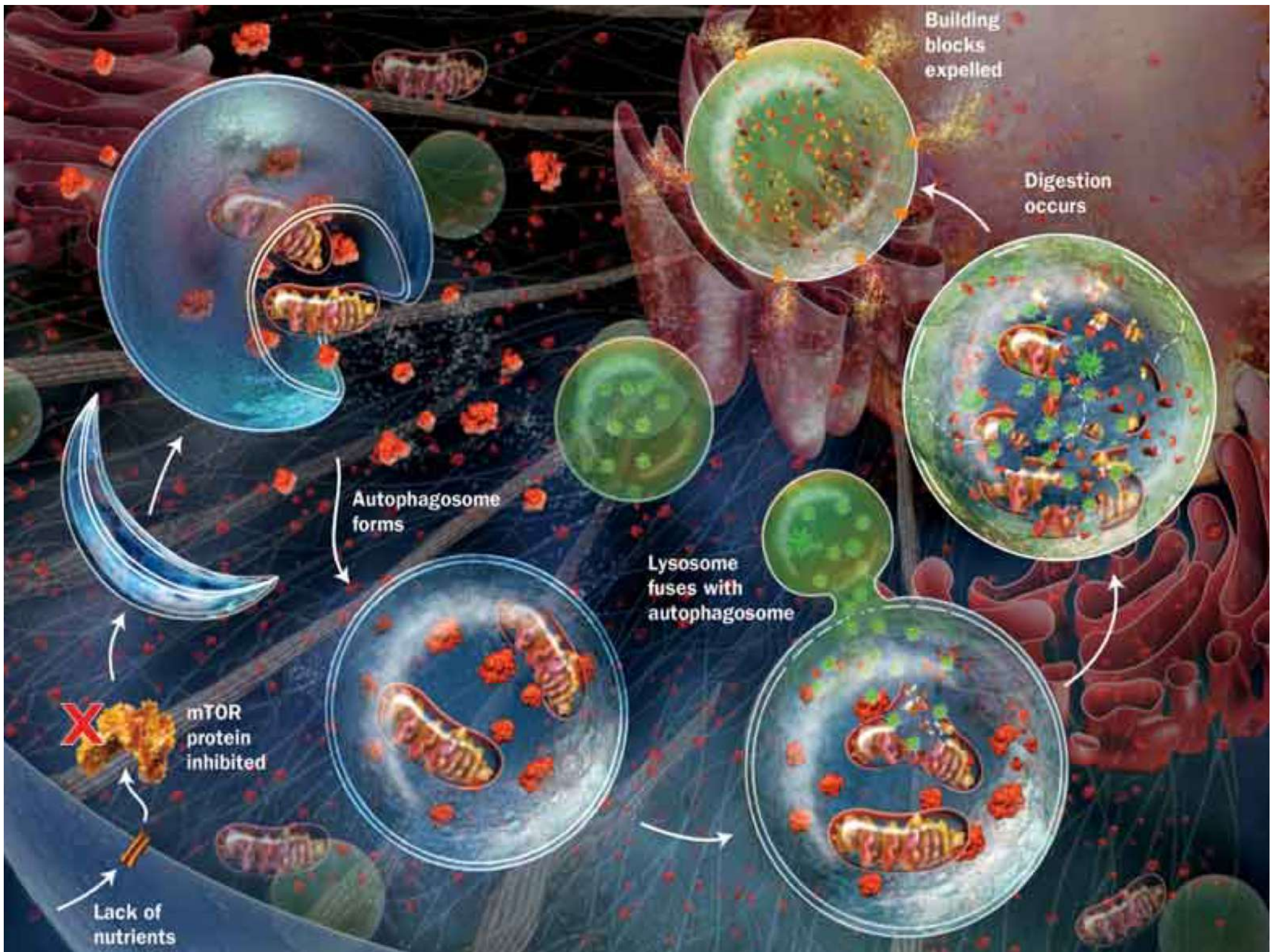


L'autofagia prevede la degradazione mediata dal lisosoma del materiale inglobato nell'autofagosoma e consta di varie **fasi**:

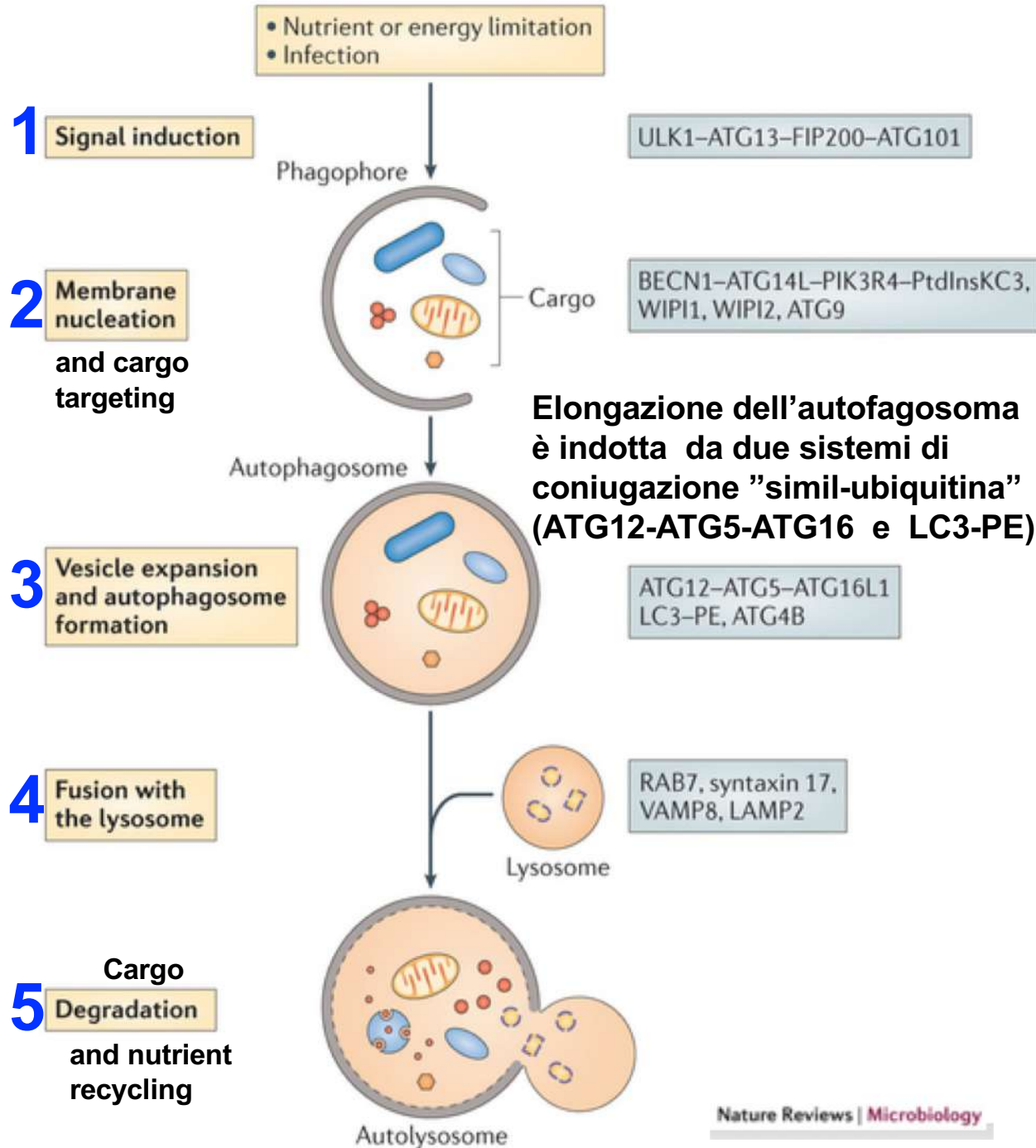
- 1. Induzione/attivazione** che prevede la formazione della porzione iniziale della membrana (il fagoforo)
- 2. nucleazione** di questa membrana;
- 3. elongazione e maturazione dell'autofagosoma**, che quindi ingloba il materiale citoplasmatico;
- 4. fusione con il lisosoma;**
- 5. degradazione** del materiale inglobato e riciclo dei componenti base

Pathway dell'autofagia





Pathway dell'autofagia



In seguito allo stimolo autofagico, la porzione iniziale di membrana, ovvero il **fagoforo**, viene assemblato e inizia ad allungarsi per racchiudere i componenti citoplasmatici. Il fagoforo si espande e cresce in un compartimento a doppia membrana, noto come autofagosoma, che sequestra bersagli citoplasmatici, come proteine, organelli e microrganismi.

L'autofagosoma si fonde con il lisosoma per generare l'autolisosoma, in cui il carico viene degradato dagli enzimi idrolitici.

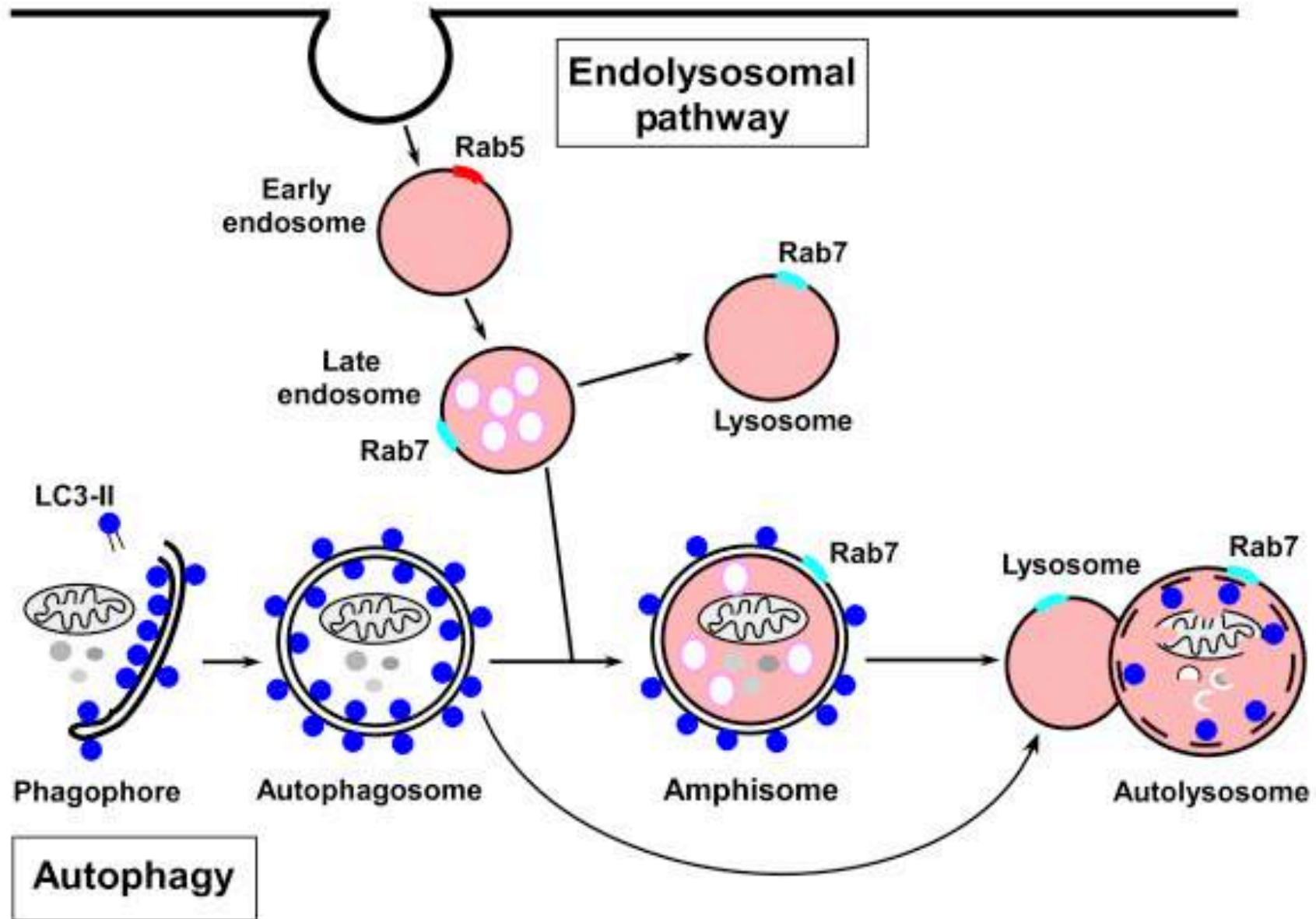
Le proteine chiave coinvolte nell'autofagia nei mammiferi sono mostrate a destra.

