

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Buněčná obrana proti virům – autofagie a HSV-1

Martina Kojzarová

Školitel: RNDr. Alena Morávková Ph.D.

2008/2009

Obsah:

Seznam použitých zkratk.....	2
Abstrakt.....	4
1. Úvod.....	5
2. Autofagie.....	6
2.1. Typy autofagie.....	6
2.1.1. Mikroautofagie.....	6
2.1.2. Makroautofagie.....	6
2.1.3. Chaperonem-zprostředkovaná autofagie.....	7
2.2. Membránové struktury účastníků se autofagie.....	7
2.3. Geny vázané na autofagii a jejich produkty.....	8
2.4. Molekulární mechanismus autofagie.....	10
2.4.1. Aktivace.....	10
2.4.2. Formace autofagozómu.....	10
2.4.3. Zacílení a fúze s lysozómem.....	13
2.4.4. Rozklad.....	14
2.4.5. Regulace autofagie.....	15
2.4.5.1. mTOR.....	15
2.4.5.2. eIF2 α kinázy.....	16
2.4.5.2.1. PKR.....	17
2.4.5.3. Beclin 1/PI3K třídy III.....	19
2.4.5.4. G proteiny.....	21
3. Autofagie a HSV-1.....	22
3.1. Herpes simplex virus typu I (HSV-1).....	22
3.2. ICP34.5.....	26
3.2.1. Význam jednotlivých částí ICP34.5 pro inhibici autofagie.....	27
3.2.2. Mutanty HSV-1 ICP34.5 a jejich schopnost indukovat autofagii v různých buňkách.....	28
3.2.3. Shrnutí.....	33
4. Závěr.....	33
5. Seznam použité literatury.....	35

Seznam použitých zkratk

AGS3	activator of G-protein signaling 3	aktivátor G-proteinové signalizace 3
Apg	autophagy	autofagie
APC	antigen presenting cell	buňka prezentující antigen
AVd	degradative autophagic vacuole	degradativní autofagická vakuola
AVi	initial autophagic vacuole	iniciální autofagická vakuola
ATG	autophagy-related genes	geny podílející se na procesu autofagie
Atg		produkty ATG genů
ATP		adenosintrifosfát
Aut	autophagocytosis	autofagocytóza
Bcl-2	B-cell lymphoma protein 2	protein lymfomu B-buněk 2
CMA	chaperone-mediated autophagy	chaperonem zprostředkovaná autofágie
CNS		centrální nervová soustava
DAPK	death-associated protein kinase	proteinkináza asociovaná se smrtí
DRP-1	DAPK-related protein-1	protein-1 příbuzný s DAPK
dsRBD	dsRNA binding domain	dsRNA vazebná doména
dsRBM	dsRNA binding motif	dsRNA vazebný motiv
dsRNA	double-stranded RNA	dvouřetězcová RNA
eIF2α	eukaryotic translation initiation factor 2 α	eukaryotický iniciační translační faktor 2 α
ER	endoplasmatic reticulum	endoplasmatické retikulum
FADD	Fas-associated death domain	Fas-asociovaná smrtící doména
GABA	γ -aminobutyric acid	kyselina γ -aminomáselná
GABARAP	GABA(A) receptor-associated protein	protein asociovaný s receptorem pro kyselinu γ -aminomáselnou
GADD34	growth arrest and DNA-damage-inducible protein, protein phosphatase 1 regulatory protein 1	protein indukovatelný zastavením růstu a poškozením DNA, regulační protein proteinfosfatázy 1
GAIP	G alpha interacting protein	G alfa interagující protein
GATE-16 (GABARAPL2)	GABA(A) receptor-associated protein-like 2, ganglioside expression factor 2, MAP1 light chain 3 related protein	protein podobný proteinu asociovanému s receptorem pro kyselinu γ -aminomáselnou 2, faktor exprese gangliosidů 2, protein příbuzný lehkému řetězci 3 MAP1
GDI	guanine dissociation inhibitor	inhibitor disociace guaninu
GDP		guanosindifosfát
GTP		guanosintrifosfát
HSV-1	Herpes simplex virus type I	Herpes Simplex Virus typu 1
→ wild type		divokého typu
→ HSV-1 17termA, HSV-1 Δ 34.5		mutanty s kompletně deletovaným genem pro ICP34.5
→ HSV-1 17termAR		mutanta se zachovaným genem pro ICP34.5 (R = rescued = obnovený, zachráněný)
→ HSV-1 Δ 68-87 (HSV-1 34.5 Δ 68-87)		mutanta, jejíž protein ICP34.5 postrádá aminokyseliny 68-87
→ HSV-1 Δ 68-87R (HSV-1 34.5 Δ 68-87R)		mutanta s normálním proteinem ICP34.5

→ HSV-1Δ48-67 (HSV-1 34.5Δ48-67)		mutanta, jejíž protein ICP34.5 postrádá aminokyseliny 48-67
→ HSV-1Δ88-107 (HSV-1 34.5Δ88-107)		mutanta, jejíž protein ICP34.5 postrádá aminokyseliny 88-107
→ HSV-1 34.5ΔGADD34		mutanta, jejíž protein ICP34.5 postrádá GADD34 doménu
ICP34.5 (γ34.5)	infected cell protein 34.5	virový protein, patří mezi γ neboli pozdní genové produkty
→ ICP34.5Δ68-87		protein postrádající aminokyseliny 68-87
→ ICP34.5Δ48-67		protein postrádající aminokyseliny 48-67
→ ICP34.5Δ88-107		protein postrádající aminokyseliny 88-107
→ ICP34.5ΔGADD34		protein postrádající doménu GADD34
IFN	interferon	interferon
LAMP 2a	lysosomal membrane protein 2a	lysozomální membránový protein 2a
MAP-LC3	microtubule associated protein 1 light chain 3	lehký řetězec 3 proteinu 1 asociovaného s mikrotubuly
MCF7.beclin1 cells		lidské buňky prsního karcinomu stabilně transfekované lidským Beclin 1
MEF	murine embryonic fibroblast	myší embryonální fibroblast
→ S51A		mutantní MEF obsahující nefosforylovatelné eIF2α
MHC	major histocompatibility complex	hlavní histokompatibilní komplex
	→ class I MHC	MHC I. třídy
	→ class II MHC	MHC II. třídy
PCD	programed cell death	programovaná buněčná smrt
	→ type I	typu I → apoptóza
	→ type II	typu II → autofágie
PE	phosphatidyl-ethanolamin	fosfatidylethanolamin
PERK	PKR-endoplasmatic reticulum-related kinase	PKR-endoplazmatické retikulum příbuzná kináza
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase	fosfatidylinositol 3-kináza
	→ class I PI3K	fosfatidylinositol 3-kináza třídy I
	→ class III PI3K	fosfatidylinositol 3-kináza třídy III
PKB (Akt)	protein kinase B	proteinkináza B
PKR	double-stranded RNA-dependent protein kinase R	proteinkináza R závislá na dvojřetězcové RNA
PP1α	protein phosphatase 1α	proteinfosfatáza 1α
PTEN	phosphatase and tensin homologue	fosfatáza a napěťový homolog
TNF	tumor necrosis factor	faktor nekrotizující nádory
TOR	target of rapamycin	proteinkináza, která je cílem inhibitoru rapamycinu
→ mTOR	mammalian TOR	savčí TOR
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand	ligand spřízněný s TNF vyvolávající apoptózu
UVRAG	UV irradiation resistance-associated gene	gen sdružený s resistencí k UV záření
Vps	vacuolar protein sorting factor, vacuolar protein-sorting	faktor podílející se na třídění proteinů ve vakuole, třídění proteinů ve vakuole

Abstrakt

Autofagie je fyziologický buněčný proces, který udržuje buněčnou homeostázu a podílí se na degradaci dlouho-žijících proteinů a dokonce celých organel. Její význam je zásadní především v období různých stresů jako jsou například hladovění nebo infekce. Nedávné studie dokazují, že autofagie se podílí na obraně buněk proti intracelulárním parazitům, kterými jsou i viry. Avšak některé viry vyvinuly strategie jak obejít autofagii a vyhnout se tak degradaci. Mezi tyto viry patří i herpes simplex typu I, který kóduje protein ICP34.5. Tento protein je schopen zablokovat funkci autofagie. ICP34.5 inhibuje eIF2 α signální dráhu nutnou pro indukci autofagie a pro zastavení hostitelské translace. Tato práce je zaměřena na autofagii, její mechanismus, regulaci a způsob jakým jí mění HSV-1 a jeho neurovirulentní produkt.

Abstract

Autophagy is a physiological cellular mechanism that maintains homeostasis and participates in degradation of long-lived proteins and even intact organelles. Its importance is essential especially in term of different stresses like starvation or infection. Recent studies indicate, that autophagy is involved in cellular defense mechanism against intracellular pathogens, including viruses. However, several viruses evolved strategies to evade autophagy and avoid degradation. Among these viruses is ranked herpes simplex virus type I via its protein product ICP34.5. This protein is capable of block autophagy function. ICP34.5 inhibits eIF2 α signaling pathway required for induction of autophagy and host translational shutoff. This work is intent on autophagy, ist mechanism, regulation and manner in which it is changed by HSV-1 and its neurovirulence product.

Klíčová slova: Autofagie, Atg, eIF2 α , HSV-1, ICP34.5

Keywords: Autophagy, Atg, eIF2 α , HSV-1, ICP34.5

1. Úvod

Autofagie je buněčný proces, který spolu s ubiquitin/proteasomovou dráhou tvoří dvě hlavní cesty podílející se na degradaci makromolekul v eukaryotních buňkách. Zatímco dráha ubiquitin/proteasom zajišťuje konstitutivní degradaci krátce žijících proteinů a udržuje neustálý obrat proteinů v buňce, autofagie je nezbytná pro lysozomální degradaci a recyklaci dlouho žijících proteinů a dokonce celých organel. Tím za normálních růstových podmínek udržuje v buňce homeostázu, která vyžaduje vysoce regulovanou rovnováhu mezi syntézou proteinů a proteolýzou. Při porušení této rovnováhy dochází k mnohým patologiím včetně rakoviny, neurodegenerace a myopathie (Shintani a Klionsky, 2004). Kromě klasické homeostatické funkce spočívá důležitost autofagie také v účasti v mnohých dalších biologických procesech jako je vývoj, diferenciaci a remodelace tkání (Levine a Klionsky, 2004).

Autofagie může být aktivována jako odpověď na nejrůznější stimuly a podněty, jakými jsou například stres, hladovění, specifické hormony a další. V savčích buňkách představuje autofagie především mechanismus důležitý pro přežití v období krátkodobého hladovění. Degradací některých neesenciálních komponent získává buňka živiny pro vitální biosyntetické reakce. Navzdory roli v buněčném přežití, může být autofagie také považována za dráhu buněčné smrti (type II programmed cell death, PCD). Buněčná smrt autofagií může být od apoptózy (type I PCD) odlišena pomocí morfologických kritérií, tj. přítomností autofagozómů v umírající buňce. Buňka umírá, pokud aktivace autofagie překročí přirozenou prahovou úroveň, což způsobí buněčnou atrofii, která vyústí v kolaps buněčných funkcí (Galluzi et al., 2008). Buněčná smrt s autofagickými rysy může nastat, když v buňce chybí důležité součásti apoptotické mašinerie. To naznačuje, že autofagie může kompenzovat defektní apoptózu (Burch et al., 1996).

V poslední době se o autofagii stále častěji hovoří jako o obranném mechanismu vrozené imunity proti intracelulárním patogenům, jako jsou některé bakterie a viry, které jsou zlikvidovány degradací v autolysozómech (vysvětlení pojmů viz kapitola 2.2.) (Deretic, 2006; Levine, 2005). Účast autofagie na antigenní prezentaci pomocí MHC třídy II (major histocompatibility complex group II) rozšiřuje její pole působnosti i na adaptivní imunitu. Výzkumy naznačují, že autofagie se účastní doručení cytozolických a jaderných antigenů do MHC II dráhy v antigen prezentujících buňkách (APC = Antigen Presenting Cell) jako jsou makrofágy (Brazil et al., 1997), B-buňky (Paludan et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2003) a dendritické buňky (Dörfel et al., 2005). Antigeny jsou zpracovány v lysozómech a endozómech antigen prezentujících buněk už před připojením k MHC II molekulám.

Skutečnost, že autofagie je významným imunitním procesem, je ještě podpořena faktem, že různé proteiny účastníci se interferonových (IFN) signálních drah jsou spojeny s regulací autofagie. Je to nejenom samotný IFN γ , ale i další proteiny jako například protein kináza R závislá na dvojřetězcové RNA (PKR) (viz kapitola 2.4.5.2.1.), protein kináza asociovaná se smrtí (DAPK) (Inbal et al., 2002), s DAPK příbuzný protein-1 (DRP-1) (Inbal et al., 2002), s TNF (faktor nekrotizující nádory) spřízněný apoptózu vyvolávající ligand (TRAIL) (Mills et al., 2004) nebo Fas-asociovaná smrtící doména (FADD) (Pyo et al., 2005).

Ve své práci jsem se zaměřila autofagii, její roli v obraně buněk proti viru Herpes simplex typu I a na způsob, jakým se tento virus jejím výpadům brání.

2. Autofagie

2.1. Typy autofagie

Autofagie byla pozorována u všech eukaryot od rostlin, přes kvasinky, po živočichy. Ve své podstatě může být rozdělena na tři základní typy: makroautofagie (nebo jednoduše autofagie), mikroautofagie a chaperonem zprostředkovaná autofagie. Jednotlivé typy se dělí podle dráhy, kterou je cytoplazmatický materiál dodán do lumen lysozomu. Pouze chaperonem zprostředkovaná autofagie není procesem evolučně konzervovaným u všech organismů a vyskytuje se pouze u vyšších eukaryot.

2.1.1. Makroautofagie

Makroautofagie je hlavním způsobem degradace cytoplazmatických složek. Právě makroautofagie bývá většinou označována obecným výrazem autofagie. Je zprostředkována formací autofagozomu a jeho následnou fúzí s endozómem nebo lysozómem. Autofagozóm je charakteristický váček se dvěma membránami, který po maturaci fúzuje s lysozómem. Lysozomální hydrolázy degradují získaný cytoplazmatický materiál a ten může být recyklován. V textu se dále budeme zabývat pouze makroautofagií (dále jen autofagie).

