



EFFECT OF GLUTAMATE ON AUTOPHAGY INDUCED
BY ENERGY STRESS IN SH-SY5Y NEURONS

*UTICAJ GLUTAMATA NA AUTOFAGIJU INDUKOVANU
ENERGETSKIM STRESOM U SH-SY5Y NEURONIMA*

Tatjana Vukotić¹, Vladimir Trajković^{1,2}

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Srbija

² Institut za mikrobiologiju i imunologiju

Correspondence: tatjanavukotic@gmail.com

Abstract

Introduction: Autophagy is a cytoprotective mechanism by which cells adapt to stress. In neurons, the question whether enhanced autophagy promotes cell death or cell survival is a subject of considerable debate, especially in excitotoxic conditions such as cerebral ischemia. Excitotoxicity is a pathological process that involves overstimulation of the excitatory receptors, primarily the ionotropic and metabotropic glutamate receptors.

Material and methods: The viability of neuroblastoma SH-SY5Y cells was investigated by MTT assay for mitochondrial dehydrogenase activity. The appearance of autophagolysosomes and autophagic flux were determined by acridine orange staining (AO) and immunoblot, and the expression of autophagic genes was assessed by quantitative RT-PCR (Real time polymerase chain reaction).

Results: Viability test showed a decrease in cell numbers, while AO test demonstrated a decrease in number of acidic vesicles in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) medium with glutamate, compared to HBSS medium alone. Accumulation of autophagosome-associated LC3-II protein was observed by immunoblot in HBSS medium, while LC3-II levels were lower in HBSS medium with glutamate. Quantitative RT-PCR showed reduced expression of the autophagy genes in HBSS medium with glutamate, compared to the HBSS medium.

Conclusion: The research confirmed that glutamate, during energy deprivation in vitro, leads to a decrease in autophagy in neurons, possibly preventing the induction of autophagy by reducing the transcription of autophagy genes.

Keywords:

autophagy,
excitotoxicity,
glutamate



Sažetak

Uvod: Autofagija je citoprotektivni mehanizam kojim se ćelija adaptira na uslove stresa. Da li povećanje autofagije promoviše neuronsku ćelijsku smrt ili preživljavanje tema je brojnih rasprava, a posebno je diskutabilna uloga autofagije u ekscitotoksičnim stanjima, kao što je cerebralna ishemija. Ekscitotoksičnost je patološko stanje koje podrazumeva prekomernu stimulaciju ekscitatornih receptora, pre svega jonotropnih i metabotropnih glutamatskih receptora.

Materijal i metode: Vijabilitet neuroblastomskih SH-SY5Y ćelija ispitivan je MTT testom za aktivnost mitohondrijalnih dehidrogenaza. Pojava autofagolizozoma i autofagni fluks određeni su bojenjem akridin oranžom (AO) i imunoblotom, dok je ekspresija autofagnih gena praćena kvantitativnom RT-PCR-om (Real time polymerase chain reaction).

Rezultati: Test vijabilnosti je pokazao manji broj vijabilnih ćelija, dok je AO testom uočen manji broj kiselih vezikula u HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) medijumu sa glutamatom nego u samom HBSS medijumu. Imunoblotom je zapažena akumulacija autofagnog proteina LC3-II u HBSS medijumu, dok je koncentracija LC3-II bila manja u HBSS medijumu sa glutamatom. Kvantitativni RT-PCR pokazao je smanjenu ekspresiju autofagnih gena u kombinaciji HBSS medijuma sa glutamatom u odnosu na HBSSmedijum.

Zaključak: Istraživanje je potvrdilo da glutamat tokom energetske deprivacije u in vitro uslovima dovodi do smanjenja autofagije u neuronima, najverovatnije sprečavajući indukciju autofagije smanjenjem transkripcije autofagnih gena.