ULK1, chinasi simile a Unc-51; FIP200 (proteina che interagisce con la chinasi della famiglia FAK di 200 kDa); BECN1 (beclin 1); ATG14L; PIK3R4 (subunità regolatrice della fosfoinositide 3-chinasi 4); PtdIns3KC3, (fosfatidilinositolo-3 chinasi classe III); WIPI, interazione con fosfoinositide nel dominio di ripetizione WD.

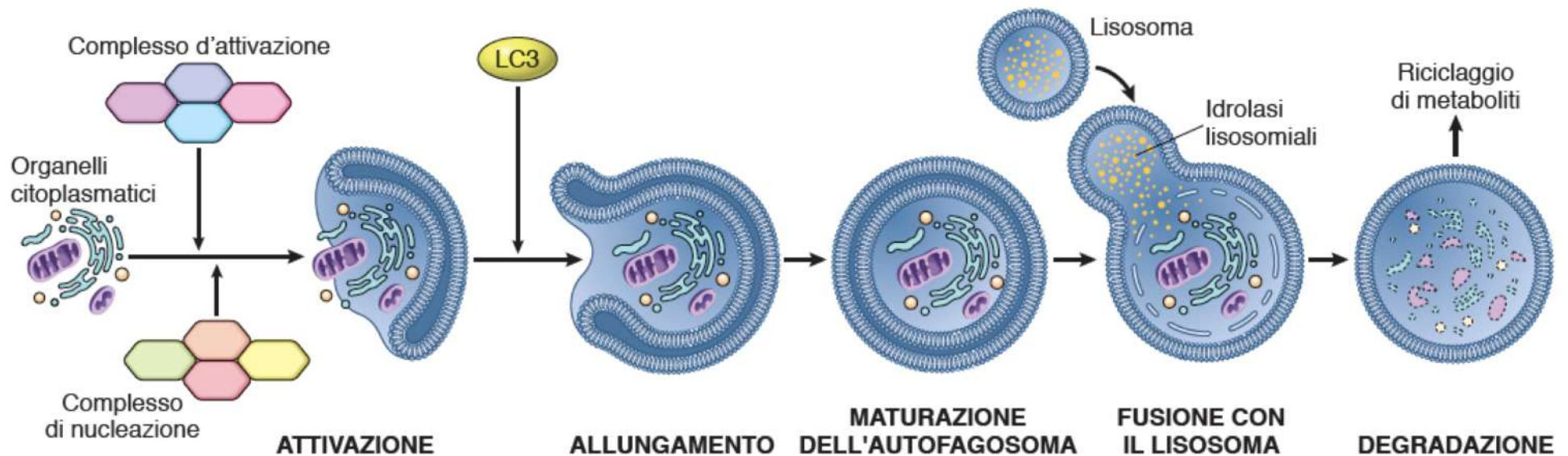
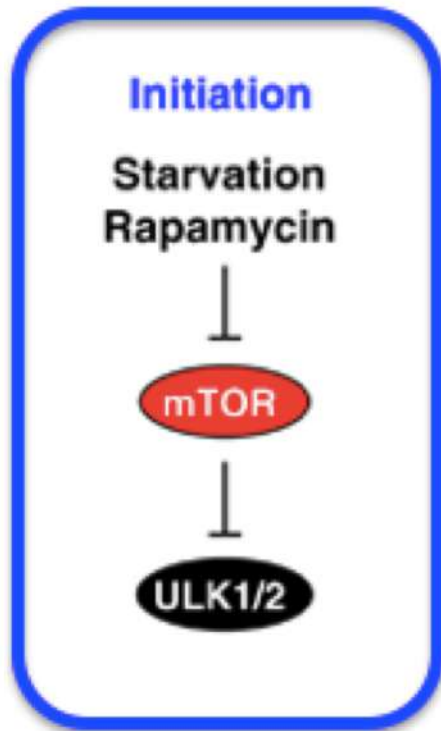
ATG16L1; LC3, catena leggera 3 della proteina 1 associata ai microtubuli; PE, fosfatidiletanolamina;

LAMP2, glicoproteina di membrana associata ai lisosomi 2; VAMP8, proteina di membrana associata alla vescicola 8;

Il trafficking delle vescicole autofagiche e endo-lisosomiali



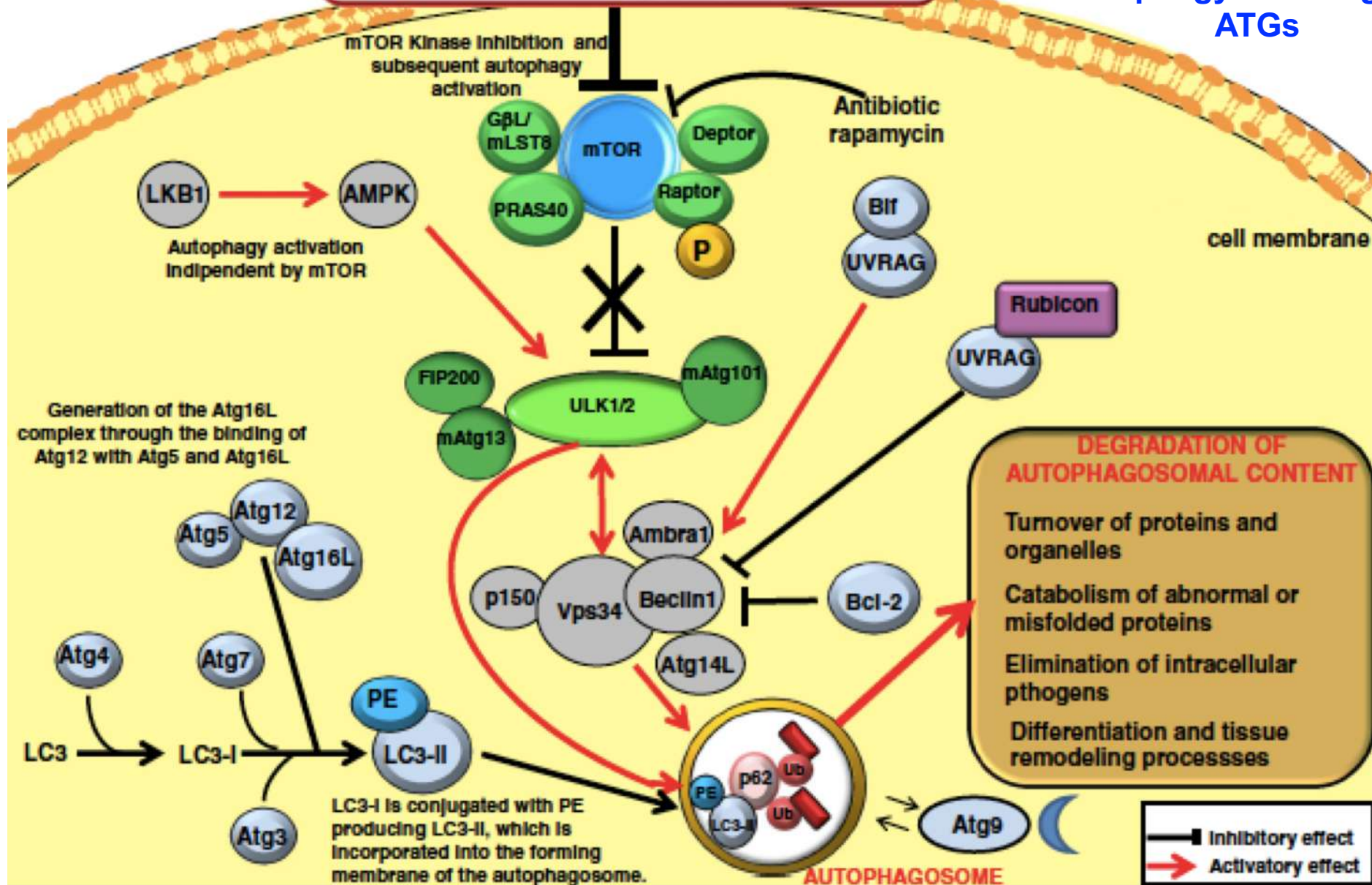
Fattori che attivano il pathway dell'autofagia