2.1.2. Mikroautofagie

Mikroautofagie je charakteristická tím, že cytoplazmatické komponenty (především solubilní cytoplazmatické proteiny) jsou přijímány pučením vnější lysozomální membrány do lysozomu. Přesný molekulární mechanismus není prozatím přesně znám, ale podobá se pučení fagozómů nebo pinozómů z plazmatické membrány (Ahlberg et al., 1982).

2.1.3. Chaperonem zprostředkovaná autofagie

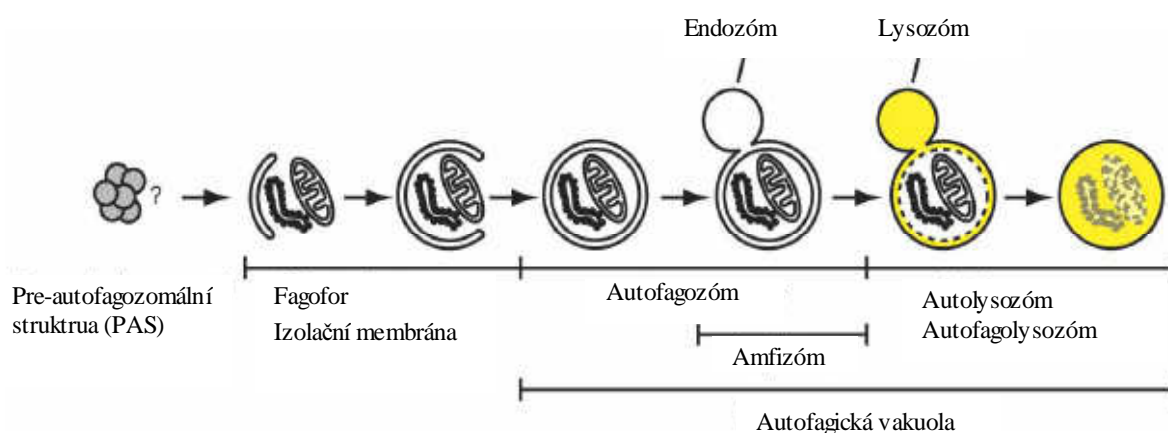
Chaperonem zprostředkovaná autofagie neboli CMA (Chaperon-Mediated Autophagy) je evolučně konzervována pouze u vyšších eukaryot. Prvním identifikovaným substrátem CMA byla Ribonukleáza A obsahující specifický motiv KFERQ, který je nezbytný pro vazbu na chaperon. Chaperonový protein Hsc70 tento motiv rozpozná a poté interaguje s lysozomálním membránovým proteinem 2a (LAMP2a), který funguje jako peptidový transportér. Protein je pomocí tohoto transportéru translokován do lumen lysozomu a tam je následně postupně degradován (Cuervo a Dice, 1996). Všechny dosud známé substráty CMA obsahují KFERQ-podobný motiv, který je rozpoznáván Hsc70 (Massey et al., 2006).

2.2. Membránové struktury účastnící se autofagie

K autofágii dochází po indukčním signálu tak, že se plochá membránová cisterna obalí okolo části cytoplazmy nebo kolem organely, čímž vytvoří uzavřenou vakuolu ohraničenou dvěma membránami (viz kapitola 2.4.). Tato vakuola, označovaná jako **autofagozóm**, obsahuje cytoplazmu – tj. cytosol a organely, jak bylo popsáno už Arstilu et al. (1968), ale postrádá jakékoli lysozomální proteiny. Membrána neznámého původu, která vytváří autofagozóm se nazývá **fagofor** (Fengsrud et al., 2004 – převzato z Eskelinen, 2005) nebo **izolační membrána** (Mizushima et al., 2002). Zdroj izolačních membrán nebyl dodnes jednoznačně identifikován, přestože se nejdříve zdálo, že by jím mohlo být endoplazmatické retikulum či Golgiho aparát (Dunn, 1990). Tato oblast výzkumu je tedy stále otevřena. U kvasinek je pro formaci autofagozomu nezbytná takzvaná pre-autofagozomální struktura neboli **PAS**, jejíž savčí ekvivalent nebyl dosud nalezen (Suzuki et al., 2001). Autofagozomy podstupují maturační proces zahrnující fúzi s endozomálními a/nebo lysozomálními váčky (Dunn, 1994). Během maturace se segregovaná cytoplazma, stále oddělená vnitřní limitující membránou, dostává do lumen endozomu/lysozomu. Jak cytoplazma, tak i membrána okolo ní, je následně degradována lysozomálními hydrolázami a dagrační produkty jsou transportovány zpět do cytoplazmy, kde jsou opětovně metabolizovány. Autofagozomy, které zfúzovaly s endozomy, se nazývají **amfizomy** (Fengsrud et al., 2004 – převzato z Eskelinen, 2005; Berg et al., 1998). Pro autofagozóm nebo amfizóm, který fúzoval s lysozómem, byl zaveden termín **autofagolysozóm** nebo **autolysozóm**.

V morfologických studiích, kde často není možné přesně určit zda autofagická struktura fúzovala s endozómem či lysozómem je používán výraz **autofagická vakuola**, který v tom případě může označovat jak autofagozóm, tak i amfizóm nebo autolysozóm (viz obr. 1). Morfologicky můžeme autofagické vakuoly dále rozdělit na časné neboli iniciální autofagické

vakuoly (**AVi**), které obsahují morfologicky intaktní cytozol nebo organely, a pozdní neboli degradativní autofagické vakuoly (**AVd**), jejichž obsah je již částečně degradován (Dunn, 1990; Dunn, 1994). Jako AVi mohou být označeny právě vzniklé autofagozomy nebo autofagozomy, které právě fúzovaly s endozómem, ale ve kterých ještě nezapočala degradace. AVd mohou být amfizómy nebo autolysozomy. Morfologická klasifikace na AVi a AVd dobře koreluje s rozdělením lysozomálních markerů – tzn. lysozomální proteiny a enzymy jsou v AVi přítomny pouze v malých množstvích, kdežto v AVd jsou velmi početné (Dunn, 1990; Tanaka et al., 2000).



Obr. 1: Proces makroautofagie v savčích buňkách. Nejdříve je část cytoplazmy obsahující i organely uzavřena pomocí fagoforu nebo izolační membrány a následně dojde k formaci autofagozómu. Vnější membrána autofagosomu poté fúzuje s endozómem a pak s lysozómem. Vnitřní materiál je degradován. U kvasinek jsou autofagozomy generovány z PAS (pre-autofagozomální struktura), která ještě nebyla identifikována u savčích buněk. Převzato z Mizushima (2007)

2.3. Geny vázané na autofagii a jejich produkty

Zatímco morfologie autofagického procesu byla poprvé popsána ve studiích zabývajících se savčími buňkami, molekulární složky autofagie byly objasněny převážně u kvasinek, díky pokročilé genové analýze. Současné studie na různých eukaryotických organizmech odhalily konzervovanost autofagického mechanismu (Mizushima et al., 2002).

V minulosti byla pro autofagické procesy a geny využívána mnohá označení: Aut (autofagocytóza), Apg (autofagie), Vps (vakuolární třídění proteinů) a další, označující specializované procesy, například: CVT (zacílení z cytoplazmy do vakuoly), GSA (glukózou vyvolaná selektivní autofagie), PAG (peroxisomová degradace via autofagii), PAZ (zeocin-

resistentní pexofagie) a PDD (deficientní v peroxizómové degradaci). V současnosti dochází ke sjednocení terminologie a specifické geny spojené s autofagií jsou označovány jako ATG (autophagy-related genes) a jejich produkty jako Atg (Klionsky et al., 2003). Objev těchto genů byl zásadní pro pochopení molekulární podstaty tohoto procesu. U kvasinek, které slouží jako modelový organizmus pro zkoumání fenoménu autofagie, bylo podle Mizushima et al. (2007) objeveno 31 Atg proteinů, zatímco Galluzi et al. (2008) hovoří dokonce už o 40 ATG genech. Ne u všech ATG genových produktů ale byl do nynější doby identifikován savčí homolog, což ponechává otevřené pole dalšímu výzkumu.

Přehled nejzásadnějších produktů ATG genů a jejich funkcí je uveden v tabulce 1.

Kvasinkový homolog	Savčí homolog	Funkce
Atg1	ULK1, ULK2	Serin/threoninová kináza, interaguje s Atg13
Atg2	Atg2a, Atg2b	interakce s Atg9, nezbytný pro trafficking Atg9
Atg3	Atg3	E2 podobný enzym pro LC3/PE
Atg4	autophaginy – Atg4A, Atg4B, Atg4C, Atg4D (např. autophagin 1 = hAtg4B)	proteolytický enzym (cysteinová proteáza)
Atg5	Atg5	součást konjugátu Atg5/Atg12-Atg16
Atg 6	Beclin 1	pozitivní regulace autofagie
Atg7	Atg7	E1 podobný enzym
Atg8	MAP-LC3 GATE-16 GABARAP	součást konjugátu Atg8/PE
Atg9	Atg9a, Atg9b	usnadňuje formaci fagoforu
Atg10	Atg10	E2 podobný enzym pro Atg5/Atg12
Atg12	Atg12	součást konjugátu Atg5/Atg12-Atg16
Atg13	dosud není znám	fosfoprotein, který je defosforylován při hladovění a interaguje s Atg1
Atg14	dosud není znám	součást komplexu kvasinkové PI3K (spolu s Vps34, Vps15, Atg6) – nezbytný pro organizaci PAS
Atg16	Atg16L	součást konjugátu Atg5/Atg12-Atg16
Vps34	PI3K třídy III	kinázová aktivita

Tabulka 1: U kvasinek bylo identifikováno 31 Atg proteinů. Přehled nejzásadnějších Atg proteinů, jejich savčích homologů a funkcí je shrnut v této tabulce.

2.4. Molekulární mechanismus autofagie

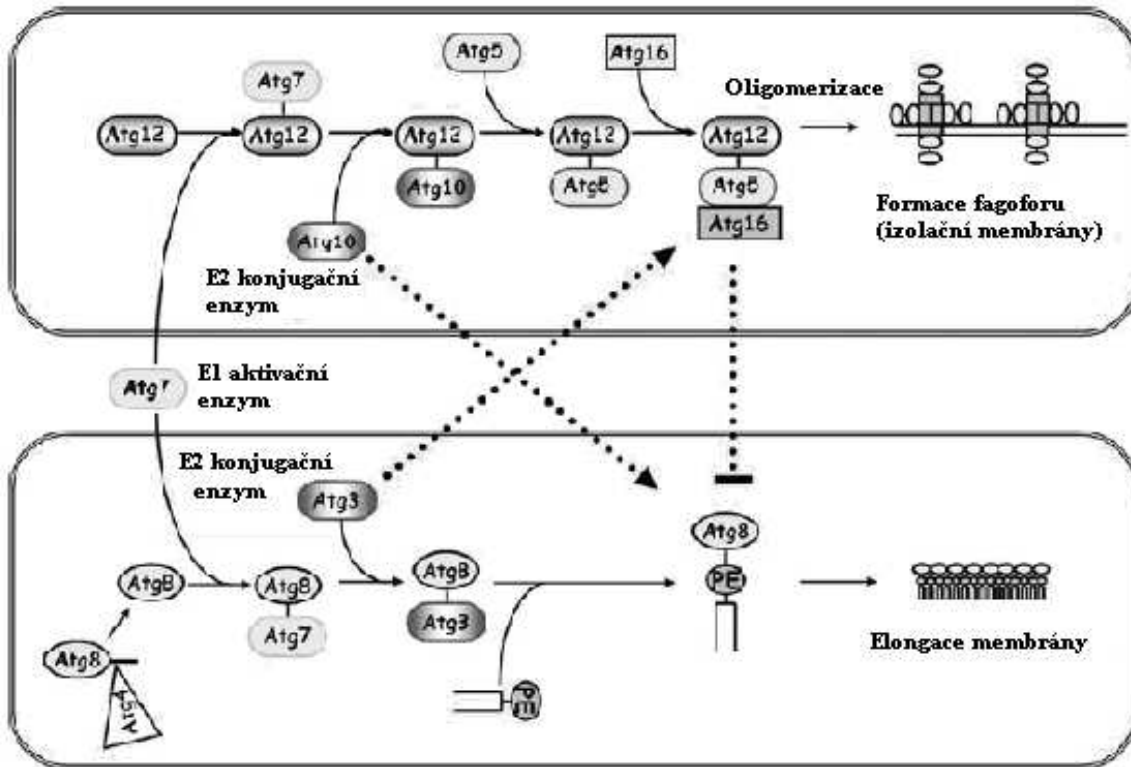
Proces autofagie může být ve své podstatě rozdělen na několik základních kroků: aktivaci, formaci autofagozómu, zacílení do lysozómu, fúze s lysozómem a rozklad (Wang a Klionsky, 2003).

2.4.1. Aktivace

K aktivaci autofagie dochází po transdukci signálu, kterým mohou být různé formy buněčného stresu (např. hladovění, infekce). Při aktivaci autofagie a v počátečních krocích formace autofagozómu hraje rozhodující roli protein Beclin 1. V savčích buňkách funguje jako součást komplexu fosfatidylinositol 3-kinázy třídy III (PI3K), který je lokalizován především na trans-Golgiho aparát (Kihara et al., 2001; Zeng et al., 2006). Do tohoto komplexu patří ještě myristilovaná kináza p150 (Maiuri et al., 2007), která slouží jako membránově kotvený adaptor vážící enzymový komplex k cytoplazmatické membráně (Kihara et al. 2001). Kvasinkový analog tohoto komplexu je představován asociací Vps34 (homolog PI3K třídy III) s autofagickými proteiny Atg6 (homolog savčího proteinu Beclin 1) a Atg14 (savčí protějšek Atg 14 ještě nebyl identifikován) (Kihara et al., 2001). Po seskupení tohoto komplexu katalyzuje PI3K třídy III fosforylaci fosfatidylinositolu na fosfatidylinositol-3-fosfát. Tento molekulární signál podporuje shromáždění proteinů Atg4, Atg7 a Atg10 (Yan et al., 2007; Nobukuni et al., 2007), což jsou enzymy nutné pro další formaci autofagozómu (viz kapitola 2.4.2.). Současná data nasvědčují tomu, že do tohoto komplexu patří další proteiny, které regulují výsledek signalizace prostřednictvím PI3K třídy III - např. Bcl-2, který může interakcí s Beclin 1 negativně regulovat aktivaci autofagie (Pattingre et al., 2005). Teprve nedávno byl jako další součást komplexu PI3K/Beclin 1 identifikován aktivátor autofagie UVRAG (UV irradiation resistance-associated gene). Tento aktivátor představuje důležitý kontrolní bod v procesu autofagie a růstu nádorových buněk (Liang et al., 2006). Více viz kapitola 2.4.5.3.