Ključne reči:

autofagija,
ekscitotoksičnost,
glutamat

Uvod

Makroautofagija (u nastavku autofagija) evolutivno je konzerviran proces u kome ćelija razlaže sopstvene proteine i organele tako što ih najpre odvoji u vakuolu sa dvostrukom membranom, nazvanu autofagozom. Autofagozom se zatim spaja sa lizozomom, pri čemu nastaje autolizozom (autofagolizozom), gde se ćelijski sadržaj razlaže dejstvom kiselih hidrolaza (1-3). Bazalni nivo autofagije je u svim eukariotskim ćelijama prisutan kao jedan od glavnih mehanizama kontrole kvaliteta i eliminacije oštećenih i nefunkcionalnih komponenti (4). Autofagija se dodatno indukuje u uslovima stresa, kao što su gladovanje, hipoksija, oksidativni stres, infekcija i zračenje jer je jedna od funkcija autofagije obezbeđivanje energije i makromolekula neophodnih za preživljavanje ćelije u stanjima stresa, zbog čega se primarno smatra citoprotektivnom (5). Iako pomaže u održanju homeostaze i preživljavanju, preterana aktivacija autofagije može da dovede do oštećenja i smrti ćelije, pa se autofagija smatra i alternativnim putem ćelijske smrti (tip II programirane ćelijske smrti) (6).

Indukcija autofagije regulisana je kompleksom ULK1 (engl. Unc-51-like kinase), koji se sastoji od proteina ULK1/2, ATG13 (engl. autophagy related gene-13), FIP200 (engl. focaladhesion kinase family-interacting protein of 200 kD) i ATG101. Tokom ćelijskog stresa inhibira se serin-treonin kinaza mTOR (engl. mammalian target of rapamycin), što omogućava aktivaciju ULK1 unutar ULK1-ATG13-FIP200-ATG101 kompleksa i inicijaciju autofagije. Fosforilacijom AMBRA1 proteina (engl. activating molecule in beclin-1 autophagy 1) ULK1 kinazastimuliše translokaciju PIK3C3 (engl. phosphatidylinositol 3 kinase class III) kompleksa na membranu endoplazmatskog retikuluma. Nukleacija i elongacija preautofagozomske membrane, tj. fagofore, kontrolisana je kompleksom

koji čine PIK3C3, serin-treonin kinaza p150, ATG14 i beclin 1 (BECN1). U kasnijem procesu rasta i sazrevanja autofagozoma učestvuju dva konjugaciona sistema: prvi čine ATG12-ATG5-ATG16L proteini, a drugi je sastavljen od proteaze ATG4 i LC3 (engl. microtubule-associated light chain-3) proteina. Oba sistema u prvom koraku aktivacije koriste protein ATG7. Konjugaciju ATG12 sa ATG5 omogućava ATG10. Konjugat ATG12-ATG5 zatim stupa u interakciju sa proteinom ATG16L, vezanim za membranu fagofore. Pre aktivacije, protein LC3 razlaže cisteinska proteaza ATG4, formirajući solubilnu formu LC3-I. Sledi aktivacija LC3-I proteinom ATG7, a tako aktivirani LC3-I prenosi se na protein ATG3. Konačnu konjugaciju LC3-I i fosfatidiletanolamina (PE) omogućava kompleks ATG5-ATG12. Time protein LC3-I postaje kovalentno vezan za lipidnu komponentu PE novonastale fagofore, te se naziva LC3-II. Tokom procesa sazrevanja citoplazmatski sadržaj se pakuje u autofagozom. Kada je stvaranje autofagozoma završeno on se spaja sa lizozomom, stvarajući autofagolizozom u kome se vrši digestija makromolekulskog sadržaja (7-11). Kod sisara je prepoznavanje citoplazmatskog sadržaja, koji se selektivno pakuje u autofagozom, posredovano adaptorskim proteinima kao što su p62 (engl. p62/sequestosome1-SQSTM1) i NBR1 (engl. the neighbour of BRCA1 gene). Oba proteina su specifični autofagni supstrati i receptori za citoplazmatski sadržaj obeležen ubikvitinom (12, 13).

Ekscitotoksičnost se definiše kao patološko stanje koje podrazumeva prekomernu stimulaciju ekscitatornih receptora, pre svega jonotropnih i metabotropnih glutamatskih receptora. Kada se glutamatski receptori aktiviraju dolazi do depolarizacije neurona i povećanja intraćelijske koncentracije kalcijuma (Ca²⁺), prvenstveno influkksom kroz NMDA (N-metil-D-aspartat) receptore. Nakon toga dolazi do otpuštanja Ca²⁺ iz unutarćelijskih depoa,

što vodi nastanku slobodnih radikala, aktivaciji različitih enzima, oštećenju ćelijskih organela i pokretanju različitih puteva ćelijske smrti. Fenomen ekscitotoksičnosti učestvuje u patogenezi niza akutnih i hroničnih neuroloških poremećaja, poput ishemijskog moždanog udara, epilepsije, toksične encefalopatije i neurodegenerativnih bolesti (14).