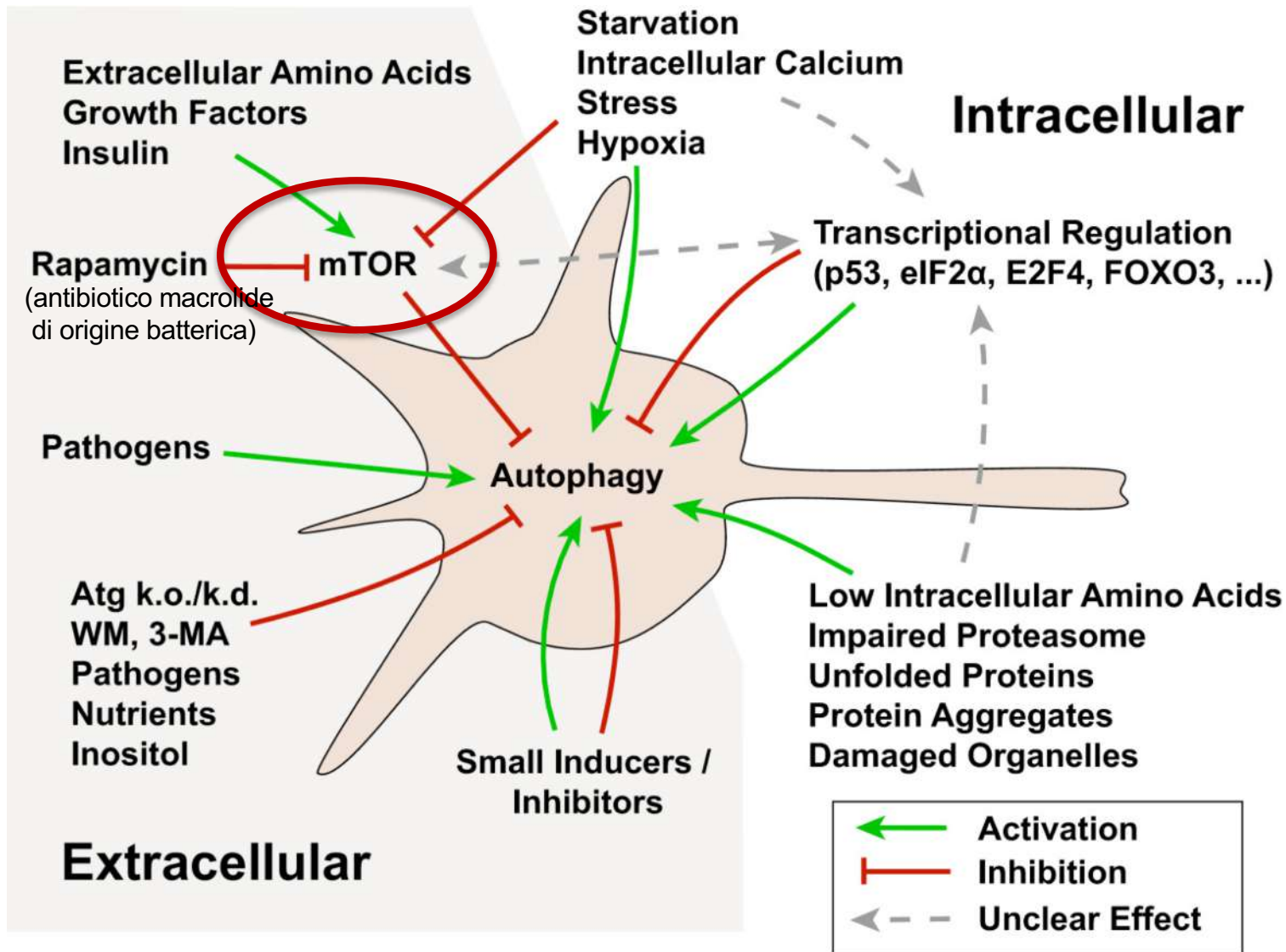
AUTOPHAGY ACTIVATING FACTORS

- ↓ Energy
- ↓ Growth factors or amino acids
- ↓ Nutrients
- ↓ Environmental stress (hypoxia)

Il processo è finemente regolato da una moltitudine di geni tra cui gli **Autophagy-related genes ATGs**



Controllo dell'autofagia



L'autofagia è un processo omeostatico essenziale mediante il quale la cellula degrada ("digerisce") i suoi stessi componenti (aggregati proteici, lipidi, organelli cellulari danneggiati).

La Xenofagia (degradazione di microrganismi) può essere vista come un meccanismo dell'immunità innata di difesa contro i batteri.

mTOR = regolatore negativo dell'autofagia

La rapamicina: un inibitore di mTOR che induce l'autofagia



Lo studio di **mTOR** (mammalian oppure mechanistic target of rapamycin) ha inizio negli anni '60 con una spedizione all'Isola di Pasqua (conosciuta dagli abitanti come Rapa Nui), allo scopo di identificare prodotti derivati da piante e dal terreno con possibili effetti terapeutici. Nel 1972, Suren Sehgal identificò una piccola molecola dal batterio del terreno, *Streptomyces hygroscopicus*, che aveva un forte effetto antifungino e la chiamò rapamicina.

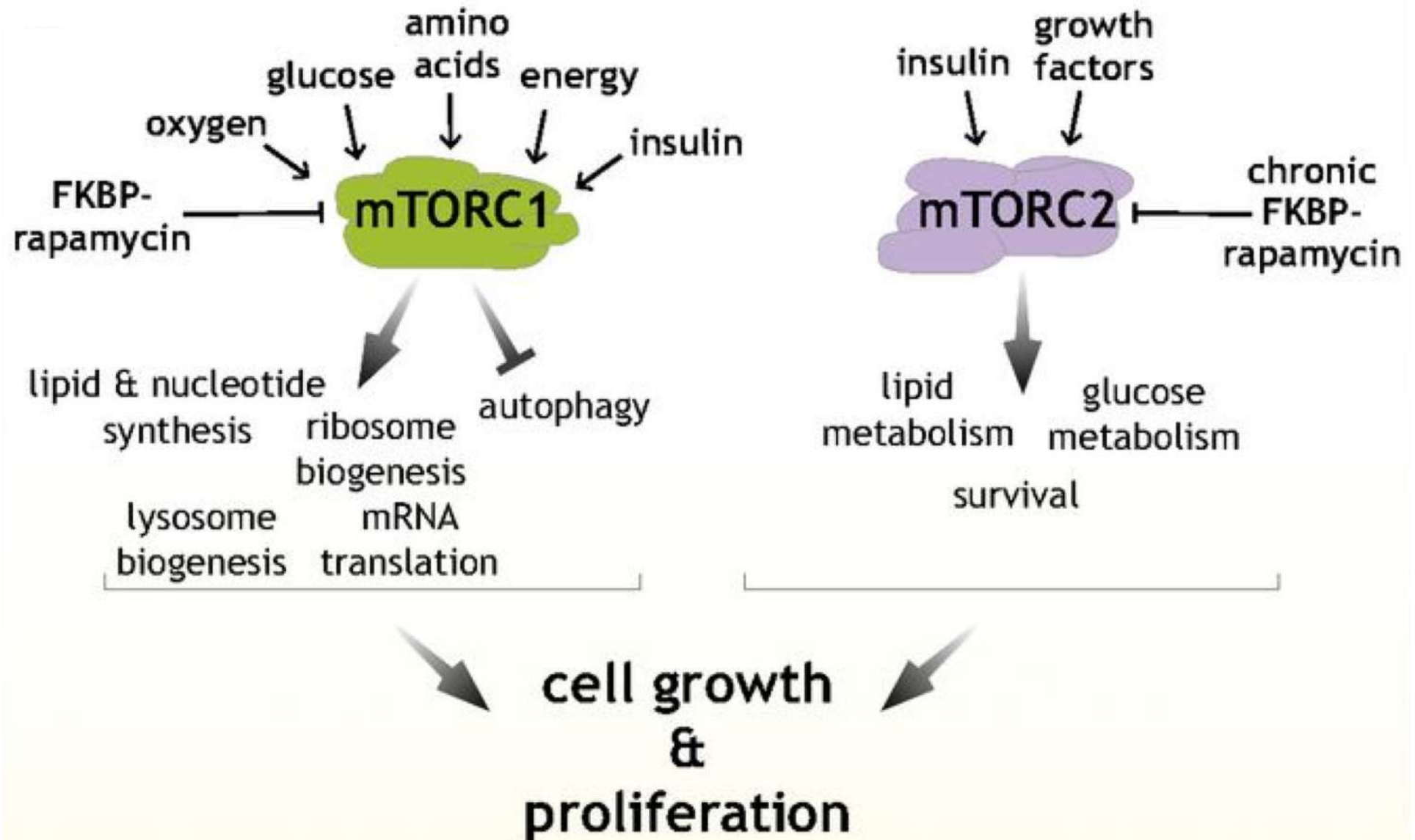
Blenis John (2017) *TOR, the Gateway to Cellular Metabolism, Cell Growth, and Disease* Cell 171: 10-13



La rapamicina è usata come farmaco immunosoppressore (Sirolimus)