2.4.2. Formace autofagozómu

Pro formaci autofagozómu jsou nepostradatelné dva konjugační systémy (Mizushima et al., 1998). Mechanismus těchto systémů se velmi podobá konjugaci ubiquitinu k proteinům (viz obr. 2). Pro konjugaci ubiquitinu k cílovému proteinu jsou nezbytné tři enzymy: E1 aktivační enzym, E2 konjugační enzym a E3 ligáza. Období prvních dvou, Atg7 respektive Atg10 nebo Atg3, jsou využívány také při autofagii. Žádný E3 podobný enzym účastnící se autofagického procesu doposud nebyl objeven.



Obr. 2: Konjugacíni systémy účastníci se autofagie. První konjugacíni systém zprostředkovává formaci konjugátu Atg12/Atg5. Atg12 je aktivován E1 podobným enzymem Atg7 a poté je přenesen k E2 podobnému Atg10. Nakonec je Atg12 kovalentně připojen k Atg5. Konjugát Atg12/Atg5 nekovalentně interaguje s Atg16 (v savcích buňkách Atg16L) a tím se spustí homooligomerizace, která vede k vytvoření makromolekulárního komplexu nezbytného pro formaci autofagozomu. Tato makromolekulární struktura je asociovaná s vnější stranou vznikajícího autofagozomu a disociuje před jeho dokončením. Druhý konjugacíni systém má za následek formaci konjugátu Atg8/PE. Atg8 (MAP-LC3 u savců) je nejdříve proteolyzován Atg4, aktivován E1 podobným enzymem Atg7 s následně přenesen k E2 podobnému enzymu Atg3. Nakonec je Atg8 kovalentně připojen k PE. Tento konjugát je přítomen na obou stranách autofagozomu a je zásadní pro jeho dokončení. Oba konjugacíni systémy jsou propojeny. Komplex Atg12/Atg5-Atg16 je přítom nezbytný pro formaci Atg8/PE. Nadměrná exprese Atg10 usnadňuje maturaci MAP-LC3, zatímco nadměrné množství konjugátu Atg12/Atg5 ji inhibuje. Nadměrná exprese Atg3 zase usnadňuje konjugaci Atg12 a Atg5. Převzato z Espert (2005)

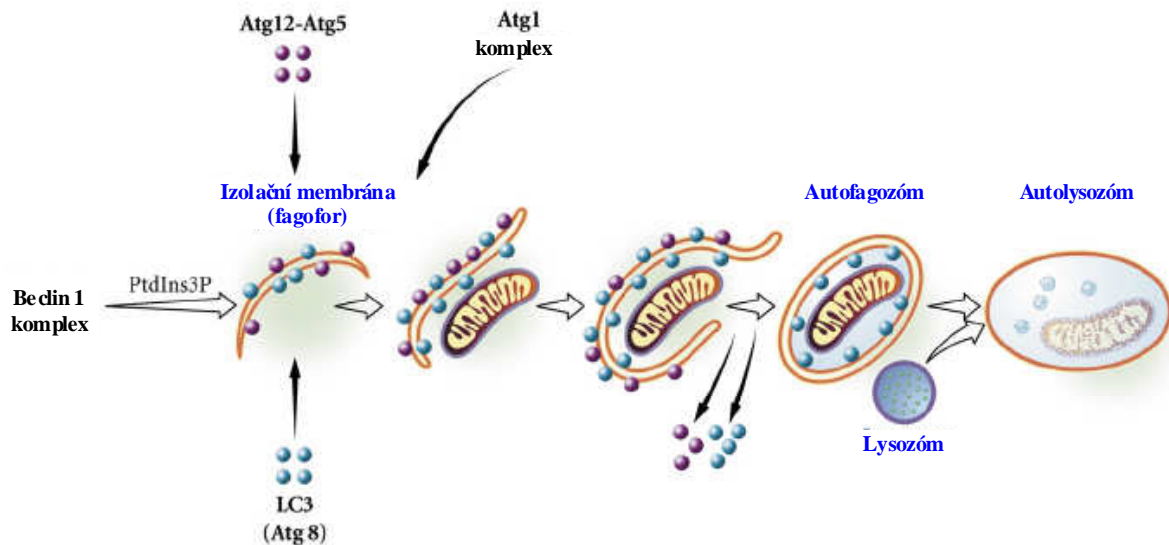
První konjugacíni systém zprostředkovává formaci konjugátu Atg12/Atg5. Atg12 je za spotřeby ATP aktivován E1 podobným enzymem Atg7 a následně je Atg12 předán E2 podobnému Atg10. Nakonec je C-terminální glycin Atg12 kovalentně připojen k aminoskupině specifického lysinu na Atg5 (u kvasinek Lys-149) (Mizushima et al., 1998). Poté konjugát Atg12/Atg5 nekovalentně interaguje s malým coiled-coil proteinem Atg16L (kvasinkový Atg16), což umožňuje homooligomerizaci a vytvoření makromolekulárního

komplexu o velikosti asi 800 kDa (u kvasinek 350 kDa), který je nezbytný pro formaci autofagozómu (Mizushima et al., 1999). Tato struktura je asociovaná s vnější stranou vznikajícího autofagozómu a disociuje od membrány ještě předtím, než je autofagozómu zcela dokončen.

Druhý konjugační systém je jedinečný pro autofagii. Je představován konjugací proteinu MAP-LC3 (lehký řetězec 3 proteinu asociovaného s mikrotubuly, dále jen LC3) a lipidu fosfatidyl-ethanolaminu (dále PE). LC3 je jedním homologů kvasinkového Atg8 a stejně jako tento protein existuje ve dvou formách. LC3-I je solubilní cytoplazmatický protein, který musí být nejprve proteolyticky rozštěpen pomocí Atg4. Tím je odhalen C-terminální glycin a LC3 může vstoupit do konjugačního systému. Po maturaci pomocí Atg4 je LC3 aktivován E1 podobným enzymem Atg7 a předán E2 podobnému Atg3. Nakonec je LC3 kovalentně připojen k PE – tato forma se označuje jako LC3-II (Tanida et al., 2004). Konjugát LC3/PE je přítomen na vnější straně vnější a vnitřní straně vnitřní autofagozomální membrány (toto rozložení je podmíněno mechanismem vzniku autofagozómu – viz obr. 3) a zdá se být stěžejním pro jeho dokončení. Po dokončení autofagozómu je nejprve LC3 přítomný na cytoplazmatické (tedy vnější) straně odštěpen pomocí Atg4 a recyklován. Existují čtyři savčí homology Atg4, kterým se souborně říká autophaginy, ale pouze autophagin 1 (hAtg4B) štěpí specificky Atg8 a jeho savčí homology (Marino et al., 2003, Hemelaar et al., 2003). LC3 na vnitřní straně izolační membrány je degradován až po fúzi autofagozómu s lysozómem lysozomálními enzymy. V savčích buňkách existuje kromě LC3 ještě několik homologů Atg8 a to: GATE-16 a GABARAP (Kabeya et al., 2004). Z těchto proteinů je nejlépe charakterizovaný právě LC3. Představuje velmi výhodný marker pro identifikaci autofagozómu (Mizushima, 2004; Klionsky, 2005), protože LC3 na vnitřní straně autofagické membrány je detekovatelný pomocí imunofluorescence nebo kvantitativního imunologického značení zlatými partikulemi. U HeLa buněk, kde bylo LC3 označeno zlatými partikulemi, se ukázalo, že 59% časných a 29% pozdních autofagických vakuol je pozitivních na přítomnost tohoto proteinu. Hustota značení byla 9,42 zlatých částic/ μm^2 v časných a 4,42 zlatých částic/ μm^2 v pozdních autofagických vakuolách (Jäger et al., 2004).

Ukázalo se, že oba výše popsané konjugační systémy jsou propojeny. Komplex Atg5/Atg12-Atg16 je nezbytný pro formaci druhého konjugátu (Atg8/PE) (Mizushima et al., 2002). Nadměrná exprese Atg10 usnadňuje maturaci LC3 a nadměrná exprese Atg3 konjugaci Atg12 s Atg5. Nadměrné množství konjugátu Atg12/Atg5 naopak inhibuje maturaci LC3 (Tanida et al., 2004).

U kvasinek se formace autofagozomu účastní ještě další komplex. Tento komplex vyžaduje přítomnost proteinů Atg9 a Atg2. Atg9, jediný dosud identifikovaný transmembránový autofagický protein, je sice nutný pro formaci PAS, ale není přítomný v maturovaných autofagozomech (Noda et al., 2000). Ukázalo se, že savčí ortholog Atg9 (mAtg9) se pohybuje mezi Golgiho aparátem a endozómy, a proto se předpokládá, že se Golgiho komplex také účastní autofagie (Webber et al., 2007).



Obr. 3: Atg proteiny a autofagická dráha. Produkce fosfatidylinositol-3-fosfátu (PtdIns3P) komplexem Beclin 1/PI3K třídy III je prvotní událostí při formaci autofagozomu. Tento první krok je zásadní pro shromáždění dalších Atg proteinů na izolační membráně nebo fagoforu. LC3-I je kovalentně navázána k PE, čímž přechází na formu LC3-II. Po kompletaci je většina Atg proteinů, s výjimkou části LC3-II, která je vázaná na lumenální straně autofagozomální membrány, recyklována do cytozolu. Komplex Atg1 se pravděpodobně podílí na různých krocích formace autofagozomů tak, že reguluje transport Atg proteinů k a od izolační membrány. Posledním krokem v tomto procesu je fúze mezi autofagozomem a lysozómem a následná degradace odděleného materiálu včetně LC3-II. Převzato z Pattingre et al. (2008)

2.4.3. Zacílení a fúze s lysozómem

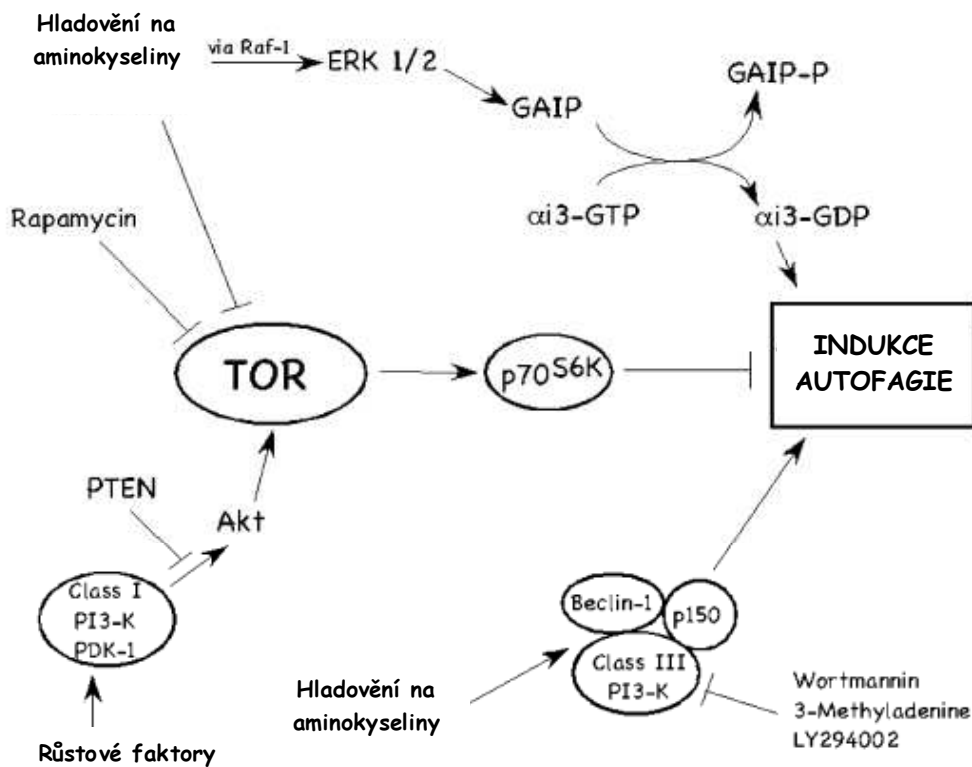
Po dokončení může autofagozóm u kvasinek fúzovat s vakuolou, nebo v případě savčích buněk s lysozómem. Způsob fúze je totožný, protože využívá stejný molekulární mechanismus. Fúzí vzniká autolysozóm (nebo autofagolysozóm). Před fúzí s lysozómem může autofagozóm také fúzovat s endozómem a vytvořit tak amfizóm, který představuje přímé spojení mezi endo-lysozomální a autofagickou cestou (Berg et al., 1998).

Membránová fúze může být rozdělena do několika kroků: přichycení, zakotvení a fúze membránových dvojvrstev. Přichycení a zakotvení jsou umožněny díky multiproteinovým komplexům a specifita je zaručena GTPázami z rodiny Rab. Zejména Rab7 GTPáza je potřebná pro konečnou maturaci pozdních autofagických vakuol a tím pro správný průběh celého procesu (Gutierrez et al., 2004, Jäger et al., 2004). Fúze je řízena shromážděním párů membránových proteinů SNARE na každé z fúzujících membrán (Klionsky, 2005). Velice důležitým krokem pro fúzi autofagozómu s lysozómem je acidifikace lumen těchto organel. Zatímco na počátku mají autofagozomy stejné pH jako okolní cytoplazma, během maturace na pozdní autofagickou vakuolu dochází k snižování pH (Dunn, 1990). K této acidifikaci dochází pomocí V-ATPáz, což bylo dokázáno pokusem s použitím inhibitoru vakuolárních H⁺ ATPáz (V-ATPázy) bafilomycinu A1 (Yamamoto et al., 1998).

2.4.4. Rozklad

Po fúzi s lysozómem je cytoplazmatický materiál, který byl autofagozómem oddělen od okolí, vypuštěn do lumen lysozómu a postupně rozštěpen hydrolázami. K tomu, aby došlo k efektivnímu rozbití vnitřní membrány autolysozómu, je vyžadováno kyselé pH lysozómu. U kvasinek se rozkladu účastní ještě lipáza Atg15, která se do vakuoly dostane pomocí multivesikulárních tělísek (Teter et al., 2001). Po degradaci materiálu jsou monomerní jednotky (například aminokyseliny) pomocí lysozomálních transportérů recyklovány zpět do cytozolu a tam znovu použity. O tomto kroku je prozatím známo jen velice málo. Relativně nedávno se například ukázalo, že kvasinkový membránový protein Atg22 umožňuje leucinu a jiným aminokyselinám, které vznikají autofagozomální degradací, odtok z vakuol (Yang et al., 2006). Jeho savčí protějšek však prozatím nebyl identifikován. Stejně tak zůstává zatím neznámý podíl autofagie na opětovném použití makromolekul jako jsou sacharidy nebo lipidy.