Studije su pokazale da povećan broj autofagozoma u neurodegenerativnim bolestima može da bude odbrambeni mehanizam ćelije, kojim se trudi da ukloni mutirane ili oštećene proteine i spreči nakupljanje oštećenih i nerazgrađenih mitohondrija (15, 16). Za razliku od toga, uloga autofagije u stanjima akutnih ekscitotoksičnih napada, poput cerebralne ishemije, nije potpuno jasna. Hipoteza istraživanja je da glutamat modulira autofagiju. Cilj istraživanja je bilo ispitivanje uticaja glutamata na autofagiju indukovanu deprivacijom nutrijenata u SH-SY5Y neuronima u in vitro modelu glutamatske ekscitotoksičnosti, kao i uloge modulacije autofagije glutatom na preživljavanje neurona.

Materijal i metode

Ćelijske kulture

Linija humanog neuroblastoma SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) inkubirana je na 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% ugljen-dioksida (CO₂) u Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's Nutrient Mixture F12 (Sigma-Aldrich, SAD) sa dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma (Sigma-Aldrich, SAD) i 10 µl/ml penicilina/streptomcina (Sigma-Aldrich, SAD). Po dostizanju konfluentnosti ćelije su odlepljivane tripsinom I, u cilju ispitivanja vijabilnosti, zasejavane u ploče sa 96 bunara (2 × 10⁴ ćelija/bunaru). Za imunoblot analize i lančanu reakciju polimeraze u realnom vremenu (engl. Real time polymerase chain reaction, RT-PCR) ćelije su inkubirane u gustini od 1,5 × 10⁶ ćelija u Petrijeve posude. Sve ćelije su nakon 24 sata tretirane glutaminskom kiselinom (ICN Biomedicals, SAD) u Hank's Balanced Salt Solution (PAA, Austrija) u prisustvu i odsustvu inhibitora lizozomalne proteolize bafilomicina A1 i pepstatina (Sigma-Aldrich, SAD).

MTT test

Redukcijom tetrazolijumske soli 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) (Sigma-Aldrich, SAD) dehidrogenazama ćelijskih mitohondrija dolazi do cepanja tetrazolijumskog prstena i pojave formazana, koji poseduje karakterističnu crvenoljubičastu boju. Redukciju MTT-a mogu da izvrše samo aktivne dehidrogenaze živih ćelijskih mitohondrija, te je ovaj kolorimetrijski test korišćen za merenje broja vijabilnih ćelija, njihove aktivnosti i proliferacije. Nakon završetka kultivacije i uklanjanja medijuma u bunare je nalivano po 100 µl rastvora MTT (0,5 mg/ml). Posle inkubacije od 30 minuta, MTT je uklonjen i formazan rastvoren u 50 µl dimetil-sulfoksida (DMSO, Sigma-Aldrich, SAD). Intenzitet nastale boje je određivan na automatskom čitaču mikroti-

tarskih ploča pri talasnoj dužini svetlosti od 570 nm (Sunrise; Tecan, Dorset, Velika Britanija). Intenzitet razvijene boje i odgovarajuća vrednost apsorbancije proporcionalni su broju živih ćelija. Rezultati su prikazani kao procenat MTT apsorbance u odnosu na apsorbancu dobijenu u kulturi netretiranih ćelija.

Određivanje autofagije u ćelijama obojenim akridin oranžom

Porast broja ili zapremine kiselih vezikula, autofagolizozoma, analiziran je na fluorescentnom mikroskopu nakon bojenja ćelija pHsenzitivnom bojom akridin oranžom (Sigma-Aldrich, SAD). Akridin oranž emituje narandžastocrvenu fluorescencu u kontaktu sa kiselim autofagolizozomima, dok na neutralnom pH, kakav je u citoplazmi, fluorescira zeleno. Po završetku tretmana ćelije su inkubirane sa akridin oranžom (1 µM, 15 min, 37°C), a zatim analizirane na invertnom fluorescentnom mikroskopu (Leica Microsystems DMIL, Nemačka) koristeći Leica Microsystems DFC320 kameru i Leica Application Suite softver.