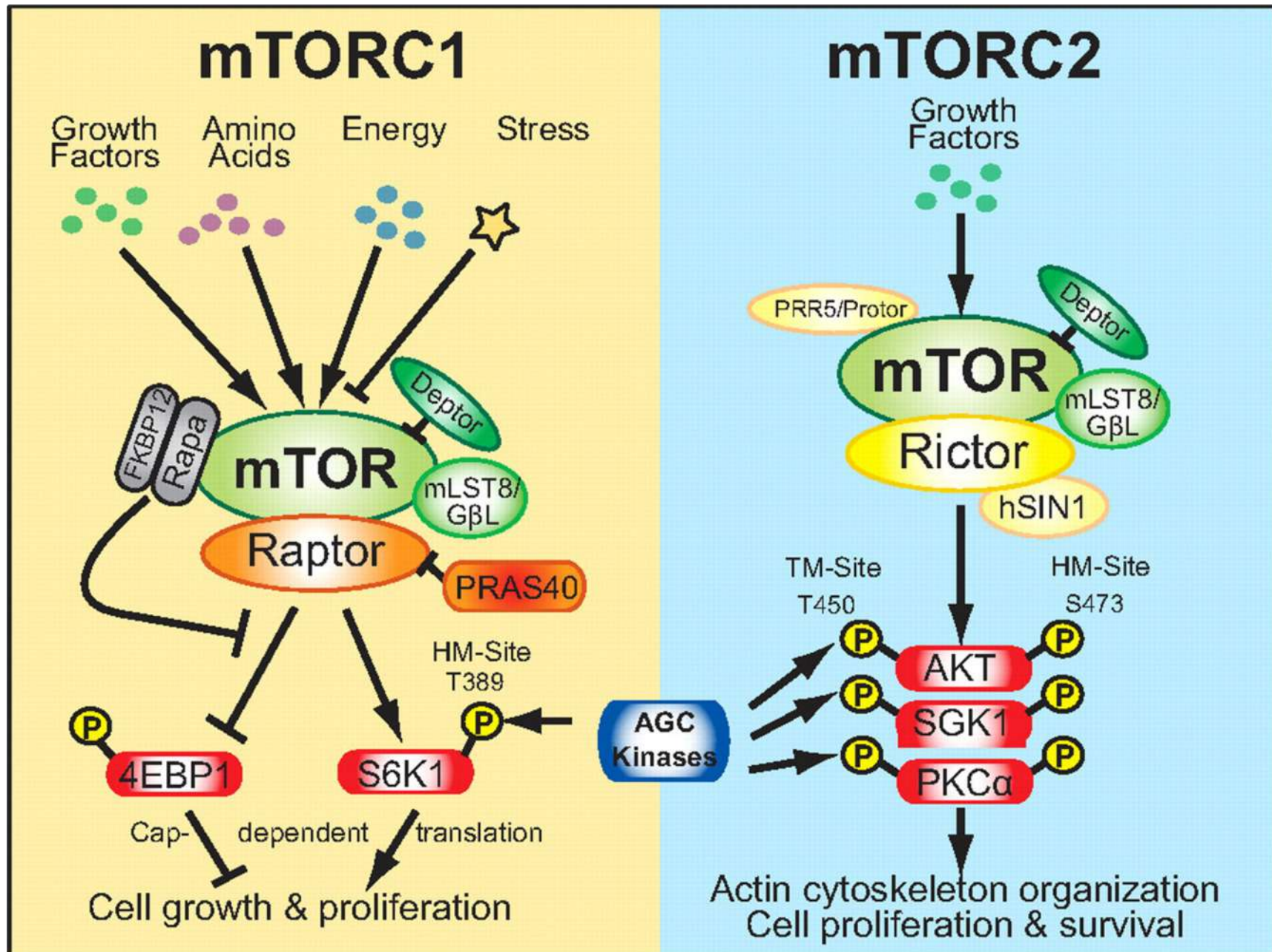


mTOR: subunità catalitica dei complessi mTORC1 e mTORC2

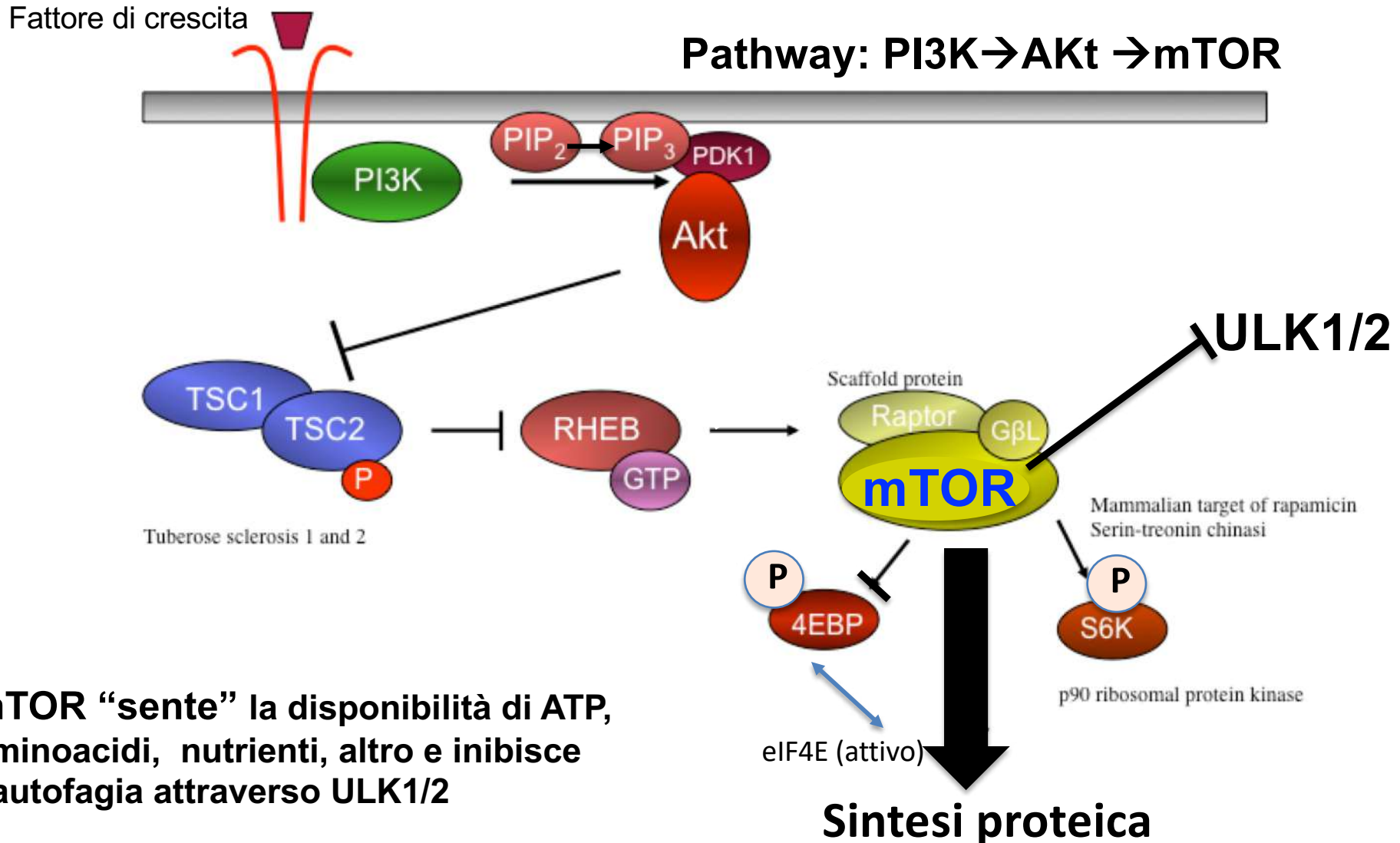


Questo schema mostra i segnali rilevati da mTORC1 e mTORC2 e i processi da essi regolati per controllare la crescita cellulare.

I complessi mTORC1 e mTORC2



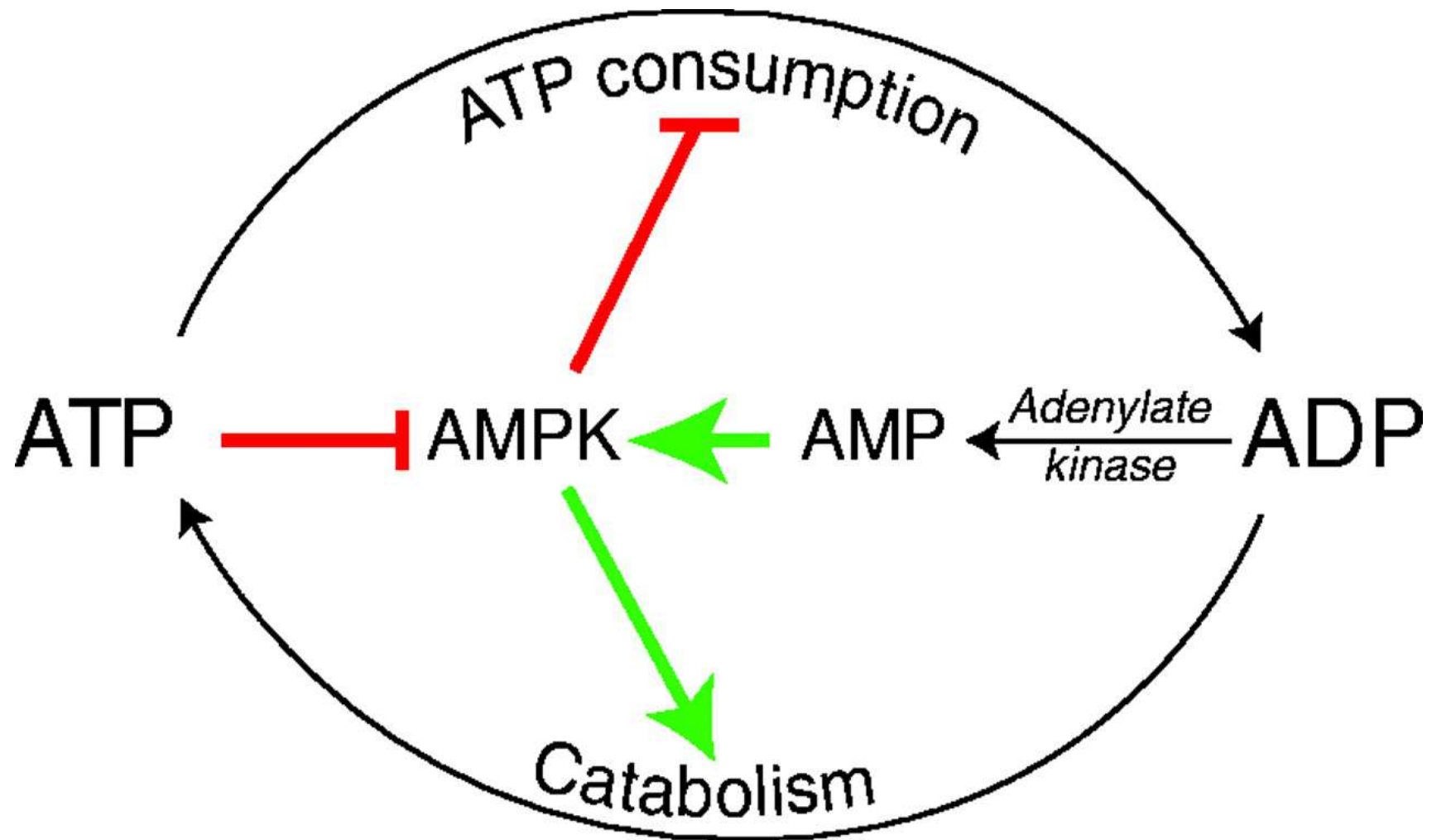
mTOR: serin-treonin chinasi che attiva la sintesi proteica e inibisce l'autofagia quando il livello di ATP e degli aminoacidi è elevato



mTOR “sente” la disponibilità di ATP, aminoacidi, nutrienti, altro e inibisce l'autofagia attraverso ULK1/2

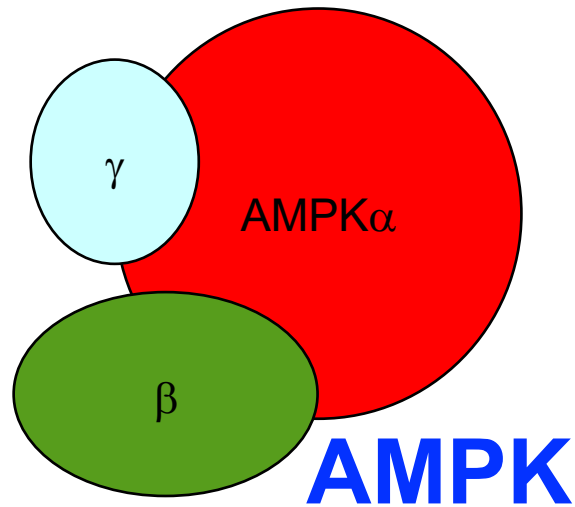
mTOR = regolatore negativo dell'autofagia

La Proteina chinasi attivata da AMP (AMPK) è regolata dal livello di ATP e attiva l'autofagia quando il rapporto ATP/AMP si abbassa