2.4.5. Regulace autofagie



Obr. 4: Schematické znázornění signálních drah podílejících se na regulaci autofagie. Převzato z Kelekar (2005)

2.4.5.1. mTOR

Klíčovým regulátorem kontrolujícím spouštění autofagie u savců je serin/threoninová kináza mTOR, která je cílem pro inhibitor rapamycin (Yang et al, 2005, Codogno et al, 2005). Tato kináza je citlivá vůči změnám v množství živin a energetickém metabolismu a podle podmínek moduluje autofagii. Samotná mTOR kináza působí na autofagii inhibičně. Různé proteiny pak působí pozitivně nebo negativně na mTOR a touto cestou ovlivňují autofagický proces (viz Obr. 4 a 5). Kaskáda předcházející aktivaci funkce mTOR zahrnuje především PI3K třídy I a PKB (neboli Akt). Produktem PI3K třídy I jsou fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát a fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát, které se váží k PKB (regulátor mTOR) a k jejímu aktivátoru proteinkináze 1 závislé na 3-fosfoinositidu (PKD1), které aktivují mTOR a tím inhibují autofagii (Yorimitsu a Klionsky, 2005; Codogno et al., 2005). Fosfatáza a napěťový homolog (PTEN) naopak defosforyluje fosfatidylinositolu-3,4,5-fosfátu potlačuje signalizaci PI3K třídy I a tak vyvolává autofagii (Arico et al., 2001; Feng et al., 2005). Rapamycin, specifický inhibitor mTOR, aktivuje autofagii. Naproti tomu aminokyseliny autofagii inhibují,

nicméně precizní mechanismus, kterým k této negativní regulaci dochází, zůstává otevřenou otázkou.

Indukce autofagie hladověním je lépe popsána u kvasinek než u savců. Ukázalo se, že při dostatku živin je protein Atg13 hyperfosforylován jako odpověď na aktivaci TOR kinázy. Důsledkem této fosforylace je nízká afinita Atg13 k autofagické serin/threoninové proteinkináze Atg1 (jediná serin/threoninová kináza mezi Atg) a to způsobuje represi autofagie. Naopak při nedostatku živin nebo při aplikaci inhibitoru mTOR rapamycinu je Atg13 rychle částečně defosforylováno a jeho afinita k Atg1 se zvýší. Za těchto podmínek narůstá kinázová aktivita Atg1 i autofagická aktivita, přestože cíl fosforylace pomocí Atg1 stále není znám (Yorimitsu a Klionsky, 2005). Role kinázové aktivity Atg1 tedy zůstává diskutabilní, avšak Atg1 kinázový komplex pravděpodobně hraje důležitou roli v indukci a regulaci autofagie. U savců byla jako homolog Atg1 identifikována kináza ULK (ULK1 a 2), ale homolog Atg13 nalezen nebyl (Atg13 není u savců evolučně konzervováno) (Yorimitsu a Klionsky, 2005). Atg1 protein se zřejmě účastní v lokalizaci savčího Atg9 do endozomálních membrán (Young et al., 2006). Dalším cílem mTOR kinázy podílejícím se na regulaci autofagie je kináza p70S6K (nebo také p70^{S6K}), jejímž cílem je ribozomální protein S6. Předpokládá se, že p70S6K přispívá k bazální aktivitě autofagie prostřednictvím zpětnovazebné inhibice inzulinové signální dráhy závislé na PI3K třídy I (Codogno et al., 2005; Klionsky et al., 2005). Přesnou roli p70S6K v procesu autofagie je však nezbytné ještě dále objasnit.

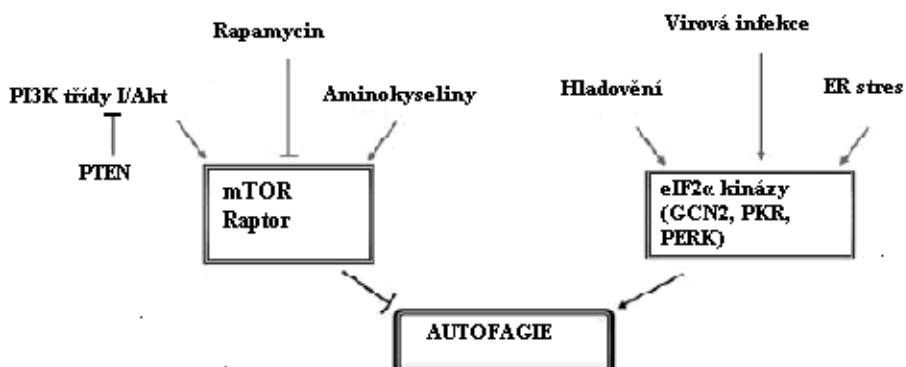
Kináza mTOR tedy může autofagii inhibovat dvěma mechanismy. Zaprvé působí v kaskádě signální transdukce a přes mnoho následujících efektorů kontroluje translaci a transkripci (Cardenas et al., 1999 – převzato z Yang et al., 2005). Zadruhé působí přímo či nepřímo na Atg proteiny, což má za následek inhibici formace autofagozómů (Levine a Klionsky, 2004).

3.4.5.2. eIF2 α kinázy

Dalšími regulátory autofagie jsou eIF2 α kinázy (viz Obr. 5). Ty patří do evolučně konzervované rodiny serin/threoninových kináz a regulují stresem vyvolané zastavení hostitelské translace. Fosforylace Ser-51 eIF2 α (eukaryotický iniciační transkripční faktor 2 α) pomocí eIF2 α kináz je centrálním mechanismem ve stresem vyvolané regulaci translace. Tallóczy et al. (2002) přišli s hypotézou, že eIF2 α kinázy, známé regulátory stresem vyvolaných translačních kontrolních programů, se podílí i na regulaci stresem vyvolané autofagie. Specifické stresové podněty zodpovědné za aktivaci hostitelského zastavení

translace závislého na eIF2 α kinázách tedy aktivují i autofagii závislou na eIF2 α kinázách. Bylo dokázáno, že kvasinková eIF2 α kináza GCN2 a eIF2 α -regulovaný transkripční transaktivátor GCN4 jsou zásadní pro autofagii vyvolanou hladověním (Talloczy et al., 2002). GCN2 je konzervován u savců a předpokládá se, že tento protein má možná podobnou roli u vyšších eukaryot. Jedna z nedávných studií (Kouroku et al., 2007) ukázala, že stres endoplazmatického retikula indukovaný rozbalenými agregáty obsahujícími polyQ72 (72 opakování polyglutaminu) vyvolává autofagii aktivací jiné eIF2 α kinázy – PERK (PKR-endoplazmatické retikulum-příbuzná kináza). Jiná studie (Ogata et al., 2006) naopak říká, že autofagie vyvolaná stresem endoplazmatického retikula na PERK překvapivě nezávisí, protože k ní dochází i v PERK deficientních buňkách.

U savců byly objeveny nejméně 4 eIF2 α kinázy – kromě GCN2 (aktivována nedostatkem aminokyselin) a PERK (aktivována stresem endoplazmatického retikula) jsou to PKR (aktivována virovou infekcí – viz kapitola 2.4.5.2.1.) a HRI (aktivována vyčerpáním hemu).



Obr. 5: Proces autofagie a jeho regulace. Zde jsou prezentovány dvě hlavní dráhy regulující spuštění autofagie. Dráha mTOR inhibuje autofagii v odpovědi na PI3K třídy I a aminokyseliny. EIF2 α kinázy jsou pozitivními regulátory autofagie odpovídající na hladovění, stres endoplazmatického retikula a virovou infekci. Převzato z Espert et al. (2007)

2.4.5.2.1. PKR

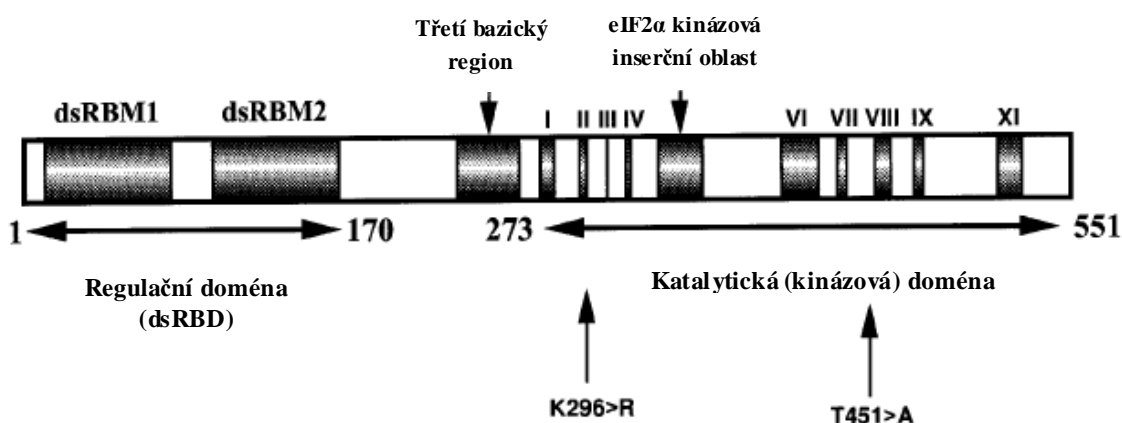
Savčí interferon-inducibilní eIF2 α kináza PKR, (dvouřetězcovou RNA aktivovaná protein kináza R), hraje významnou roli ve spuštění autofagie (Talloczy et al., 2002).

PKR je všudypřítomně exprimovaná kináza, která je indukovaná interferony a aktivovaná dvouřetězcovou RNA (dále dsRNA), cytokiny, růstovými faktory a stresovými

signály. Je zásadní pro adekvátní buněčnou odpověď na produkty zánětlivé reakce (TNF), produkty bakterií (lipopolysacharidy), virů (dsRNA) a na nedostatek růstových faktorů. Po vazbě k dsRNA je autofosforylována a aktivována. Aktivace PKR vede k aktivaci různých transkripčních faktorů, což má za následek transkripci zánětlivých genů. PKR je součástí dráhy signální transdukce, která zprostředkovává kontrolu buněčného růstu a odpoví na stres. Další rolí PKR je inhibice hostitelské translace prostřednictvím fosforylace eIF2 α . PKR má odlišné autofosforylační a substrát fosforylující aktivity a neobvykle širokou substrátovou specifitu. Může být aktivována i inhibována dsRNA ligandem a dále může být aktivována cytokiny a stresovými signálními dráhami, které pravděpodobně fungují nezávisle na dsRNA. Kinázové a dsRNA vazebné aktivity jsou oddělené na odlišných strukturních doménách. PKR se skládá z 551 aminokyselin (u myši) a sestává ze dvou funkčně odlišných domén – z N-koncové dsRNA vazebné regulační domény a C-koncové kinázové katalytické domény (viz Obr. 6). dsRNA vazebná doména (dsRBD), kterou představují u lidského PKR aminokyseliny 1 – 170, obsahuje dva dsRNA vazebné motivy (dsRBM). Tyto motivy jsou bohaté na bazické zbytky seskupené v jejich C-koncové oblasti. Každý z obou motivů je dlouhý 70 aminokyselin a jsou vzájemně propojené 20 aminokyselinovým linkerem, který umožňuje ovinutí motivů kolem A-formy dsRNA a optimální interakce mezi molekulami. Aktivace PKR pomocí dsRNA (nebo jiných agens) má za následek autofosforylaci, dimerizaci a aktivaci kinázové aktivity. Vazba dsRNA způsobí velkou konformační změnu v molekule PKR, která slouží k odkrytí katalytických míst pro autofosforylaci nebo k posunu domén z odlišných částí molekuly do aktivní konformace. Následná dimerizace je důležitá pro aktivaci kinázové aktivity. Po přeskupení molekuly včetně C-terminální katalytické domény, dochází tedy k autofosforylaci. Na molekule PKR se nachází několik fosforylačních míst. Tři (Thr-258, Ser-242 a Thr-255) ve třetí bazické oblasti a další dvě (Thr-446 a Thr-451) na aktivační smyčce mezi kinázovými subdoménami VII a VIII (viz obr. 6). Fosforylace uvnitř třetí bazické oblasti může sloužit k uzamčení PKR v aktivní konformaci, kdy je katalytická doména nevratně odkrytá, zatímco fosforylace v aktivační smyčce slouží k snadnější vazbě substrátu a katalýze. PKR může být prostřednictvím dsRNA i inhibována, což je mechanismus, který pomáhá virům uniknout před imunitním systémem. V posledních letech bylo zjištěno, že mnohé proteiny jsou schopné inhibovat PKR, ať už přímou interakcí s ní nebo prostřednictvím vazby na její aktivátory nebo substráty (např. ICP34.5 - viz kapitola 3.2.). Hlavním fyziologickým substrátem PKR je eIF2 α . PKR ho fosforyluje na Ser-51, který leží v bazické oblasti a je následován čtyřmi argininy na C-terminální straně. Fosforylovaný eIF2 α není schopen se účastnit v guaninové nukleotidové výměnné reakci, která je nezbytná

pro rozpoznání start kodonu (Ramaiah et al., 1994). To hostiteli umožňuje zpomalit translaci (a tím např. virovou infekci). PKR tedy stimuluje indukci autofagie a zastavení hostitelské translace fosforylací serinového zbytku Ser-51 na molekule eIF2 α .

Oblast PKR bezprostředně přiléhající ke konzervované eIF2 α kinázové doméně (aminokyseliny 362-370) jsou nezbytné pro kinázovou a plnou eIF2 α vazebnou aktivitu. Hydrofobicita této oblasti je sice zásadní pro kinázovou aktivitu, ale ne pro vazbu eIF2 α . Naopak Glu-367 je nutný pro plnou vazbu substrátu, ale pro kinázovou aktivitu PKR je postradatelný. Shrnuje ve Williams (1999).