Imunoblot analiza

Ekspresija proteina je određena iz ukupnog ćelijskog ekstrakta imunoblot analizom. Po isteku odgovarajućih tretmana ćelije su lizirane, centrifugirane, a supernatanti su izdvojeni za dalju analizu. Iz pripremljenih uzoraka uzeta je ista količina proteina i potom razdvojena na osnovu razlika u molekulskim masama tehnikom denaturišuće gel elektroforeze na 10-15% poliakrilamidnom gelu. Po završetku elektroforeze proteini sa gela su transferisani na nitrocelulozne membrane (Hybond C; GE Healthcare, SAD) pomoću aparature za polusubi transfer (TE 70 Semi-dry transfer unit; Amersham Biosciences, SAD), a zatim blokirane 10% nemasnim mlekom (Roth, Nemačka). Membrane su preko noći inkubirane na +4°C sa primarnim zečjim antitelima na LC3-II (Cell Signaling Technology, SAD) i β-aktin (Abcam, Velika Britanija). Nakon ispiranja, membrane su inkubirane sa peroksidazom rena (engl. horseradish peroxidase, HRP) obeleženim kozjim antizečjim antitelom imunoglobulina G (IgG) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, SAD). Kao supstrat za peroksidazu rena korišćen je reagens Amersham ECL (GE Healthcare, SAD), dok je za otkrivanje hemiluminiscencije korišćen ChemiDoc MP System (Bio-Rad, SAD).

Određivanje nivoa ekspresije autofagnih gena

Da bi se iz ćelija izolovala ribonukleinska kiselina (RNK), ćelije su lizirane izolatorom RNK (Invitrogen, SAD). Nakon inkubacija i centrifugiranja, sprovedenih po uputstvu proizvođača, na dnu epruveta se formirao talog RNK. Supernatant je odlivan, a talog RNK je rastvaran u destilovanoj vodi sa nasumičnim prajmerima i dNTP (Fermentas, Litvanija). U uzorke je nakon toga dodavano po 4

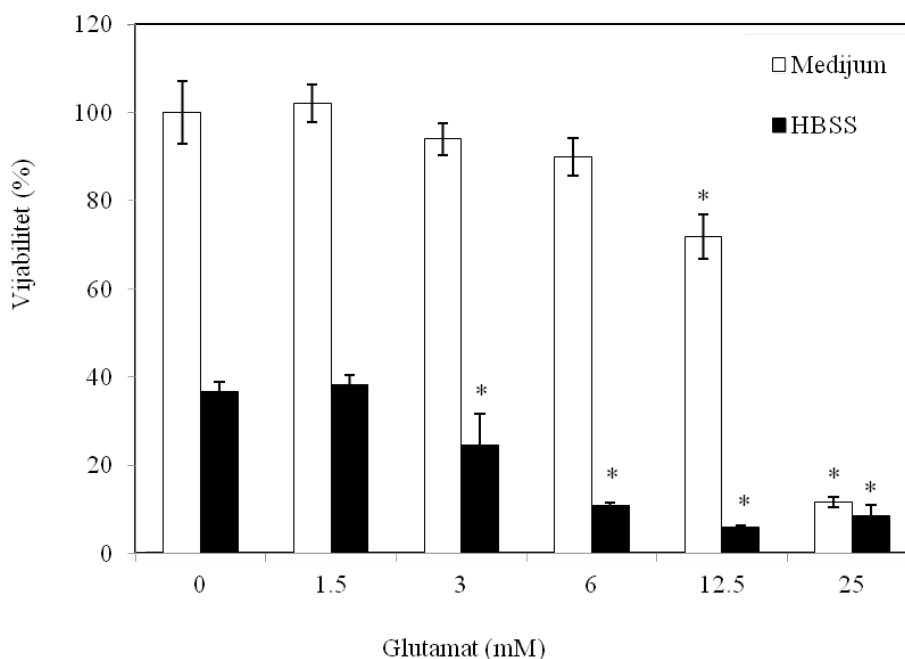
μl pufera za reverznu transkripciju i 1 μl MuLV reverzne transkriptaze, a zatim su uzorci inkubirani u odgovarajućim uslovima pod kojima se odigravala reakcija reverzne transkripcije. Na ovaj način je dobijana komplementarna DNK, koja je korišćena u reakciji lančanog umnožavanja. Kvantitativni PCR je izveden u Realplex Mastercycle aparatu (Eppendorf, Nemačka), korišćenjem ploča sa 96 bunara, TaqMan Universal PCR Master Mix i TaqManprobe za humani ATG10 (Hs00919718_m1), ATG14 (Hs00208732_m1), ATG3 (Hs00223937_m1), ATG7 (Hs00197348_m1), ATG13 (Hs00207186_m1), ATG4 (Hs00367088_m1), ULK1 (Hs00177504_m1), ATG12 (Hs00740818_m1), BECN1 (Hs00186838_m1), FIP200 (Hs01089002_m1), p62 (Hs00177654_m1) i Rn18s (Hs) (svi reagensi od Thermo Fisher Scientific, SAD). Sve reakcije su rađene u triplikatu. Prag analize ciklusa (Ct, cycle of threshold) bio je podešen na 0,1 relativnih fluorescentnih jedinica. Prosečne Ct vrednosti kontrolnih triplikata (Rn18s, kao housekeeping gena) oduzete su od prosečnih Ct vrednosti triplikata gena od interesa i na taj način je dobijen ΔCt, dok je relativna ekspresija gena izražena kao 2-ΔCt. Rezultati su prikazani kao relativni u odnosu na kontrolu, koja je arbitrarno podešena na 1.