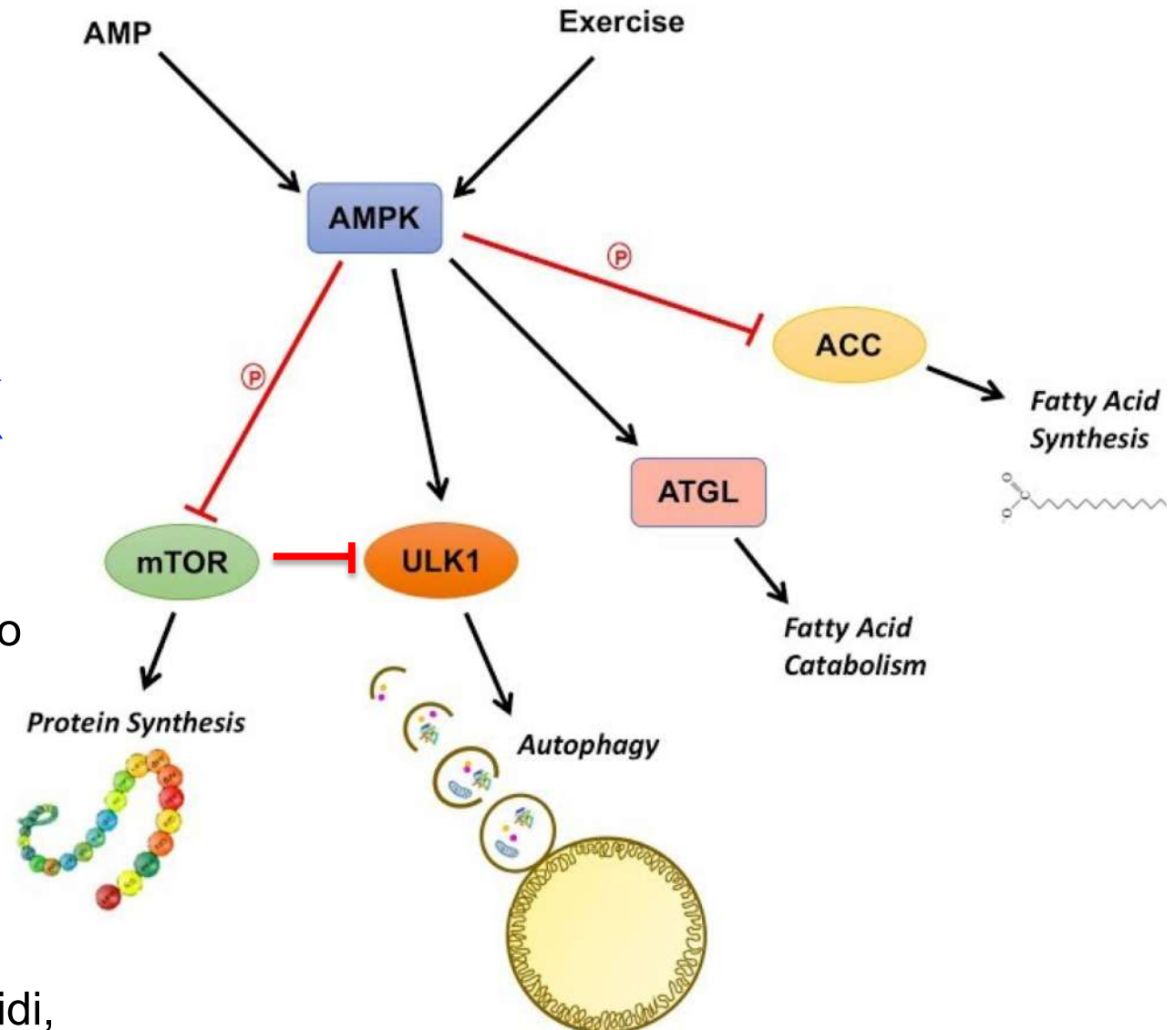


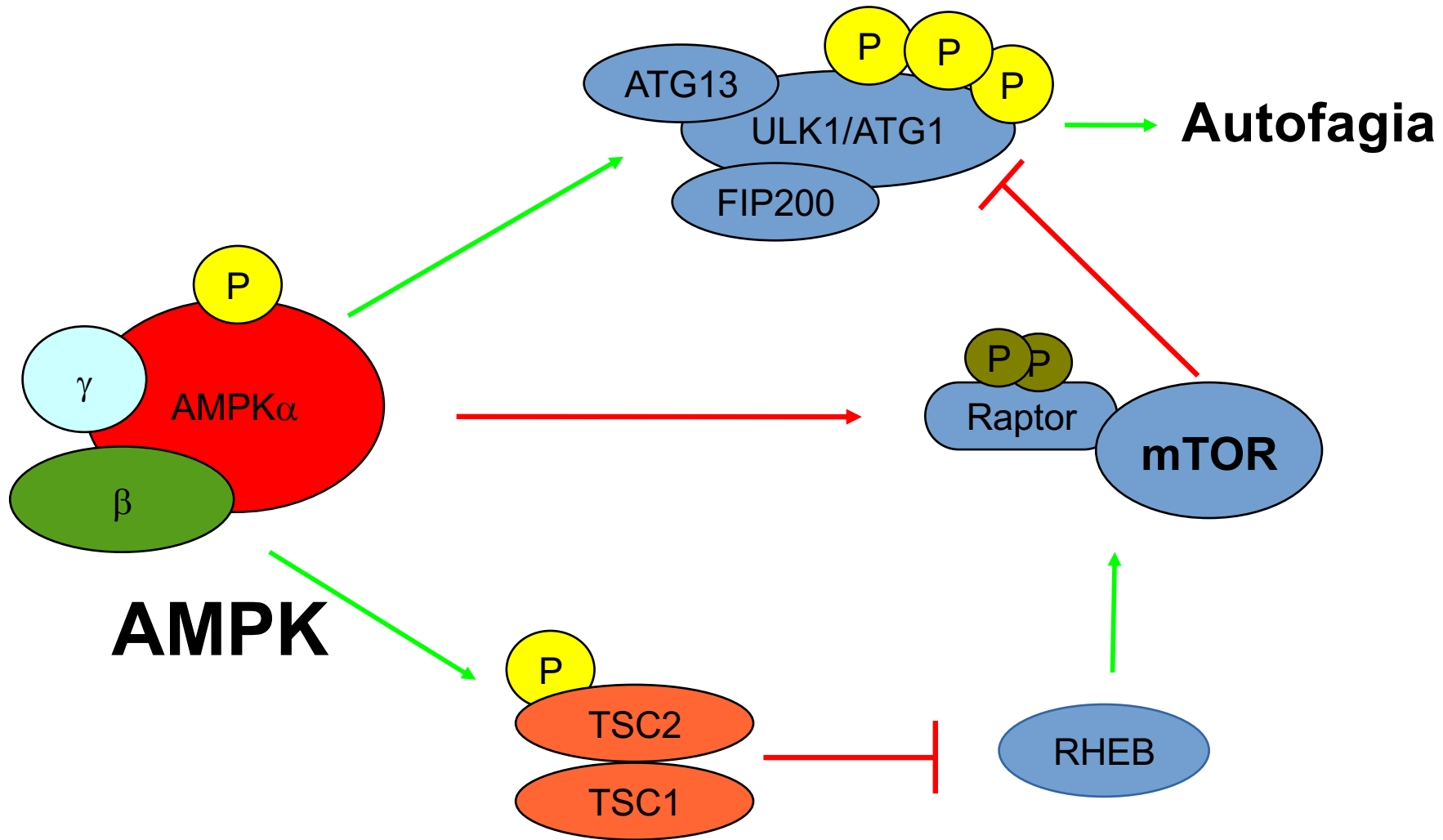
AMPK = regolatore positivo dell'autofagia

La proteina chinasi attivata da AMP (AMPK) attiva l'autofagia direttamente attraverso ULK1 o inibendo mTOR



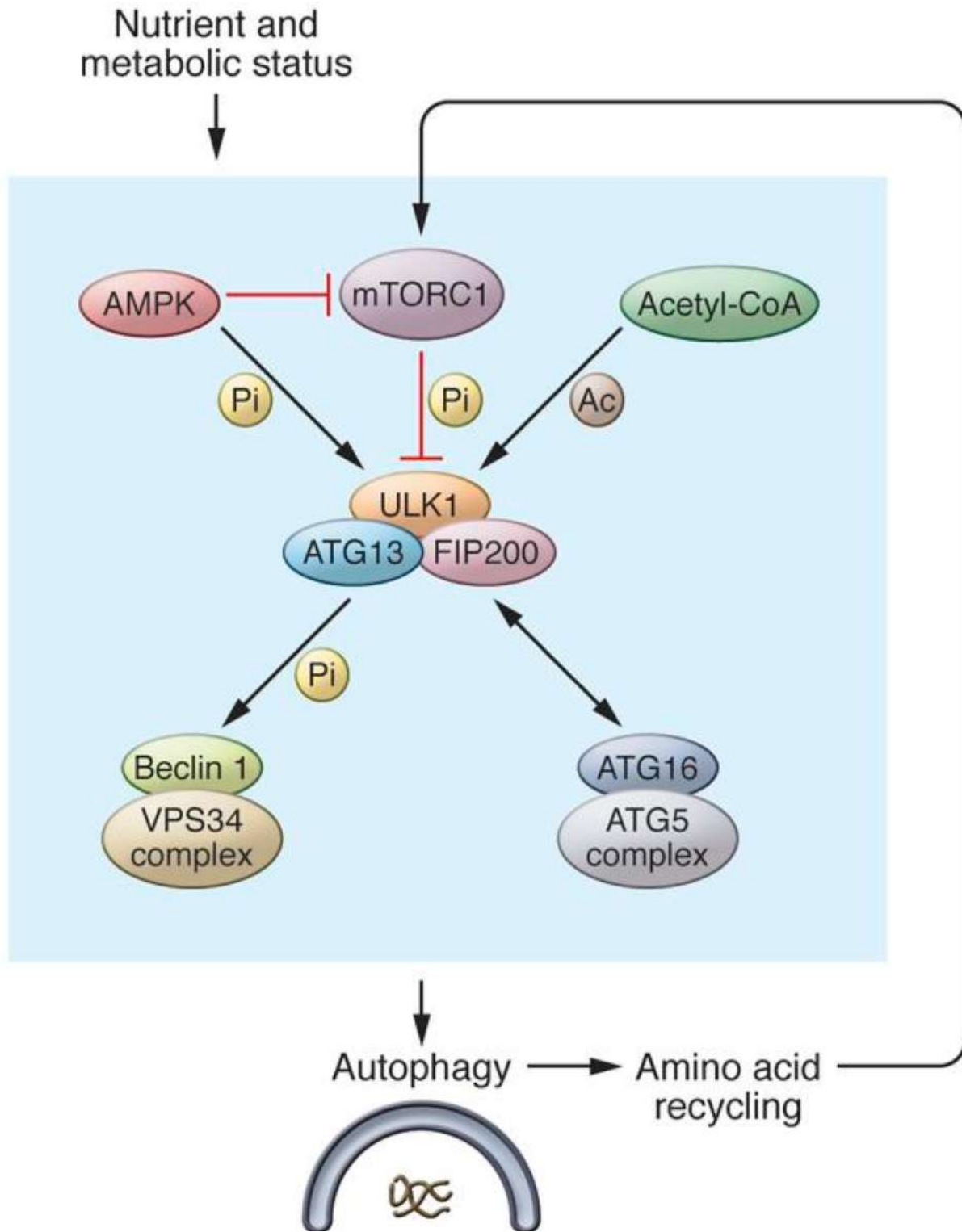
- Eterotrimerico
- Attivato da stress metabolico
- Controlla indirettamente la trascrizione di diversi geni
- Prende parte a diversi pathways metabolici: metabolismo di lipidi e glucidi, divisione cellulare e autofagia