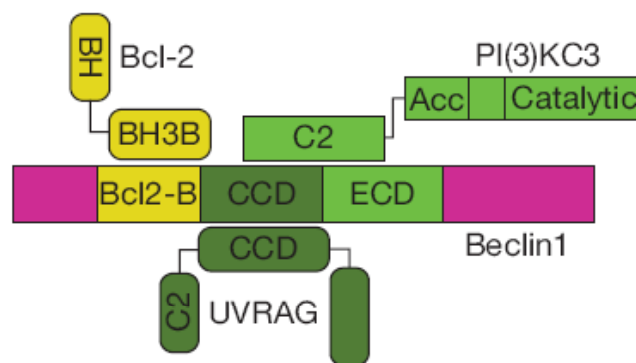
Obr. 6: Charakteristické motivy PKR. Převzato z Williams (1999)

2.4.5.3. Beclin 1/PI3K třídy III

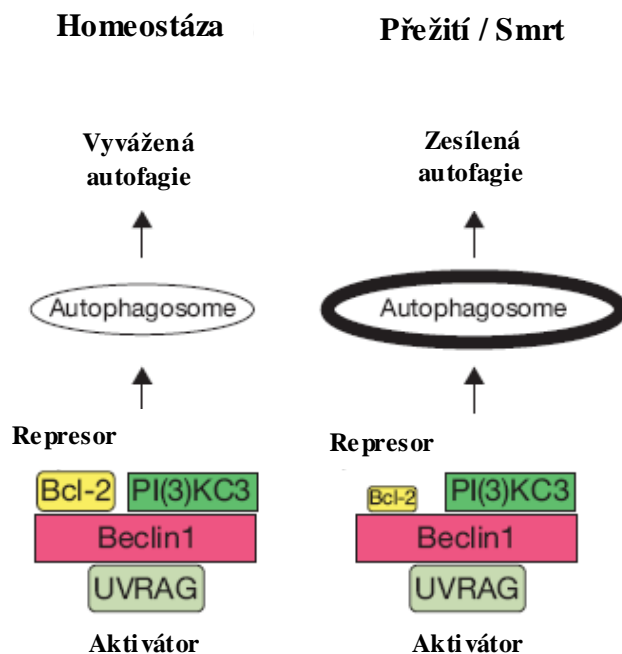
Zatímco PI3K třídy I se společně s mTOR podílí na inhibici autofagie (viz kapitola 2.4.5.1.), komplex Beclin 1/PI3K třídy III je nezbytný v časných obdobích formace autofagozómu a iniciace autofagie (viz kapitola 2.4.1.). Inhibitory PI3K třídy III jako je např. wortmannin, 3-methyladenin nebo LY294002 interferují s touto dráhou (Petiot et al., 2000; Blommaert et al., 1997). Beclin 1 (myší) je protein o velikosti 60 kDa sestávající z 450 aminokyselin. Zahrnuje 4 specifické domény – Bcl-2 vazebnou doménu (aminokyseliny 88 – 150), coiled-coil doménu (aminokyseliny 150 – 244), evolučně konzervovanou doménu (aminokyseliny 244 – 377) a jaderný exportní signál (aminokyseliny 180 – 190), který je zodpovědný za transport Beclin 1 z jádra do cytoplazmy, protože pouze cytozolická forma proteinu je zodpovědná za regulaci autofagie (Liang et al., 2001). Evolučně konzervovaná doména je zodpovědná za vazbu PI3K třídy III. Interakce mezi PI3K třídy III a Beclin 1 může být různě modulována a tím může být ovlivněna i autofagie. Například inhibitor autofagie Bcl-2 přeruší vazbu těchto dvou molekul, přestože interaguje s jinou doménou Beclin 1 než

PI3K třídy III, jak je schematicky znázorněno na obr. 5 (Pattingre et al., 2005). Interakce mezi Beclin 1 a Bcl-2 je modulována podmínkami, které regulují i autofagii. Při dostatku živin, když je autofagie inhibována, je vazba mezi molekulami silná. Naopak při hladovění, když je hladina autofagie vysoká, je interakce jen slabá. To vede k domněnce, že Bcl-2 funguje jako reostat, který zapíná nebo vypíná autofagii podle potřeby. Současná data ukazují, že pro tuto regulaci je zásadní fosforylace Bcl-2 pomocí kinázy JNK1, ke které dochází při hladovění. Po fosforylaci je inhibována vazba Bcl-2 k Beclin 1 a tím je stimulována autofagie. Při dostatku živin je fosforylace Bcl-2 zablokována a tak může dojít k asociaci s Beclin 1 (Wei et al., 2007 – převzato z Pattingre et al., 2008). Naproti tomu UVRAG se váže přímo na coiled-coil doménu Beclin 1 (viz obr. 7) a potencuje interakci Beclin 1 s PI3K třídy III a tak stimuluje autofagii (Liang et al., 2006). Beclin 1 reaguje ještě s dalšími proteiny – mezi nimi například i s ICP34.5 viru HSV-1 (viz kapitoly 3.2. a 3.2.1.)

Beclin 1 tedy sám o sobě nemá žádnou enzymatickou aktivitu, ale slouží jako jakási platforma pro vazbu aktivátoru (UVRAG) nebo represoru (Bcl-2) autofagie závislé na Beclin 1/PI3K třídy III (viz Obr. 8). Jak už bylo řečeno v kapitole 2.4.1. komplex Beclin 1/PI3K třídy III produkuje fosfatidylinositol-3-fosfát a podílí se na shromáždění některých Atg proteinů v počátečních krocích autofagie. Přesto je přesný mechanismus jakým tento komplex autofagii reguluje stále nejasný.



Obr. 7: Schematické znázornění multiproteinového komplexu Beclin 1/Bcl-2/UVRAG/PI3K třídy III (zde PI(3)KC3). BH znamená Bcl-2 homolog, BH3B je BH3 vazebný motiv, Bcl2-B je Bcl-2 vazebná doména, CCD je coiled-coil doména a ECD je evolučně konzervovaná doména. Převzato z Liang et al. (2006)



Obr. 8: Schematické znázornění modelu regulace Beclin 1 zprostředkované modulace autofagie. Menší obrázek Bcl-2 vyjadřuje slabší vazbu k Beclin 1 za stresových podmínek. Převzato z Liang et al. (2006)

2.4.5.4. G proteiny (GTPázy)

Na regulaci autofagie se podílí i trimerní G_{i3} ($\alpha_{i3}\beta\gamma$) proteiny a s nimi interagující proteiny. Jak zjistili Ogier-Denis et al. (1995), provádějící výzkum na lidských buňkách nádoru tlustého střeva HT-29, G_{i3} kontrolují autofagickou dráhu v izolacním kroku. Úroveň autofagie je nízká, když je $G_{\alpha i3}$ ve formě vázané s GTP. Ke stimulaci autofagie naopak dochází, když je ke $G_{\alpha i3}$ vázáno GDP (Ogier-Denis et al., 1996). Guaninový nukleotidový cyklus $G_{\alpha i3}$ proteinu je závislý na aktivitě GAIP (G alfa interagující protein), což je malý protein (217 aminokyselin, 24 kDa), patřící mezi regulátory G-proteinové signální rodiny (De Vries et al., 1995), aktivující GTPázovou aktivitu $G_{\alpha i3}$ proteinu. GAIP podporuje autofagickou izolaci zvýšením rychlosti hydrolýzy GTP vázaného na $G_{\alpha i3}$ (Ogier-Denis et al., 1997). Aktivita GAIP je stimulována fosforylací serinového zbytku na pozici 151 (Ser-151) v RGS doméně. K této fosforylaci dochází prostřednictvím MAP kinázy Erk1/2. V přítomnosti aminokyselin je fosforylace GAIP snížena (Ogier-Denis et al., 2000). Poměrně nedávno se ukázalo, že aminokyseliny moduluji aktivaci kinázy Raf-1, jejíž působení předchází Erk1/2 (MAP) kinázové kaskádě (Pattingre et al., 2003). Mechanismus, kterým aminokyseliny narušují aktivaci Raf-1, zůstává neobjasněný. Dalším proteinem se stimulačním efektem na

autofagii je AGS3 (aktivátor G-proteinové signalizace 3), který ve své C-termimální polovině obsahuje G-proteinové regulační motivy a který stabilizuje $G_{\alpha 3}$ s navázaným GDP. ATG3 se chová jako inhibitor disociace guaninu (GDI) zablokováním výměny navázaného GDP za GTP (Pattingre et al., 2003; Bernard et al., 2001; De Vries et al., 2000). Stále ale není jasné, jak $G_{\alpha 3}$ a s ním asociované proteiny kontrolují autofagii. Protože $G_{\alpha 3}$ a jeho partneři působí před formací autofagozómu, je možné, že se účastní kontroly membránového toku do autofagické dráhy (Meier a Codogno, 2004).

3. Autofagie a HSV-1

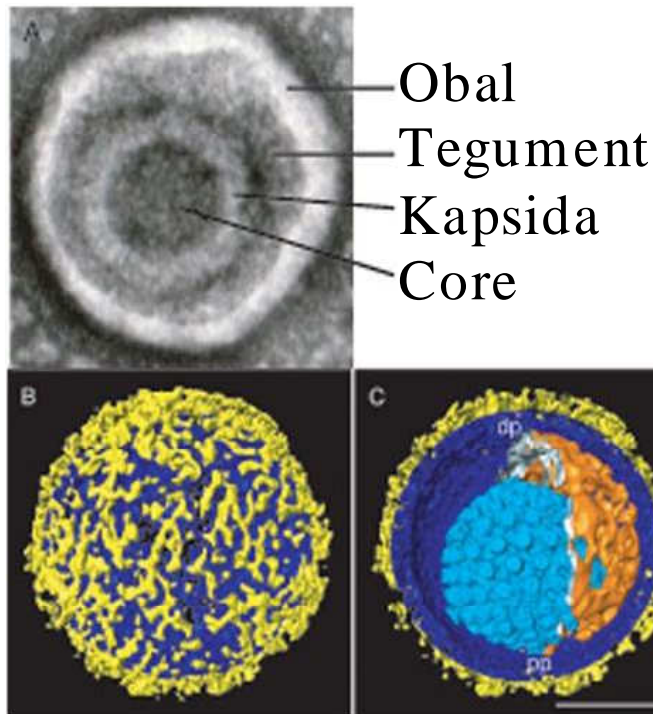
V současné době je již potvrzeno řadou studií, že autofagie je buňkami využívána k boji proti virovým infekcím. Představuje velmi důležitý mechanismus v omezení virové replikace. Únik před degradací pomocí autofagie představuje tedy důležitou strategii, kterou viry využívají k překonání hostitelské antivirové obrany. Jedním z virů, které vyvinuly účinný mechanismus k potlačení autofagie je herpes simplex virus typu I.

3.1. Herpes simplex virus typu I (HSV-1)

HSV-1 přísluší k čeledi Herpesviridae, podčeledi α -herpesvirinae a rodu Simplexvirus. Jeho genom je tvořen dvouřetězcovou DNA, proto ho řadíme k dsDNA virům.

Virion se skládá ze 4 částí: z core, které obsahuje lineární virovou dsDNA ve formě toroidu (Furlong et al., 1972), ikosahedrální kapsidy obklopující core, amorfní proteinové vrstvy zvané tegument, která obklopuje kapsidu, a nakonec z obalu tvořeného lipidovou dvojsrtvou. Tento obal získává virus v jádře, případně po reobalení v endoplazmatickém retikulu. Z povrchu obalu vycházejí glykoproteiny zvané „spikes“ (viz obr. 9).

Velikost sférického virionu je přibližně 186 nm, pokud jsou započítány i glykoproteiny „spikes“ tak až 225 nm. Vrstva tegumentu není ve všech oblastech stejně silná, nukleokapsida je uložena excentricky. Purifikovaný virion HSV-1 obsahuje více než 30 odlišných proteinů, které bývají označeny jako virionové polypeptidy (VP) a podle polohy na gelu po gelové elektroforéze jim bylo přiřazeno sériové číslo (např. VP5) (Heine et al., 1974; Spear et al., 1972). Jiný název je odvozen od polohy proteinu v otevřeném čtecím rámci, kterým je kódován (např. U_L8). Pro některé proteiny se používá také označení infected cell protein = proteiny infikované buňky (např. ICP5). Z přibližně 30 známých a 10 předpokládaných virionových proteinů, je nejméně 11 na povrchu virionu a nejméně 10 je glykosylováno.



Obr. 9: Struktura virionu HSV. A. Elektronový mikrosnímek negativně obarveného HSV-1 virionu. Obal, tegument a core jsou označeny. Mikrosnímek pořídil T. Taylor. B. Obraz povrchu HSV získaný pomocí kryo-elektronové tomografie. Glykoproteinové hroty (spiky) viditelné jako světle zbarvené a membrána je zbarvena tmavě. Pořízeno A. C. Stevenem. C. Průřez virionem získaný kryo-elektronovou tomografií. Světle modrou barvou zbarvená kapsida se nachází uprostřed, vrstva tegumentu je znázorněna oranžově, obal modře a hroty glykoproteinů žlutě. Měřítka 100 nm. Pořízeno A. C. Stevensem. Převzato z Fields Virology.

Tegument je převážně amorfni hmota obsahující nejméně 20 virových proteinů.

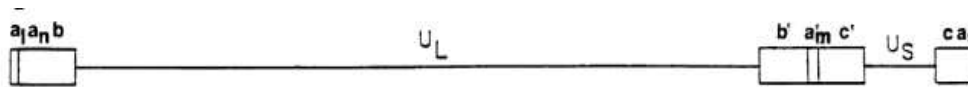
Ikosahedrální kapsida se skládá ze 162 kapsomer. Hlavním kapsidovým proteinem je VP5, který je přítomen v pěti kopiích v každé pentonové a v šesti kopiích v každé hexonové kapsomeře (Zhou et al., 1999).

Obal je tvořen lipidovou dvojvrstvou, získanou od hostitele, ve které je zakotveno přibližně 11 různých virových glykoproteinů.

Molekula virové dsDNA je lineární, ale poté co se dostává do jádra infikované buňky dochází rychle k její cirkularizaci. Velikost genomu se pohybuje okolo 152 kbp a obsah G + C párů je přibližně 67 % (Kieff et al., 1971). Genom můžeme popsat jako dvě kovaletně spojené části, označované jako L (long = dlouhá oblast) a S (short = krátká oblast). Každá z těchto částí se skládá z unikátní sekvence, kterou obklopují invertované repetice (Wagner et

al, 1978; viz obr. 2). Genom tedy můžeme zkráceně vyjádřit takto: $a_L a_n b - U_L - b' a'_m c' - U_S - c a_S$, kde a_L a a_S jsou terminální sekvence (viz. obr. 10).