Statistička analiza

Za poređenje rezultata korišćen je "Studentov" t-test za dva mala nezavisna uzorka. Kao kriterijum značajnosti uzetaje vrednost $p < 0,05$. Za analizu je korišćen program GraphPad Prism (probna verzija).

Rezultati

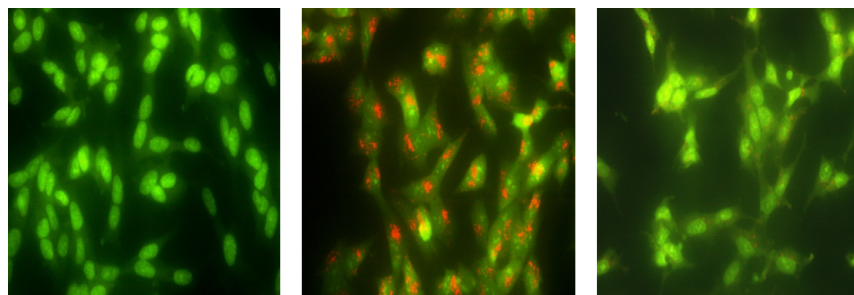
U cilju ispitivanja ekscitotoksičnosti glutamata urađena je analiza ćelijskog vijabiliteta, koji je određen MTT testom i izražen je kao procenat u odnosu na uzorak netretiranih ćelija, za koju se arbitrarno uzima da je vijabilitet ćelija 100%. Ćelije u standardnom i HBSS medijumu tretirane su dvostrukorastućim razblaženjima glutamata. Zapaženo je statistički značajno smanjenje vijabiliteta ćelija u standardnom medijumu pri koncentracijama glutamata od 12,5 i 25 mM u odnosu na netretiranu kontrolu, dok pri ostalim koncentracijama glutamata nema statistički značajne razlike u vijabilitetu ćelija. Glutamat u HBSS medijumu dovodi do statistički značajne razlike u vijabilitetu SH-SY5Y neurona, osim pri koncentraciji od 1,5 mM. Dakle, ekscitotoksičnost glutamata je jače izražena u uslovima energetske deprivacije (**grafikon 1**).



Grafikon 1. Vijabilitet SH-SY5Y neuronske ćelijske linije nakon tretmana dvostrukorastućim koncentracijama glutamata u standardnom i HBSS medijumu, utvrđen MTT testom. Rezultati su prikazani kao procenat MTT apsorbance u odnosu na apsorbancu dobijenu u kulturi netretiranih ćelija za koju se arbitrarno uzima da je vijabilitet ćelija 100%. Sve vrednosti su prikazane kao $X \pm SD$ dobijene iz tri nezavisna merenja (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelijske kulture u odgovarajućem medijumu bez glutamata).

Dalji tok našeg istraživanja obuhvatao je analizu prisustva autofagije u ćelijama humanog neuroblastoma. Kvalitativna analiza ćelija obojenih pHsenzitivnom bojom akridin oranž izvršena je posmatranjem pod fluorescentnim mikroskopom. U HBSS medijumu je uočen veći broj

narandžastocrvenih vakuolau poređenju sa kontrolom, što bi odgovaralo autofagolizozomima. Dodavanjem glutamata u HBSS medijum broj narandžastocrvenih vezikula se smanjuje (**slika 1**).