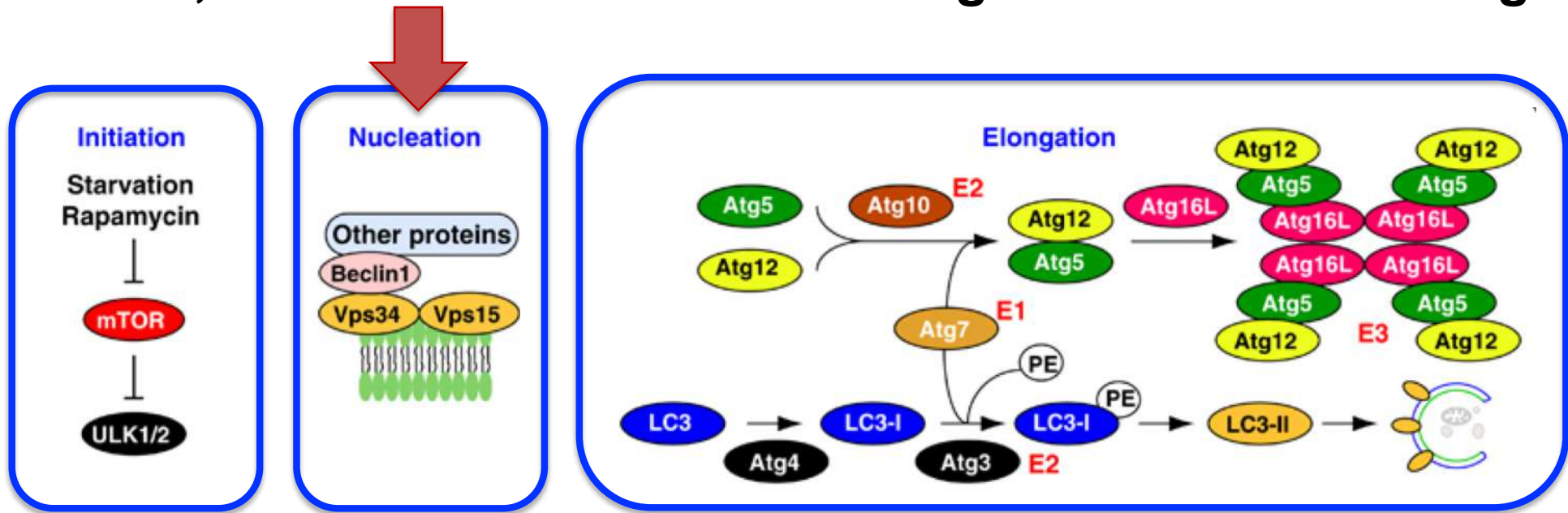


Adattata da Mihaylova et al., Nature Cell Biology, 2011

AMPK inibisce mTOR fosforilando elementi del complesso mTORC1 o anche inibendo a monte la sua attivazione. Può, poi, fosforilare ULK1 e promuovere l'autofagia.

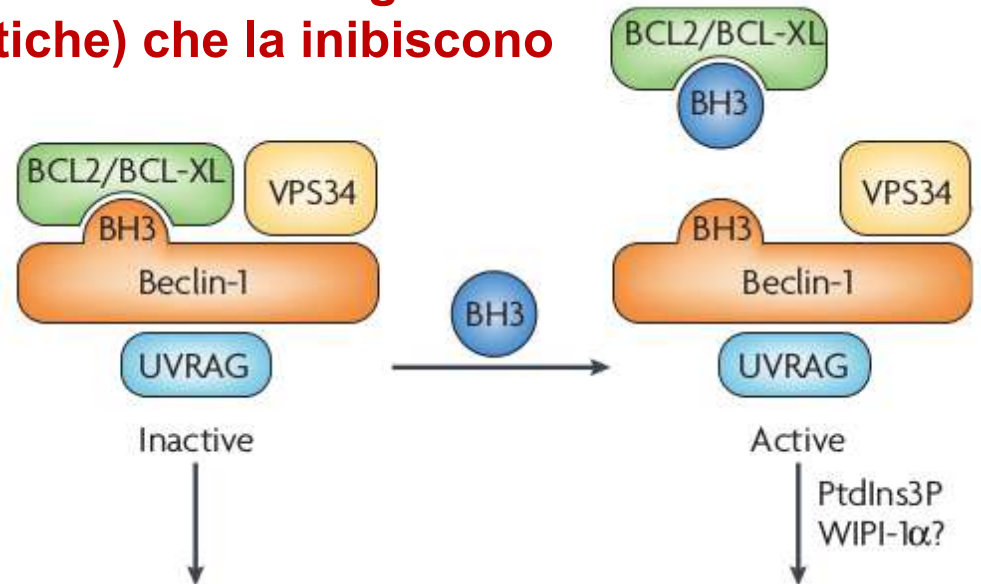


Beclin-1 anche nota come autophagy-related gene (Atg)6 in lievito, ha un ruolo centrale nella regolazione dell'autofagia

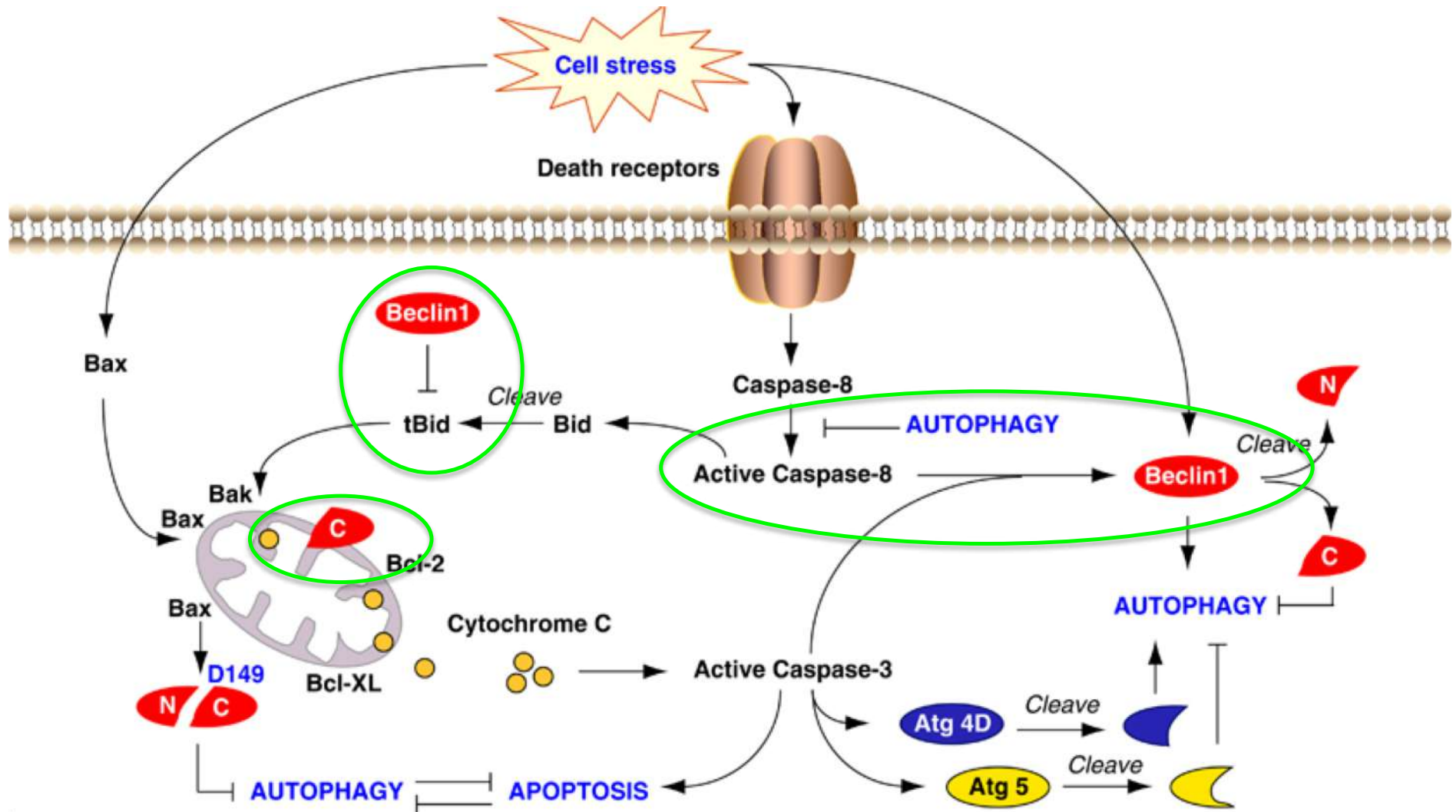


Beclin1 ha un dominio BH3 ed interagisce con Bcl-2/Bcl-XL (proteine anti-apoptotiche) che la inibiscono

Beclin 1 insieme a VPS34, VPS15 e ATG14 costituisce il complesso della fosfatidil-inositolo 3-chinasi di classe III (PtdIns3KC3) cruciale per gli stadi iniziali dell'assemblaggio degli autofagosomi (**nucleazione** del fagoforo)