Sekvence a_n a a_m obsahují 0 až n přímých repetic a mohou být přítomny v počtu 1 až m kopií. L a S části genomu mohou být vůči sobě obráceny různými způsoby a díky tomu existují 4 různé lineární izomery virové DNA. Izomery jsou označeny jako P (prototyp), I_L (inverze L části), I_S (inverze S části) a I_{SL} (inverze S i L části). Všechny izomery jsou funkční.



Obr. 10: Schematické znázornění uspořádání sekvencí DNA v genomu HSV-1. Domény oblastí L a S jsou vyznačeny linkami. Unikátní sekvence (tenké linky) jsou obklopené invertovanými repeticemi (boxy). Písmena nad linkou označují terminální repetitivní a sekvenci L oblasti (a_L), variabilní (n) počet přídatných a sekvencí (a_n), sekvenci b , unikátní sekvenci L oblasti (U_L), repetice b sekvence (b') a repetice variabilního (m) počtu sekvencí a (a'_m), invertovanou sekvenci c (c'), unikátní sekvenci S oblasti (U_S), sekvenci c a nakonec terminální a sekvenci S oblasti (a_S). Převzato z Fields Virology.

Virová DNA kóduje přibližně 90 unikátních transkripčních jednotek, ze kterých minimálně 84 kóduje proteiny. Geny a jejich produkty jsou rozděleny do 3 tříd: α neboli bezprostředně časné, β neboli časné a γ neboli pozdní. Kromě 3 výjimek, každý virový transkript kóduje pouze jediný protein. Některé transkripty nekódují žádný protein - např. s latencí asociovaný transkript (LAT).

Prvním krokem při vstupu viru do buňky je přichycení virové částice k receptorům (glykosaminoglykany – Shieh et al., 1992) a koreceptorům (nektiny – Cocci et al., 2000) na buněčném povrchu pomocí virových glykoproteinů a následná fúze obalu s plazmatickou membránou. Existuje i druhá, pomocná cesta vstupu viru do buňky představovaná endocytózou obaleného viru a následnou, na receptoru závislou fúzí obalu s membránou endocytického váčku. Vybelená struktura tegument-kapsida je poté za pomoci mikrotubulů transportována k jaderným póřům (Sodeik et al., 1997), kde je DNA vypuštěna do jádra.

Transkripce genomu, replikace virové DNA a složení nových kapsid se uskutečňuje v buněčném jádře, zatímco translace probíhá v cytoplasmě. Během produktivní infekce je virová DNA transkribována hostitelskou RNA polymerázou II (Costanzo et al., 1977), ale za účasti virových faktorů. Expres genů je uspořádána kaskádovitě a je velmi přísně a

koordinovaně kotranskripčně i posttranskripčně regulována (Honest et al., 1974). Nejdříve jsou exprimovány α geny, které jsou transkribovány bez de novo virové proteosyntézy. Tyto α geny se podílí na aktivaci exprese β nebo opožděně časných genů. Některé z β genových produktů jsou enzymy (včetně virové polymerázy) a DNA-vazebné proteiny, které se účastní replikace virové DNA. Replikace následující po expresi β genů, probíhá nejdříve mechanismem θ , ale pak dojde k přesmyku a většina virové DNA už je syntetizována mechanismem valivé kružnice. Při tomto typu replikace vznikají dlouhé konkatemery, které jsou rozštěpeny na monomery během skládání nukleokapsidy (Boehmer a Lehman, 1997). Po replikaci virové DNA jsou transkribovány γ geny. Tyto geny kódují převážně strukturní proteiny, a proto se γ genové produkty nejvíce podílí na skládání nových virionů. Mezi produkty γ genů patří i protein ICP34.5, který blokuje PKR dependentní autofagii (Tallóczy et al., 2002, 2006) – viz následující kapitola 3.2.

Skládání probíhá v několika stupních (Homa a Brown, 1997). Po zabalení DNA do předuspořádaných kapsid zraje naplněná kapsida neboli nukleokapsida na virion. Ten stává se infekčním po vypuštění skrz vnitřní vrstvu jaderné membrány.

Záhy po primární infekci ustavuje HSV-1 latentní infekci v senzoryckých neuronech, do nichž vstupuje fúzí v oblasti axonu. Nukleokapsida je následně retrográdním transportem dopravena do jádra neuronu. V jádře virová DNA persistuje v cirkulární episomální formě asociovaná s nukleozómy. Exprese lytických genů je v latenci reprimována, avšak je transkribován s latencí asociovaný transkript (LAT). Jeho alternativním splicingem vzniká několik tříd RNA. Tyto rozmanité třídy jsou souhrnně označovány jako LATs. Během latentní infekce může být nereplikující se virus detekován v senzoryckých gangliích (Decman et al., 2005).

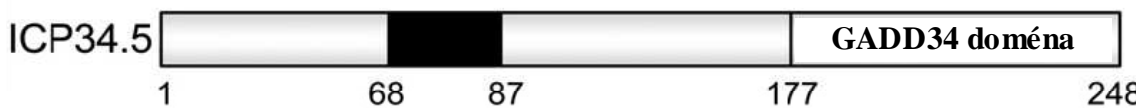
Během reaktivace se anterogádním transportem vrací z jader neuronů zpět do místa primární infekce, což je většinou kůže nebo mukózní membrány, a zde se pomnožuje a způsobuje léze (Decman et al., 2005).

Infekce HSV-1 je příčinou řady klinických syndromů různé závažnosti, od středně závažných mukokutánních chorob po virovou encefalitidu. HSV-1 encefalitida je velmi závažná choroba, která, pokud není léčena, vede k 70 % úmrtnosti. Dostupná antivirová terapie snižuje úmrtnost na 20-30% (Whitley a Roizman, 2001). Infekce HSV-1 zasahuje a mění expresi mnoha hostitelských genů, např. genů pro cytoskeletární proteiny, imunitní odpověď, biosyntézu fosfolipidů, programovanou buněčnou smrt, mezibuněčnou signalizaci, transkripční faktory a další (Pasička et al., 2006). Pro neurovirulenci HSV-1 je zásadní zablokování PKR-závislých funkcí in vivo (Leib et al., 2000).

3.2. ICP34.5

HSV-1 kóduje 263 aminokyselin dlouhý neurovirulentní protein ICP34.5 (infected cell protein 34.5), který způsobuje neurovirulenci u myši (Chou et al., 1990). Tento protein je také příčinou vzniku neurologických poruch u lidí (Harrow et al., 2004). ICP34.5 hraje velmi zásadní roli v průběhu virové infekce, protože svou vazbou na proteinfosfatázu 1 α dokáže vyvolat defosforylaci translačního iniciačního faktoru eIF2 α , což vede k potlačení antivirové aktivity PKR (He et al., 1997; Leib, 2000) – více o PKR viz kapitola 2.4.5.2.1.

ICP34.5 obsahuje N-terminální oblast, následuje tripeptidová repetice a C-terminální GADD34 (Growth arrest and DNA-damage-inducible protein, protein phosphatase 1 regulatory protein) homologní doména (Chou and Roizman, 1994; Orvedahl and Alexander, 2007) (viz Obr. 11). Také obsahuje jadérový lokalizační a jaderný cílový signál a je schopen stálého pohybu (traffickingu) mezi cytoplazmou, jádrem a jadérkem (Cheng et al., 2002 – převzato z Pasička et al., 2006). Jeho exprese předchází replikaci virové DNA, ale svého maxima dosahuje až po ní (Pasička et al., 2006).



Obr. 11: Schematické znázornění ICP34.5 znázorňující pozici Beclin 1-vazebné oblasti (aminokyseliny 68-87) a GADD34 homologní oblasti. Převzato z Orvedahl a Alexander et al. (2007)

Pasička et al. (2006) se dále zabývali expresí virových proteinů v průběhu prvních 12 hodin po infekci. Tři hodiny po infekci byly naměřeny pouze nízké hladiny exprese ICP34.5, které narůstaly mírně 6 a 9 hodin po infekci a poté prudce 12 hodin po infekci. Tyto výsledky souhlasí s tvrzením, že k maximální expresi ICP34.5 dochází po replikaci DNA, která nastává okolo 6 hodin po infekci.

GADD34 homologní oblast (Chou a Roizman, 1994), která se skládá z 63 aminokyselin, dokáže zvrátit fosforylaci eIF2 α díky tomu, že naváže proteinfosfatázu 1 α (PP1 α) (He et al., 1997). Toto pozorování vedlo k předpokladu, že hlavní funkcí ICP34.5 je přerušení eIF2 α kinázové signální dráhy, díky čemuž dojde k zablokování hostitelského přerušení translace, které na této dráze závisí (Chou a Roizman, 1994).

Díky pokusům s protein-proteinovými interakcemi bylo zjištěno, že ICP34.5 v savčích buňkách specificky interaguje s autofagickým proteinem Beclin 1 (více o tomto proteinu viz

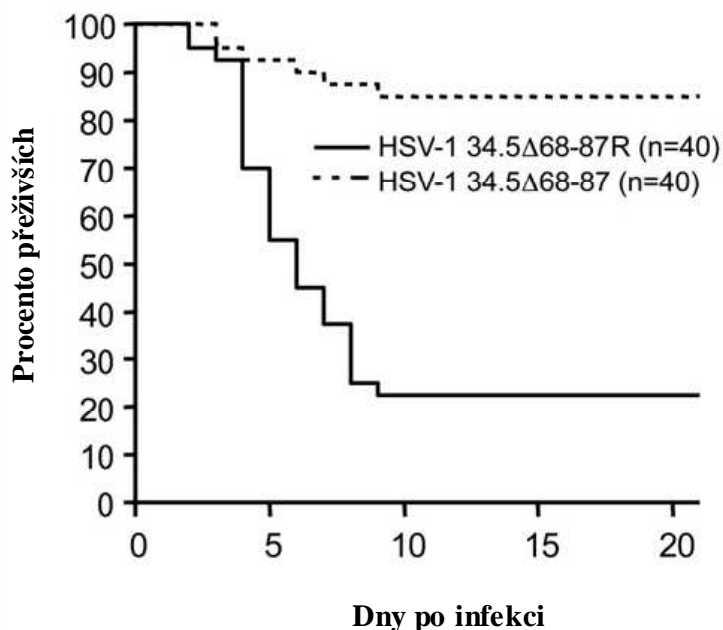
kapitola 2.4.5.3.) V buňkách, které byly transientně transfekovány plasmidy exprimujícími Beclin 1 označený Flag epitopem a HSV-1 protein ICP34.5, byla pozorována koimunoprecipitace označeného Beclin 1 s ICP34.5, což dokazuje jejich interakci (Orvedahl a Alexander et al., 2007).

3.2.1. Význam jednotlivých částí ICP34.5 pro inhibici autofagie

K zjištění, která oblast ICP34.5 je zodpovědná za vazbu k Beclin 1, byly sestrojeny 3 mutanty ICP34.5 obsahující vždy 20 aminokyselinové delece v N-terminální části proteinu. Ukázalo se, že proteiny postrádající aminokyseliny 48-67 a 88-107 (ICP34.5 Δ 48-67 a ICP34.5 Δ 88-107) jsou stále schopny vázat Beclin 1. Mutanta postrádající aminokyseliny 69-87 (ICP34.5 Δ 68-87) se na Beclin 1 nevázala, což naznačuje, že delece aminokyselin 68-87 vede ke zrušení interakce mezi ICP34.5 a Beclin1. Oblast těchto 20 aminokyselin je tedy nezbytná pro vazbu proteinu Beclin 1 a také pro inhibici Beclin 1-závislé autofagie (Orvedahl a Alexander, 2007). Zároveň bylo dokázáno, že N-koncová část Beclin 1, kódovaná nukleotidy 1-708, není dostačující pro interakci mezi ICP34.5 a Beclin 1. K vazbě ICP34.5 je tedy potřeba celý protein Beclin 1.

Studie Orvedahla a Alexanderové et al. (2007) také umožnila geneticky oddělit roli ICP34.5-zprostředkované inhibice autofagie ve virulenci od ICP34.5-zprostředkovaného působení proti jiným PKR-dependentním funkcím. Zjistili, že k vazbě Beclin 1 a specifickému působení proti Beclin-1-zprostředované autofagii je třeba pouze Beclin 1-vazebné domény, když se potvrdilo, že i ICP34.5 postrádající GADD34 doménu (ICP34.5 Δ GADD34) imunoprecipituje s Flag-Beclin 1 v buňkách stabilně transfekovaných lidským Beclin 1 (MCF7.beclin1 cells = lidské buňky prsního karcinomu). GADD34 doména je tedy sice nutná pro působení proti eIF2 α fosforylaci, ale není nezbytná k vazbě Beclin 1. Ze skutečnosti, že je GADD34 doména postradatelná pro inhibici Beclin-1 závislé autofagie, je patrné, že ICP34.5 dokáže upravovat hostitelské funkce i nezávisle na PP1 α jen pomocí interakcí s Beclin 1. Orvedahl a Alexander et al. (2007) dále sestrojili rekombinantní mutantní virus HSV-1 Δ 68-87, který si udržel svou GADD34 doménu a schopnost blokovat PKR-dependentní zastavení translace, ale který naopak ztratil schopnost vázat Beclin 1 a inhibovat autofagii v infikovaných buňkách. Tento mutantní kmen, jehož protein ICP34.5 není schopen vázat Beclin 1, je vysoce neuroatenuován in vivo, což vede k předpokladu, že ICP34.5-zprostředkovaná inhibice přerušení hostitelské translace není dostačující k dodání neurovirulence. Je to tedy spíše ICP34.5-zprostředkovaná blokáda Beclin 1-dependentní autofagie, co způsobuje neurovirulenci. Myši infikované touto mutantou vykazují pokles

virové replikace v CNS, méně mrtvých neuronů a menší úmrtnost ve srovnání s myšmi infikovanými divokým typem viru (Orvedahl a Alexander et al., 2007; viz obr. 12).