Slika 1A

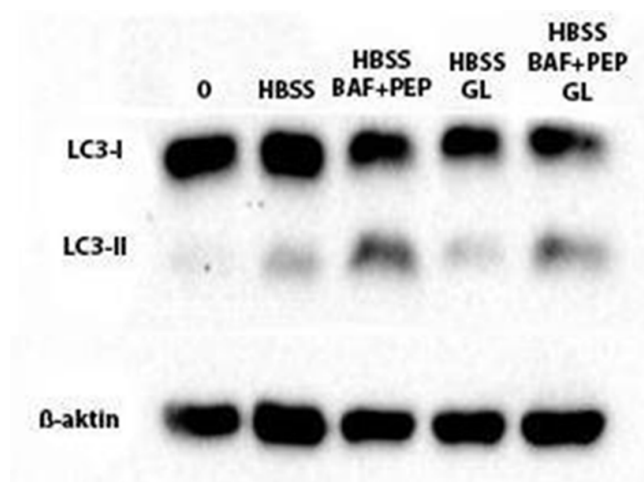
Slika 1B

Slika 1C

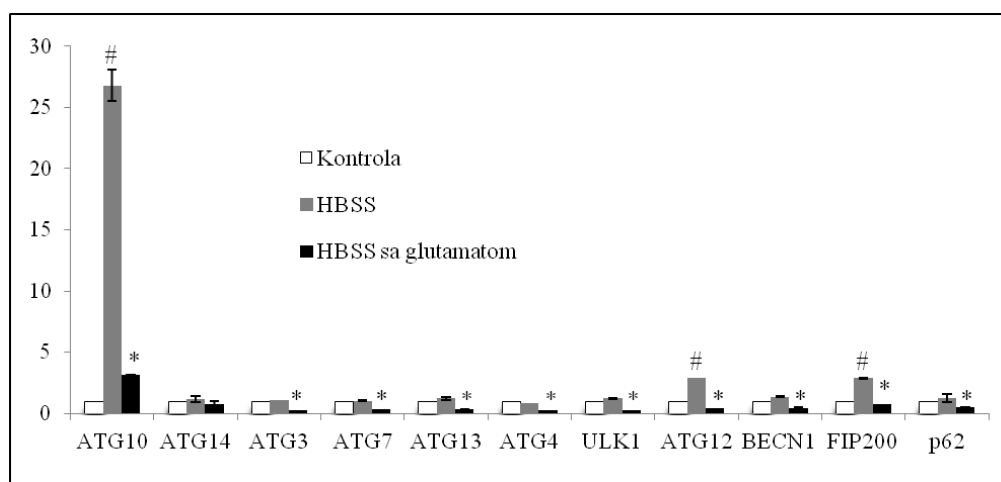
Slika 1. Fluorescentna mikroskopija kontrolnih ćelija (slika 1A), ćelija u HBSS medijumu (slika 1B) i ćelija u HBSS medijumu sa glutamatom (slika 1C) nakon tretmana akridin oranžom (uveličanje 40x).

Rezultati imunoblota prikazuju pojačanu konverziju LC3-I proteina u LC3-II formu, koja je marker autofagozoma, u HBSS medijumu u odnosu na kontrolu, dok se kombinovanjem HBSS medijuma sa glutamatom akumulacija LC3-II proteina smanjuje. Analiza autofagnog fluksa merenjem LC3-II, uz istovremenu blokadu njegove razgradnje inhibitorima lizozomalne proteolize, pokazuje da je došlo do dodatne akumulacije LC3-II, odnosno povećanja autofagnog fluksa u HBSS medijumu u poređenju sa kontrolom, dok je u HBSS medijumu sa glutamatom autofagni fluks smanjen u odnosu na HBSSmedijum (**slika 2**).

Analizom rezultata kvantitativnog RT-PCR-a uočeno je statistički značajno povećanje ekspresije gena za ATG10, ATG12 i FIP200 u HBSS medijumu u odnosu na kontrolu, dok razlika u ekspresiji ostalih autofagnih gena nije bila statistički značajna. Takođe je zapaženo statistički značajno smanjenje ekspresije svih autofagnih gena, osim ATG14, u HBSS medijumu sa glutamatom u odnosu na HBSS mediju (**grafikon 2**).