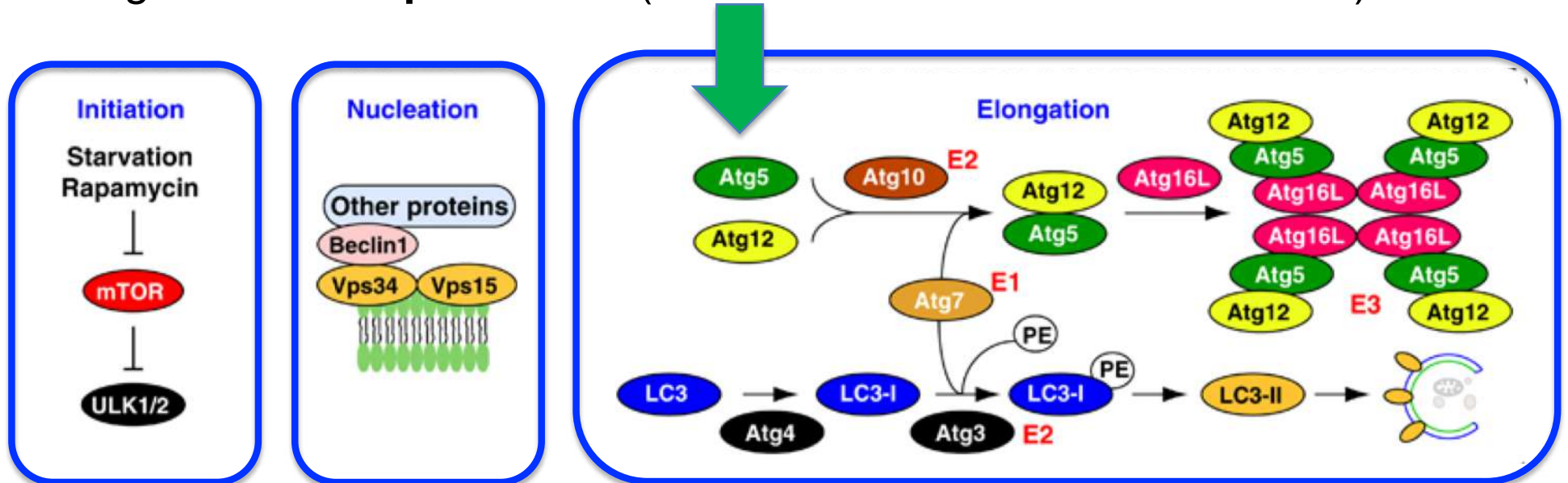
Crosstalk tra apoptosi e autofagia



L'autofagia e l'apoptosi condividono stimoli e vie di segnalazione comuni e mostrano un certo grado di mutua inibizione.

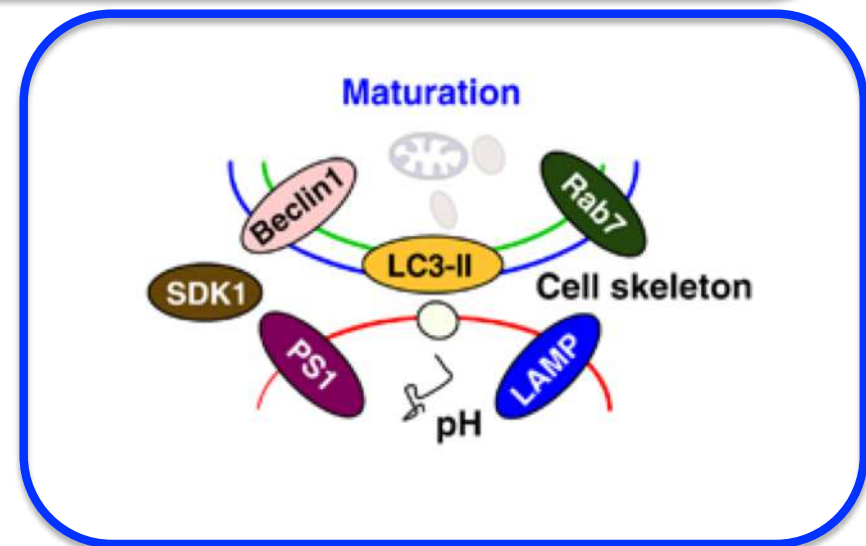
Regolazione dell'autofagia

L'**elongazione** dell'autofagosoma è indotta da due sistemi di coniugazione "ubiquitin-like" (ATG5-ATG12-ATG16 e LC3-PE)

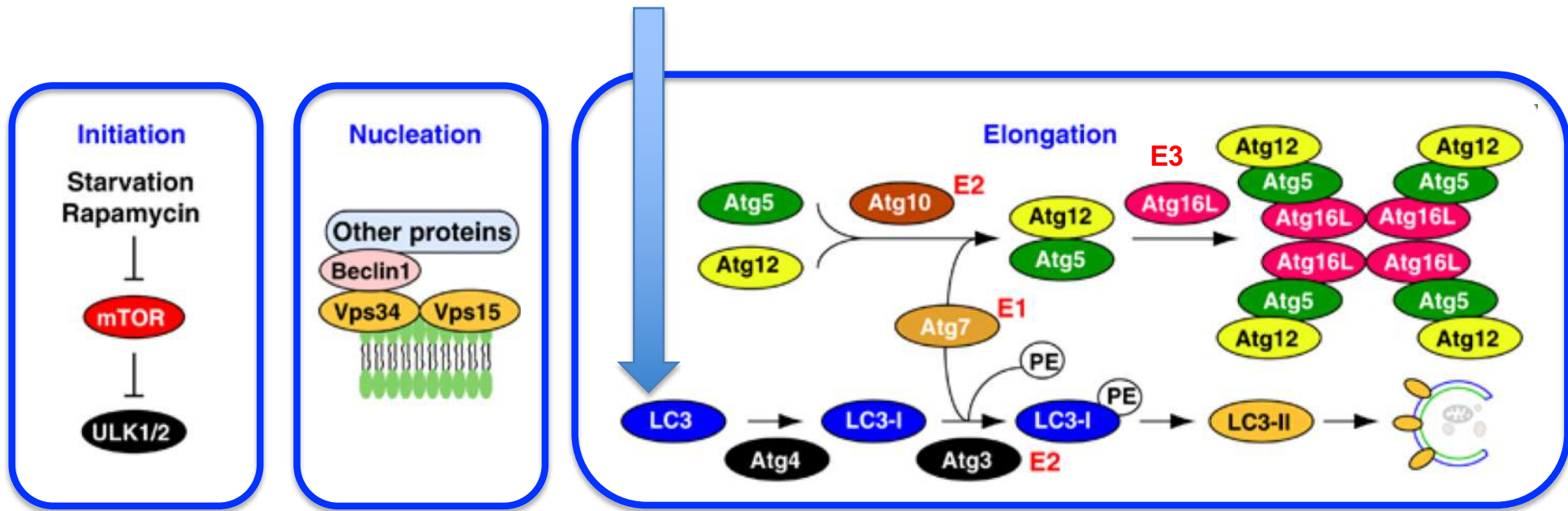


Atg5 è un gene essenziale per l'autofagia. La proteina è legata ad ATG12 costituendo un complesso di coniugazione ubiquitina-simile.

Il complesso ATG5+ATG12+ATG16 si localizza sugli autofagosomi e funziona a monte della lipidazione di LC3.



Lipidazione di LC3



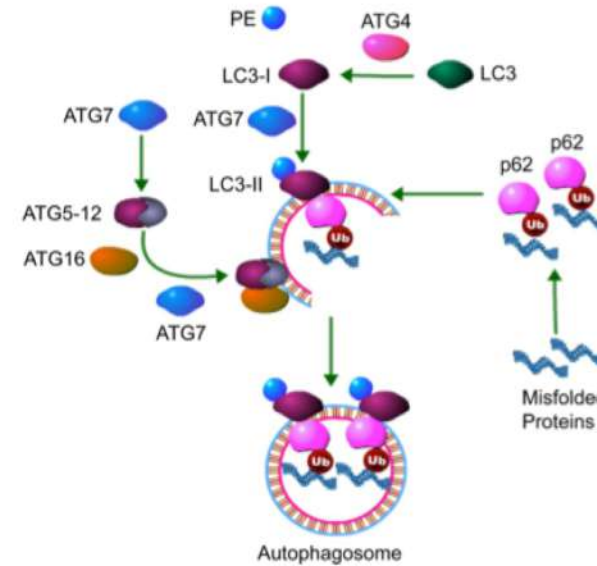
LC3 (Atg8) esiste in forma citoplasmatica (LC3 e LC3-I) oppure associata alle membrane dell'autofagosoma (LC3-II).

La forma associata alla membrana si ottiene accoppiando LC3 (Microtubule-associated protein light chain 3) alla **fosfatidiletanolamina (PE)** che è un costituente lipidico delle membrane. Questa modificazione post-traduzionale, definita lipidazione avviene perchè **ATG4** taglia LC3 rilasciando LC3-I che espone un residuo di Glicina a cui la fosfatidiletanolamina (PE) può successivamente coniugarsi generando LC3-II che quindi si localizza sulla membrana dell'autofagosoma.

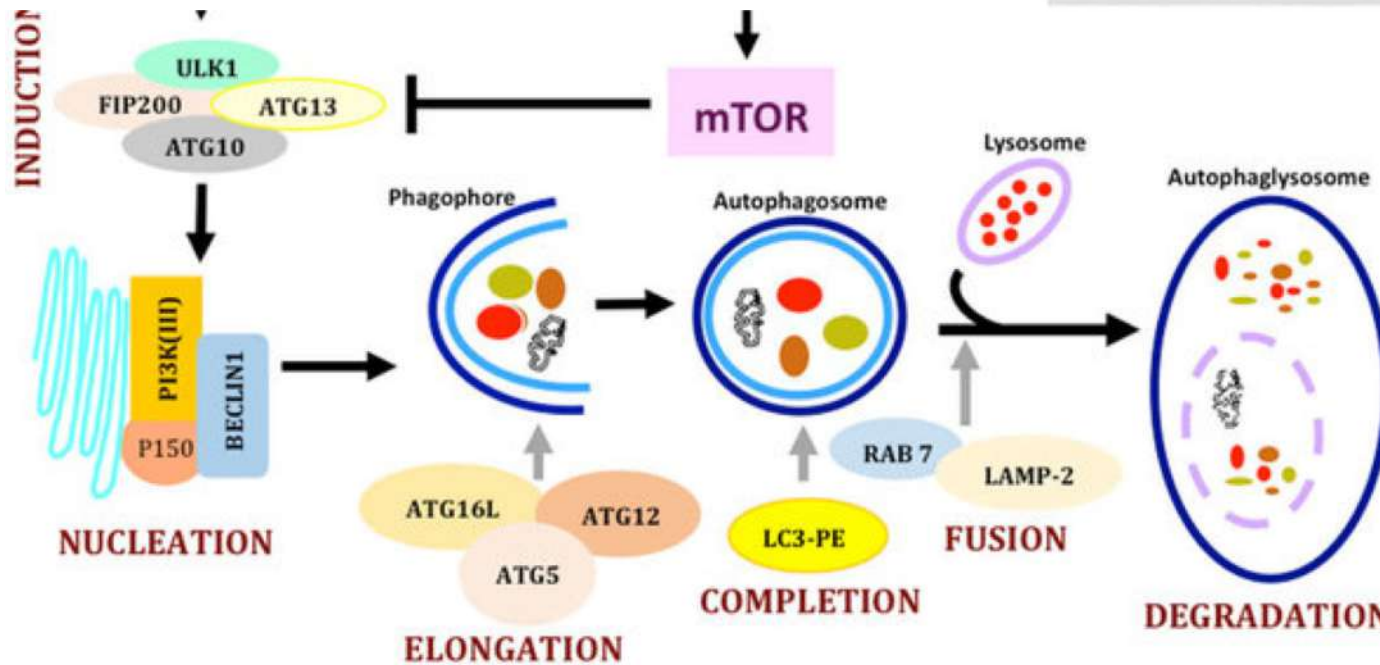
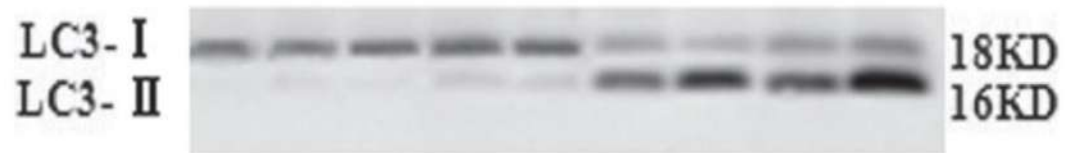
Microtubule-associated protein light chain 3 (LC3)