Obr. 12: Graf znázorňující závislost procenta přeživších myší infikovaných intracerebrálně 5×10^5 pfu HSV-1 34.5Δ68-87 nebo divokým typem viru HSV-1 34.5Δ68-87R na době uplynulé od infekce, znázorněné ve dnech. Převzato z Orvedahl a Alexander et al. (2007)

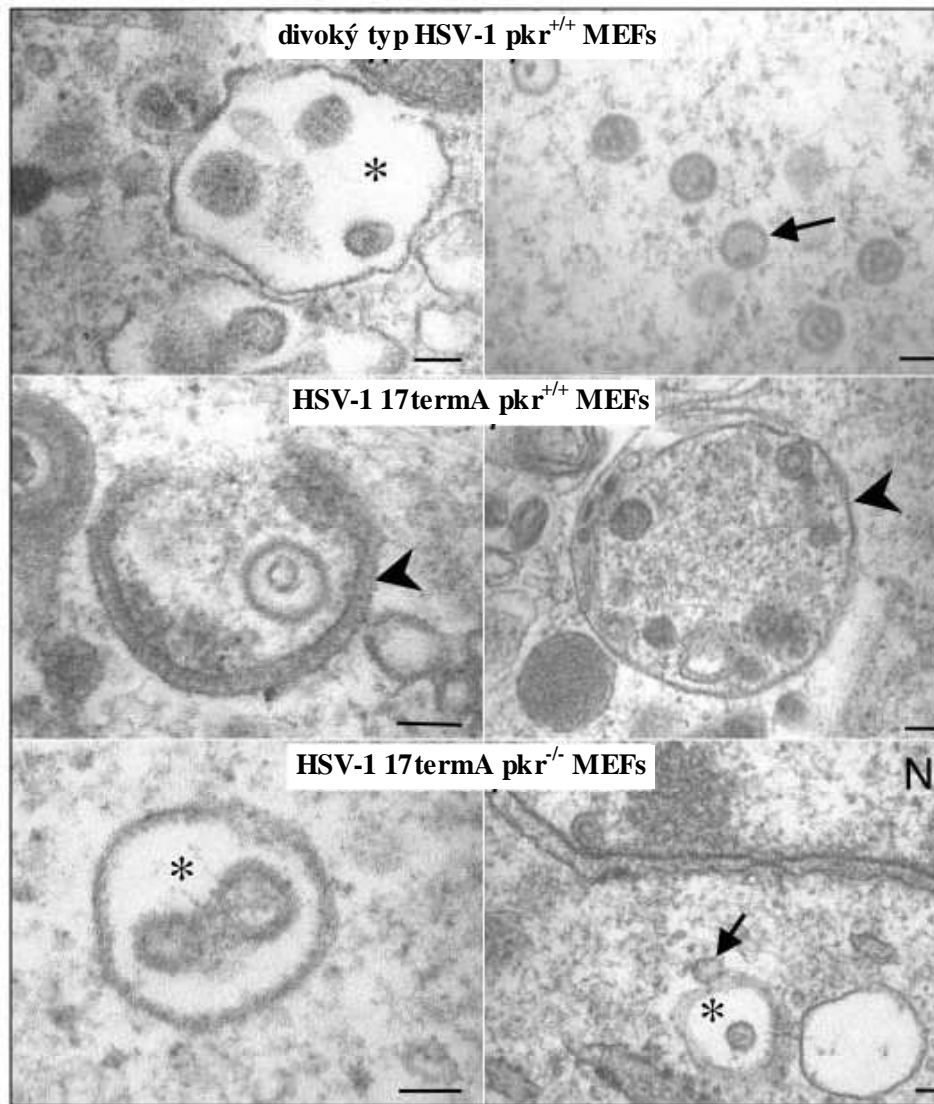
3.2.2. Mutanty HSV-1 ICP34.5 a jejich schopnost indukovat autofagii v různých buňkách

Tallóczy et al. (2002) přišli s hypotézou, že eIF2α kinázy, regulátory stresem vyvolaných translačních kontrolních programů, mezi které patří i PKR, se také podílí na regulaci stresem vyvolané autofagie, a že specifické stresové podněty, které aktivují zastavení translace závislé na eIF2α kináze, také aktivují autofagii závislou na eIF2α kináze (viz kapitoly 2.4.5.2. a 2.4.5.2.1.). Savčí eIF2α kinázová signalizační dráha je základní pro virem i hladověním vyvolanou autofagii a je, jak již bylo řečeno, blokována PKR inhibitorem a virovým proteinem ICP34.5.

Už dříve byly v myších embryonálních fibroblastech (dále jen MEFs) infikovaných ICP34.5 pozorovány nápadné rozdíly v hladinách fosforylovaného eIF2α (Ward et al., 2003), ale protože ICP34.5 může být detekován už před 6 hodinou po infekci, Pasiaka et al. (2006) se rozhodli zanalyzovat funkce ICP34.5 už v dřívějších časových bodech infekce pomocí měření

hladin fosforylovaného eIF2 α . U MEFs infikovaných divokým typem viru zjistili 1 a 2 hodiny po infekci pouze malý pokles množství fosforylovaného eIF2 α oproti negativní kontrole. Naproti tomu 4 hodiny po infekci už byl nárůst defosforylace eIF2 α znatelnější. U buněk nakažených HSV-1 17termA (= HSV-1 Δ 34.5 - označení viz Talloczy et al., 2002), který postrádá celý protein ICP34.5, byla pozorována 2 hodiny po infekci akumulace fosforylovaného eIF2 α , která postupně narůstala. Mírný pokles množství fosfo-eIF2 α 2 hodiny po infekci naznačuje přítomnost ICP34.5 ve virovém tegumentu divokého typu viru. Klesající hladiny fosforylovaného eIF2 α pozorované 4 hodiny po infekci nasvědčují, že de novo syntetizovaná populace ICP34.5 je hlavním mediátorem defosforylace tohoto faktoru.

V MEFs s eIF2 α divokého typu, které byly infikovány HSV-1 17termA, byl pozorován značný nárůst degradace dlouho-žijících proteinů a formace autofagických vakulol ve srovnání s těmi, které byly infikovány divokým typem HSV-1. Naproti tomu u homozygotních eIF2 α S51A mutant MEFs, které obsahují nefosforylovatelné eIF2 α , nedošlo po infekci HSV-1 17termA k žádnému zvýšení degradace ani formace autofagozómů. U MEFs exprimujících nefosforylovatelný eIF2 α také nebylo pozorováno žádné LC3-II, což prozrazuje, že fosforylace eIF2 α předchází konverzi LC3 a formaci autofagozómu (Kouroku et al., 2007). Tato data demonstrují, že substrátové místo pro eIF2 α kinázu, tedy Ser-51 na eIF2 α , je nezbytné pro virem vyvolanou autofagii v savčích buňkách. Synchronní regulace translace a autofagie pomocí eIF2 α kinázové signální dráhy může být během hladovění a virové infekce základním mechanismem, který umožňuje eukaryotickým buňkám úspěšně se adaptovat na stres způsobený prostředím. Talloczy et al. (2002) pozorovali, že v MEFs s nepoškozeným genem pro pkr (pkr^{+/+} MEFs) infikovaných HSV-1 17termA (=HSV-1 Δ 34.5) dochází k značnému nárůstu degradace dlouho-žijících proteinů 4, 6 a 8 hodin po infekci ve srovnání s negativní kontrolou (neinfikované MEFs), zatímco po infekci HSV-1 divokého typu (HSV-1 17termAR) ke zvýšení této degradace nedochází. Naopak u pkr^{-/-} MEFs HSV-1 17termA nezvyšuje degradaci dlouho-žijících proteinů. Talloczy et al. (2002) kvantitativními elektron-mikroskopickými analýzami potvrdili, že nárůst degradace dlouho-žijících proteinů u pkr^{+/+} MEFs infikovaných HSV-1 17termA představuje i nárůst autofágie. Výsledky totiž ukázaly, že pkr^{+/+} MEFs infikované HSV-1 17termA obsahují mnohem větší procentuální podíl jak časných tak i pozdních autofagických vakuol, ve srovnání s pkr^{-/-} MEFs infikovanými HSV-1 17termA a pkr^{+/+} i pkr^{-/-} MEFs infikovanými kmenem HSV-1 17termAR (viz obr. 13).



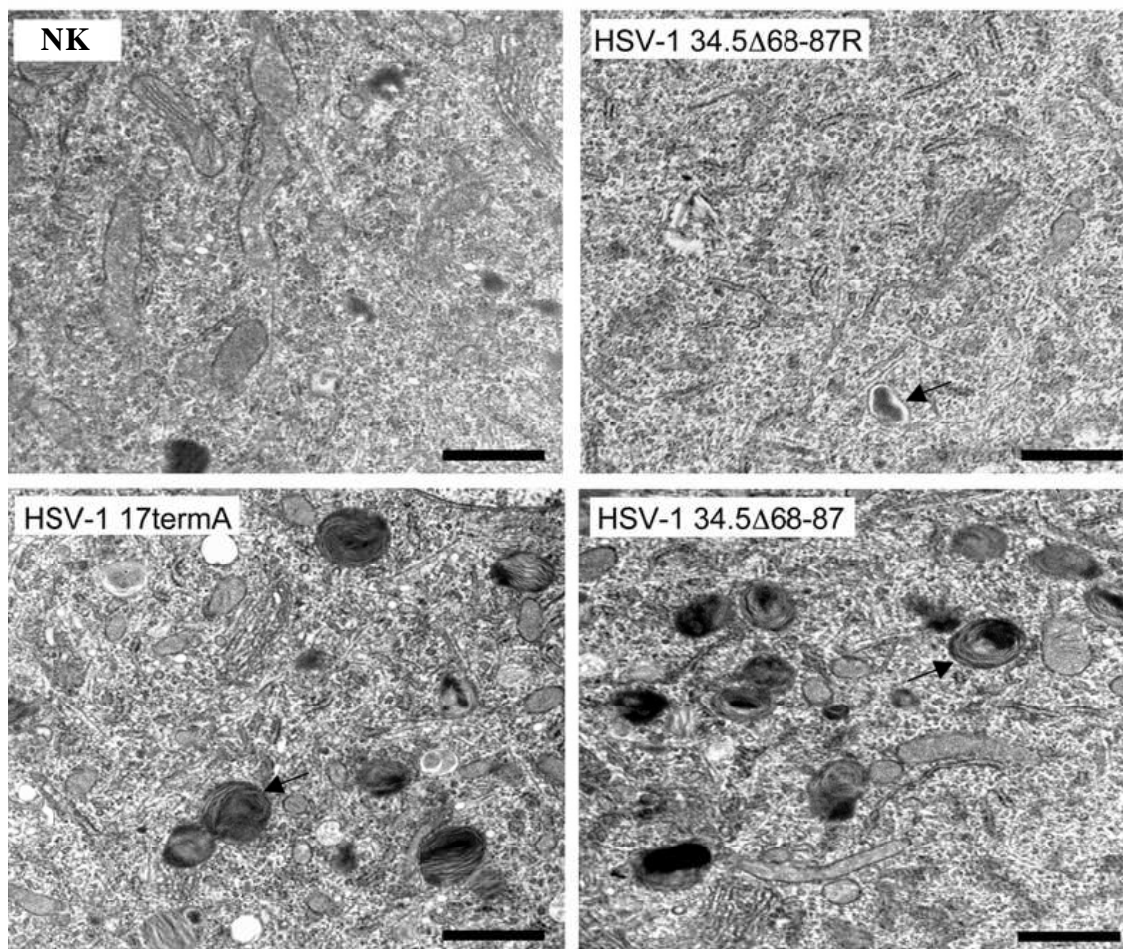
Obr. 13: Reprezentativní elektron-mikroskopické snímky $pkr^{+/+}$ MEFs infikovaných divokým typem HSV-1 a HSV-1 17termA a $pkr^{-/-}$ infikovaných HSV-1 17termA. Hvězdičkou jsou označeny cytoplazmatické virové vesikly, šipky značí intracytoplazmatické viriony. Hrot šipky v levé střední části značí autofagickou izolační membránu formující se kolem intracytoplazmatického virionu a hrot šipky v pravé střední části označuje pozdní autofagosom s částečně degradovanými viriony a a jinými cytoplazmatickými součástmi. N znamená jádro. Znázorněné usečky představují vzdálenost 100 nm. Převzato z Tallóczy et al. (2006)

Časné autofagické vakuoly (Avi) byly definovány jako 0,3 – 2 μm velké membránově vázané váčky, které obsahovaly morfologicky intaktní cytoplazmu, a pozdní autofagické vakuoly (Avd) jako váčky stejné velikosti, které obsahovaly už částečně degradovaný, ale stále identifikovatelný, cytoplazmatický materiál (viz kapitola 2.2.).

Z dalších výzkumů plyne, že HSV-1 34.5 Δ 68-87 roste v lidských nádorových SK-N-SH buňkách obdobně rychle jako nemutovaný virus a blokuje fosforylaci serinu 51 eIF2 α stejně efektivně jako HSV-1 34.5 Δ 68-87R a HSV-1 17termAR, tedy kmeny s nedeletovaným genem pro ICP34.5, zatímco virus s deletovaným genem pro celý protein ICP34.5 HSV-1 17termA (označovaný také HSV-1 Δ 34.5) tuto fosforylaci není schopen zablokovat. Z tohoto pozorování plyne, že aminokyseliny 68-87 proteinu ICP34.5 jsou postradatelné pro produktivní virovou replikaci a inhibici eIF2 α fosforylaci a zablokování přerušování hostitelské proteosyntézy. Elektronmikroskopické analýzy primárních sympatických neuronů, které jsou přirozeným cílem viru HSV-1, infikovaných HSV-1 34.5 Δ 68-87, HSV-1 34.5 Δ 68-87R a HSV-1 17termA ukázaly, že nervové buňky infikované HSV-1 34.5 Δ 68-87R vykazují naprosto shodnou úroveň autofagie jako neinfikované neurony, zatímco neurony infikované HSV-1 34.5 Δ 68-87 nebo HSV-1 17termA, vykazují signifikantně vyšší úroveň akumulace autofagozómů (viz obr. 14). Tyto výsledky společně s výsledky v nádorových SK-N-SH buňkách ukazují, že ICP34.5 váže Beclin1 a inhibuje virem vyvolanou autofagii v neuronech a že tato aktivita je nezávislá na roli ICP34.5 v působení proti vypnutí hostitelské proteosyntézy (Orvedahl and Alexander, 2007).