Slika 2. Dejstvo glutamata na LC3-I/LC3-II konverziju u HBSS medijumu u prisustvu ili odsustvu lizozomalnih inhibitora bafilomicina (BAF) i pepstatina (PEP).



Grafikon 2. Ekspresija autofagnih gena određena kvantitativnim RT-PCR-om u kontrolnoj kulturi ćelija, HBSS medijumu i u HBSS medijumu sa glutamatom. Rezultati su prikazani kao relativni u odnosu na kontrolu, koja je arbitrarno podešena na 1. Sve vrednosti su prikazane kao $X \pm SD$, dobijene iz tri nezavisna merenja (# $p < 0,05$ označava statističku značajnost razlike u ekspresiji gena u HBSS medijumu u odnosu na kontrolu; * $p < 0,05$ označava statističku značajnost razlike u ekspresiji gena u HBSS medijumu sa glutamatom u odnosu na HBSS medijum).

Diskusija

Prikazani rezultati pokazuju da, kada se deprivacija nutrijenata kombinuje sa glutamatom, što se dešava u cerebralnoj ishemiji, dolazi do pojačanog umiranja ćelija, najverovatnije zbog inhibicije citoprotektivne autofagije glutamatom.

Analiza rezultata fluorescentne mikroskopije pokazala je veći broj kiselih vezikula, što bi odgovaralo autofagolizozomima, u HBSS medijumu u poređenju sa kontrolom, što govori da je u ovom medijumu, usled nedostatka hranljivih materija, došlo do indukcije autofagije u SH-SY5Y neuronima. Manji broj narandžastocrvenih vakuola u HBSSmedijumu sa glutamatom u odnosu na HBSS medijum pokazuje da je pod dejstvom glutamata došlo do smanjenja autofagije. Inhibiciju autofagije glutamatom potvrđuju i rezultati imunoblota. Rezultati pokazuju nagomilavanje LC3-II proteina u HBSS medijumu u poređenju sa kontrolom, što je posledica povećanja autofagije zbog deprivacije nutrijenata u HBSS medijumu. Nagomilavanje LC3-II proteina u HBSS medijumu sa glutamatom bilo je smanjeno u odnosu na HBSS medijum, što je u skladu sa inhibicijom autofagije. Do povećanja markera autofagije, kao što je LC3-II, može, međutim, doći i u slučaju blokiranja proteolitичke razgradnje sadržaja autofagozoma, odnosno smanjenja autofagnog fluksa, jer LC3-II ne samo da nastaje nego se i degradira tokom autofagije (14). Kada se njegova degradacija blokira lizozomalnim inhibitorima, bafilomicinom i pepstatinom, dolazi do većeg nagomilavanja LC3-II u poređenju sa HBSS medijumom bez inhibitora. Dodatkom glutamata u HBSS medijum sa lizozomalnim inhibitorima dolazi do smanjenja akumulacije LC3-II proteina, što dodatno potvrđuje da glutamat inhibira indukciju autofagije. Zanimljiv primer pogrešne interpretacije merenja LC3-II dolazi iz studija hroničnih neurodegenerativnih bolesti. Morfološke studije su pokazale povećan broj autofagozoma u zahvaćenim neuronima u Alchajmerovoj demenciji, na osnovu čega je donet zaključak da povećanje autofagije može da bude uključeno u razvoj bolesti. Nedavne studije su, međutim, demonstrirale da povećanje broja autofagozoma nije posledica intenzivnije autofagije nego, naprotiv, smanjenja njene kasne faze, tj. lizozomske degradacije. U skladu s tim, dokazano je da obnova funkcije lizozoma u životinjskim modelima Alchajmerove demencije dovodi do obnove neuronske funkcije i poboljšanja kognitivnih funkcija (9). Dakle, modulacija autofagije u određenoj situaciji treba da bude posmatrana ne samo statičnom analizom autofagnih markera nego dinamičkim praćenjem celokupnog procesa autofagije, odnosno autofagnog fluksa.

Zapaženo smanjenje ekspresije autofagnih gena u HBSS medijumu sa glutamatom u odnosu na sam HBSS medijum ukazuje na mogućnost da glutamat deluje na transkripciju autofagnih gena. Na značaj ovog mehanizma posebno ukazuje smanjena ekspresija p62 proteina, koja je najverovatnije posledica inhibicije transkripcije p62 gena. Naime, u slučaju inhibicije autofagije nivo p62 bi trebalo da se poveća zbog smanjenja njegove autofagne degradacije, ali istovremena blokada njegove transkripcije ipak dovodi do smanjenja nivoa p62 proteina. U skladu sa našim rezultatima, nedavne studije ukazuju na mogući inhibitorni uticaj glutamata na transkripciju gena za p62 (14).