LC3-II: forma coniugata con fosfatidiletanolamina (LC3-PE) che viene reclutata negli autofagolisosomi

LC3-II è un marcatore di autofagia



LC3-I viene modificato e lipidato da una molecola di fosfatidiletanolamina (PE). Quando questo succede, il processo autofagico è in atto.



L'autofagia è coinvolta nelle patologie neurodegenerative



Motor neuron diseases

Protein misfolding

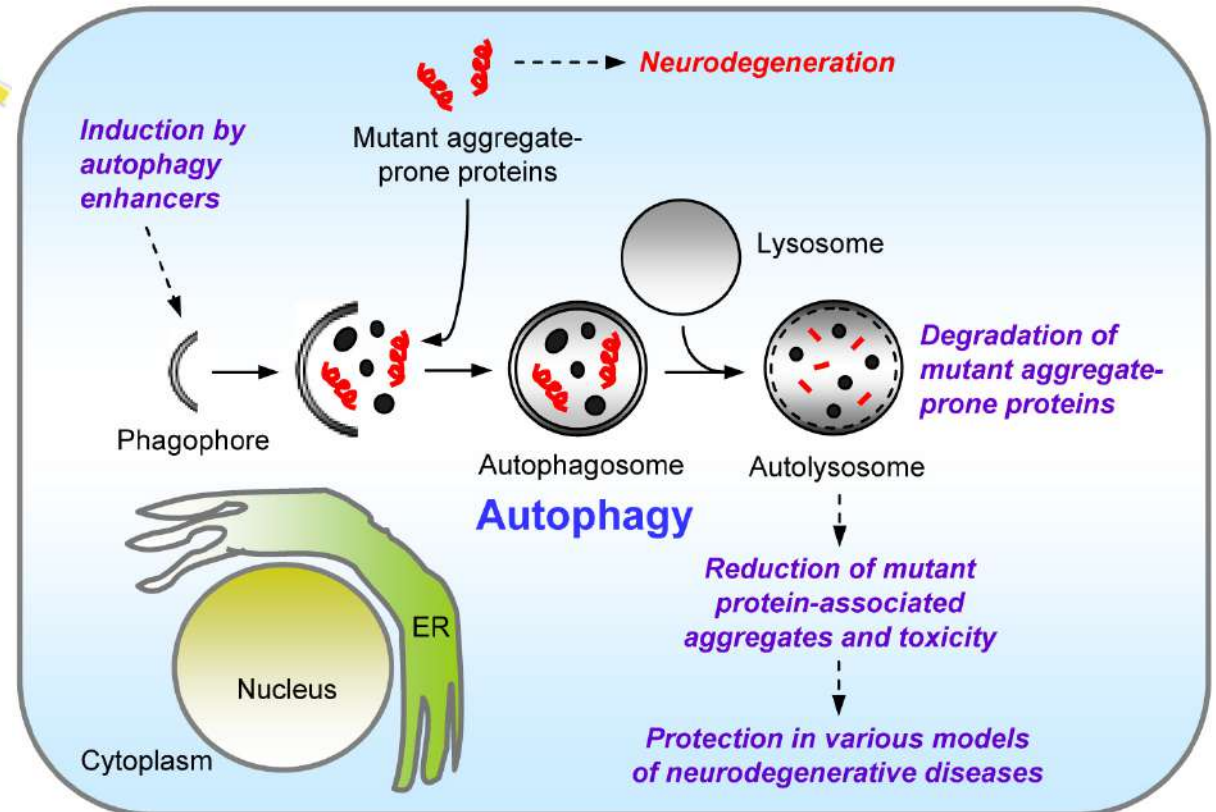
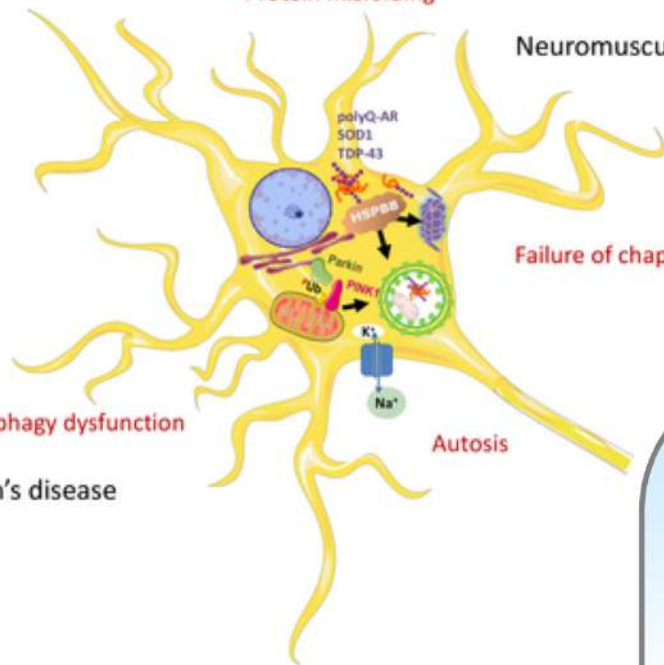
Neuromuscular disorders

Failure of chaperone-assisted autophagy

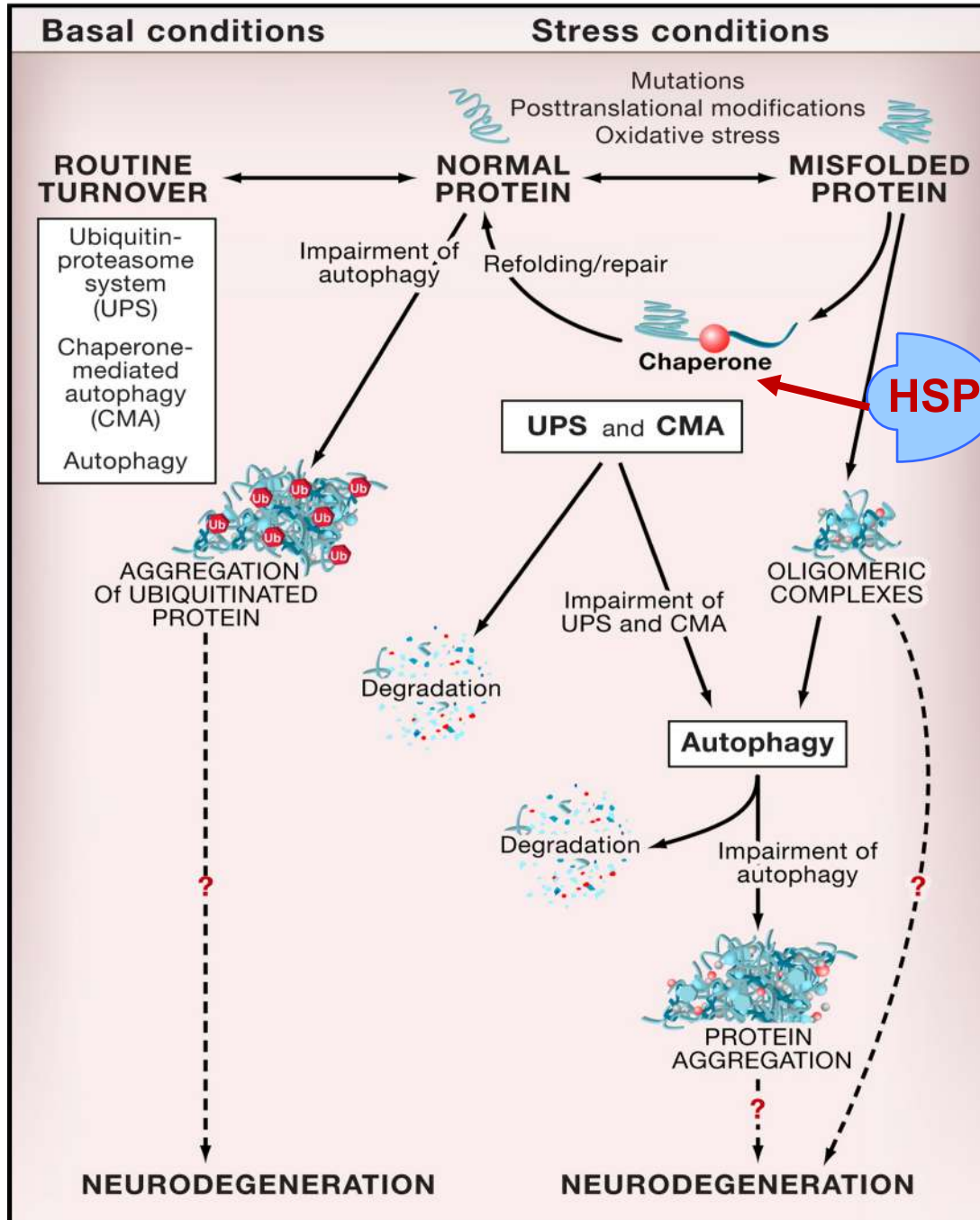
Mitophagy dysfunction

Autosis

Parkinson's disease



L'autofagia previene le malattie neurodegenerative



Il processo funziona come una “pattumiera” ed è particolarmente importante in cellule terminalmente differenziate dove le sostanze tossiche non vengono diluite dalla duplicazione cellulare.

UPS: ubiquitin-proteasome system

CMA: chaperon-mediated autophagy