Rezultati našeg istraživanja ukazuju da glutamat modulira autofagiju najverovatnije smanjujući transkripciju autofagnih gena. Poznato je, međutim, da se većina proteina uključenih u biogenezu autofagozoma, osim LC3-II na unutrašnjoj membrani, uklanja pre nego što se završi kompletno formiranje autofagozoma i da se ovi proteini verovatno recikliraju za ponovnu upotrebu (9). Stoga je ovo moguće objašnjenje zašto sinteza novih proteina nije esencijalna za indukciju autofagije i formiranje autofagozoma, kao i zašto pod dejstvom glutamata ne dolazi do potpune inhibicije autofagije nego samo do njenog smanjenja, što pokazuju i rezultati imunoblot analize i fluorescentna mikroskopija. Ekscitotoksičnost i intracelularni signalni putevi indukovani hipoksijom/reoksigencijom smatraju se glavnim uzrocima neuronske smrti tokom/nakon cerebralne ishemije (17). Da li je inhibicija autofagije glutamatom glavni uzrok neuronske smrti in vivo ne može se, međutim, zaključiti iz ovog istraživanja. Primenjeni in vitro eksperimentalni model nije obuhvatio sve parametre ishemije, kao na primer nedostatak kiseonika, nego samo jedan njihov deo, u konkretnom slučaju deprivaciju nutrijenata. Osim toga, u živim organizmima postoje brojni kompezatorni mehanizmi koji se aktiviraju u stanjima cerebralne ishemije, a koji nisu uzeti u obzir tokom ovog istraživanja. Uloga inhibicije autofagije u regulaciji ćelijske smrti u našem eksperimentalnom sistemu takođe nije direktno ispitivana. Ostaje da se uloga inhibicije autofagije u ekscitotoksičnosti glutamata tokom ishemijskog oštećenja neurona potvrdi u odgovarajućem in vivo sistemu.

Istraživanje je potvrdilo da glutamat tokom energetske deprivacije u in vitro uslovima dovodi do smanjenja autofagije u neuronima, najverovatnije sprečavajući indukciju autofagije smanjenjem transkripcije autofagnih gena, što bi moglo da ima ulogu u regulaciji glutamatske ekscitotoksičnosti.

Literatura

1. Mizushima N. Autophagy in protein and organelle turnover. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 2011; 76:397-402.
2. Mizushima N, Klionsky DJ. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annual review of nutrition* 2007; 27:19-40.
3. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology* 2007; 9:1102-9.
4. Tsukamoto S, Kuma A, Murakami M, Kishi C, Yamamoto A, Mizushima N. Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* 2008; 321:117-20.
5. Mari G, NisoSantano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014; 15:81-94.
6. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2011; 27:107-32.
7. Kung CP, Budina A, Balaburski G, Bergenstock MK, Murphy M. Autophagy in tumor suppression and cancer therapy. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 2011; 21:71-100.
8. Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, et al. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology* 2008; 182:685-701.
9. Puyal J, Ginet V, Clarke PGH. Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage. A challenge for neuroprotection. *Progress in Neurobiology* 2013; 105:24-48.
10. Wirawa E, Vanden Berghe T, Lippens S, Agostinis P, Vandenabeele P. Autophagy: for better or for worse. *Cell Research* 2012; 22:43-61.
11. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2011; 27:107-32.
12. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 2007; 131:1149-63.
13. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 2011; 7:279-96.
14. Kulbea JR, Mulcahy Levya JM, Coultrap SJ, Thorburn A, Ulrich Bayer K. Excitotoxic glutamate insults block autophagic flux in hippocampal neurons. *Brain Research* 2014; 1542:12-9.
15. Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 2006; 443:780-6.
16. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO Journal* 2007; 26:1749-60.
17. Ginet V, Spiehlmann A, Rummel C, Rudinskiy N, Grishchuk Y, Luthi-Carter R, et al. Involvement of autophagy in hypoxic-excitotoxic neuronal death. *Autophagy. Landes Bioscience* 2014; 10:846-60.