Ačkoli vazba Beclin 1 je důležitá pro podpoření replikace a neurovirulence HSV-1 *in vivo*, studie Alexander et al. (2007) na atg5^{-/-} MEFs nasvědčují tomu, že roli v restrikci replikace HSV-1 může autofagie hrát i méně významnou. Zatímco delece PKR nebo mutace ve fosforylačním místě eIF2 α stačí k obnovení úrovně replikace divokého typu v MEFs infikovaných virem postrádajícím celý gen pro ICP34.5 - HSV-1 17termA (Talloczy et al., 2006), delece genu pro atg5 nezpůsobí významný nárůst replikace HSV-1 17termA v MEFs. To nasvědčuje tomu, že zatímco ICP34.5 inhibuje autofagii *in vitro*, primárním určujícím členem úspěšné replikace HSV-1 *in vitro* je spíše než autofagie ICP34.5-zprostředkovaná regulace zastavení translace.

Alexander a Leib (2008) spekulují, že rozdíly pozorované mezi zřejmými efekty autofagie v omezování replikace HSV-1 *in vivo* a v atg5^{-/-} MEFs mohou být následkem buněčně specifických faktorů nebo rozdílů mezi buněčnými kulturami a *in vivo* prostředím. Tyto rozdíly zdůrazňují potenciální důležitost autofagie v omezování virové replikace v neuronech, což by mohlo vysvětlit, proč je pro některé neurovirulentní viry (jako je např. právě HSV-1) nutné vyhnout se autofagické dráze.



Obr. 14: Snímky z elektronového mikroskopu zobrazující primární neurony infikované označenými viry. NK je negativní kontrola. Šipky označují autofagozomy, které mohou být započítány jako pozitivní. Znárodněná úsečka má rozměr 1 μ m. Převzato z Orvedahl a Alexander et al. (2007)

Neurovirulence HSV-1 Δ 68-87 je plně obnovena u myši s deletovaným genem pro pkr (pkr^{-/-} myš), což nasvědčuje tomu, že PKR leží funkčně před Beclinem 1 v autofagické dráze in vivo (Orvedahl a Alexander et al., 2007). Z toho plyne, že PKR indukce Beclin 1-závislé autofagie je důležitá pro ochranu proti HSV-1 encefalitidě (Orvedahl a Alexander et al., 2007). Potřeba HSV-1-zprostředkované inhibice autofagie v patogenezi virové encefalidity poskytuje přesvědčivý důkaz, že autofagie je jedním z důležitých mechanismů vrozené imunity in vivo. Orvedahl a Alexander et al. (2007) dokázali, že Beclin 1-vazebná a autofagii-inhibující doména je nezbytná pro neurologické choroby.

Autofagie může tedy být účinnou a kritickou antivirovou dráhou v určitých buněčných typech a poskytovat tak hostiteli nespornou výhodu relativně nedestruktivní cesty odstranění

intracelulárních patogenů. Mohlo by to být zvláště důležité právě v orgánech jako je mozek, kde jsou buňky převážně post-mitotické a kde by poškození buněk zánětem nebo cytokinovou bouří mělo nevratné, zničující následky (Alexander a Leib, 2008).

3.2.3 Shrnutí

Neurovirulentní faktor ICP34.5 kódovaný HSV-1 tedy ovládá minimálně dva odlišné mechanismy pro zablokování hostitelské autofagie: blokuje PKR signalizační dráhu, která je nezbytná pro virem vyvolanou autofagii a také působí přímo proti Beclin 1-zprostředkované autofagii (Orvedahl a Alexander et al., 2007). Proč tomu tak asi je?

Ačkoli buňky vyžadují PKR a serin 51-fosforylační místo na eIF2 α k indukci virem vyvolané autofagie (Tallóczy et al., 2002), je možné, že velmi nízké hladiny fosforylovaného eIF2 α stačí ke spuštění autofagie v HSV-1 infikovaných buňkách divokého typu. Pokud je to tak, pak úspěšná inhibice autofagie možná vyžaduje druhý mechanismus, jako je třeba zablokování nějakého autofagického efektoru, který stojí v autofagické dráze až dále. Skutečně bylo prokázáno, že GADD34 doména ICP34.5, která je dostačující k působení proti PKR-dependentnímu translačnímu zastavení, není nutná k zablokování autofagie v savčích buňkách, zatímco Beclin 1 vazebná doména ICP34.5 je nezbytná pro inhibici autofagie. Působení proti PKR signalizaci tedy v nepřítomnosti působení proti funkcím Beclin 1 není dostačující k zablokování hostitelské autofagie (třebaže PKR a fosforylace serinu 51 na eIF2 α jsou vyžadovány pro indukci autofagie). Naprosto přesný mechanismus, kterým ICP34.5 inhibuje Beclin 1-dependentní autofagii, není ještě zcela znám.

4. Závěr

Dnes je již díky řadě studií zřejmé, že autofagie kromě své velmi důležité homeostatické funkce vykonává i jinou velmi důležitou úlohu v životě buňky, a tou je obrana proti intracelulárním parazitům jako jsou některé bakterie a viry. Oddělení a degradace virových částic uvnitř autofagozómu je pro buňku velmi elegantním a nenásilným řešením, jak virus zneškodnit. Nicméně velmi složité signální a regulační dráhy podílející se na autofagii poskytují virům širokou škálu možností, jak tuto mašinerii napadnout a poškodit, či obejít. A většina virů toho beze zbytku využívá a vyvine vlastní mechanismus pro zneškodnění autofagické dráhy. Ani virus HSV-1 není výjimkou – kóduje protein ICP34.5. Schopnost tohoto proteinu zprostředkovat defosforylaci eIF2 α a dovolit pokračování proteosyntézy v přítomnosti aktivované PKR umožňuje HSV-1 úspěšnou replikaci v buňce.

ICP34.5 dokáže také snížit počet autofagozómů a počet virionů uvnitř autofagozómů. Příspěvek této funkce k virové replikaci a patogenezí je pravděpodobně do jisté míry závislý na buněčném prostředí, ve kterém se virus vyskytuje.

Přestože známá fakta o mechanismu autofagie, o rozmanitých genech a drahách, které se podílejí na jejím průběhu a regulaci, o roli autofagie v restrikci replikace virů, o interakcích virových proteinů s autofagickou dráhou se postupně hromadí a propojují, nezodpovězených hádanek zůstává mnoho ve všech těchto oblastech. Velkou, často diskutovanou neznámou stále zůstávají i velmi zásadní otázky jakými jsou původ autofagosomálních membrán, přesné funkce jednotlivých Atg proteinů a další. Pole pro další výzkum je tedy neustále velmi široké a detailnější studie budou se vzrůstajícími znalostmi jistě přibývat velmi rychle.

6. Seznam použité literatury:

- Ahlberg, J., Marzella L., Glauman, H. (1982): Uptake and degradation of proteins by isolated rat liver lysosomes. Suggestion of a microautophagic pathway of proteolysis. *Lab Invest*, 523-532
- Alexander, D. E., Ward, S. L., Mizushima, N., Levine, B., Leib, D. A. (2007): Analysis of the Role of Autophagy in Replication of Herpes Simplex Virus in Cell Culture. *Journal of Virology*, Vol. 81, No. 22: 12128-12134
- Alexander, D. E., Leib, D. A. (2008): Xenophagy in herpes simplex virus replication and pathogenesis. *Autophagy*, 4: 101-103
- Arico, S., Petiot, A., Bauvy, C., Dubbelhuis, P. F., Meijer, A. J., Codogno, P., Ogier-Denis, E. J. (2001): The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *Biol Chem.*, 276(38): 35243-35246
- Arstila, A. U., Trump, B. F. (1968): Studies on cellular autophagocytosis. The formation of autophagic vacuoles in liver after glucagon administration. *Am J Pathol*, 53: 687-733
- Berg, T. O., Fengsrud, M., Stromhaug, P. E., Berg, T., Seglen, P. O. (1998): Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J Biol Chem*, 273: 21883-21892
- Bernard, M. L., Peterson, Y. K., Chung, P., Jourdan, J., Lanier, S. M. (2001): Selective interaction of AGS3 with G-proteins and the influence of AGS3 on the activation state of G-proteins. *J Biol Chem*, 276: 1585-1593.
- Blommaart, E. F., Krause, U., Schellens, J. P., Vreeling-Sindelárová, H., Meijer, A. J. (1997): The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem.*, 243(1-2): 240-246.
- Boehmer, P. E., Lehman, I. R. (1997): Herpes simplex virus DNA replication. *Ann. Rev Biochem*, 66: 347-384.
- Brazil, M. I., Weiss, S., Stockinger, B. (1997): Excessive degradation of intracellular protein in macrophages prevents presentation in the context of major histocompatibility complex class II molecules. *Eur J Immunol*, 27: 1506-1514
- Burch, W., Ellinger, A., Kienzl, H. et al. (1996): Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis*, 17: 1595-1607
- Chou, J., Kern, E. R., Whitley, R. J., Roizman, B. (1990): Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to $\gamma_134.5$, a gene nonessential for growth in cell culture. *Science*, 250: 1262-1266
- Chou, J., Roizman, B. (1994): Herpes simplex virus 1 $\gamma_134.5$ gene function, which blocks the host response to infection, maps in the homologous domain of the genes expressed during growth arrest and DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 5247-5251
- Cocchi, F., Menotti, L., Dubreuil, P., Lopez, M., Campadelli-Fiume, G. (2000): Cell-to-cell spread of wild-type herpes simplex virus type 1, but not of syncytial strains, is mediated by the immunoglobulin-like receptors that mediate virion entry, nectin1 (PRR1/HveC/HlgR) and nectin2 (PRR2/HveB). *J Virol.*, 74: 3909-3917
- Codogno, P., Meijer, A. J. (2005): Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ*, 12: 1509-1518
- Cuervo, A. M., Dice, J. F. (1996): A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*, 273: 501-503
- Costanzo, F., Campadelli-Fiume, G., Foa-Tomasi, L., Cassai, E. (1977): Evidence that herpes simplex virus DNA is transcribed by cellular RNA polymerase B. *J Virol.*, 21: 996-1001

- Decman, V., Freeman, M. L., Kinchington, P. R., Hendricks, R. L. (2005): Immune control of HSV-1 latency. *Viral Immunol.*, 18: 466-473.
- Deretic, V. (2006): Autophagy as an immune defense mechanism. *Current Opinion in Immunology* 18: 375-382
- De Vries, L., Mousli, M., Wurmser, A., Farquhar, M. G. (1995): GAIP, a protein that specifically interacts with the trimeric G protein G alpha i3, is a member of a protein family with a highly conserved core domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92: 11916-11920
- De Vries, L., Fischer, T., Tronchère, H., Brothers, G. M., Strockbine, B., Siderovski, D. P., Farquhar, M. G. (2000): Activator of G protein signaling 3 is a guanine dissociation inhibitor for Galpha i subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97: 14364-14369
- Dörfel, D., Appel, S., Grunebach, F., Weck, M. M., Müller, M. R., Heine, A., Brossart, P. (2005): Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with in vitro-transcribed MUC1 RNA. *Blood*, 105: 3199-3205
- Dunn Jr., W. A. (1994): Autophagy and related mechanisms of lysosomal-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol*, 4: 139-143
- Dunn Jr., W. A. (1990): Studies on the mechanisms of autophagy: Formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol*, 110: 1923-1933
- Dunn Jr., W. A. (1990): Studies on the mechanisms of autophagy: Maturation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol*, 110: 1935-1945
- Eskelinen, E.-L. (2005): Maturation of autophagic vacuoles in mammalian cells. *Autophagy*, 1: 1-10
- Espert, L., Codogno, P., Biard-Piechaczyk, M. (2007): Involvement of autophagy in viral infections: antiviral function and subversion by viruses. *J Mol Med* 85: 811-823
- Feng, Z., Zhang, H., Levine, A. J., Jin, S. (2005): The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102(23):8204-8209
- Furlong, D., Swift, H., Roizman, B. (1972): Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core. *J Virol.*, 10: 1071-1074.
- Galluzzi, L., Vicencio, J. M., Kepp, O., Tasmimir, E., Maiuri, M. C., Kroemer, G. (2008): To Die or Not to Die: That is the Autophagic Question. *Current Molecular Medicine*, 8: 78-91
- Gutierrez, M. G., Munafo, D. B., Beron, W., Colombo, M. I. (2004): Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J Cell Sci*, 117: 2687-2697
- Hamelaar, J., Lelyveld, V. S., Kessler, B. M., Ploegh, H. L. (2003): A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *J Biol Chem*, 278: 51841-51850
- Harrow, S., Papanastassiou, V., Harland, J., Mabbs, R., Petty, R., Fraser, M., Hadley, D., Patterson, J., Brown, S. M., Rampling, R. (2004): HSV1716 injection into brain adjacent to tumour following surgical resection of high-grade glioma: Safety data and long-term survival. *Gene Ther.* 11: 1648-1658
- He, B., Gross, M., Roizman, B. (1997): The γ_1 34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1 α to dephosphorylate α subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 843-848
- Heine, J. W., Honess, R. W., Cassai, E., Roizman, B. (1974): Proteins specified by herpes simplex virus. XII. The virion polypeptides of type 1 strain. *J Virol.*, 14: 640-651.

- Homa, F. L., Brown, J. C. (1997): Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev Med Virol*, 7: 107-122.
- Honess, R. W., Roizman, B. (1974): Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol.*, 14: 8-19
- Inbal, B., Bialik, S., Sabanay, I., Shani, G., Kimchi, A. (2002): DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagy vesicles during programmed cell death. *J Cell Biol*, 157: 455-468
- Jäger, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., Eskelinen, E.-L. (2004): Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci*, 117: 4837-4848
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., Yoshimori, T. (2000): LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J*, 19(21): 5720-5728
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., Yoshimori, T. (2004): LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci*, 117: 2805-2312
- Kelekar, A. (2005): Autophagy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1066: 265-271
- Kieff, E. D., Bachenheimer, S. L., Roizman, B. (1971): Size, composition, and structure of the deoxyribonucleic acid of herpes simplex virus subtypes 1 and 2. *J Virol.*, 8: 125-132
- Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y., Yoshimori, T. (2001): Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep*, 2:330-335
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn Jr., W. A., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., Ohsumi, Y. (2003): A Unified Nomenclature for Yeast Autophagy-Related Genes. *Developmental Cell*, Vol. 5: 539-545
- Klionsky, D. J. (2005): The correct way to monitor autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 1:65
- Klionsky, D. J. (2005): The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cel Sci*, 118: 7-18
- Klionsky, D. J., Meijer, A. J., Codogno, P., Neufeld, T. P., Scott, R. C. (2005): Autophagy and p70S6 kinase. *Autophagy*, 1: 59-61
- Knipe, D. M., Howley, P. M.(2007): *Fields Virology*, 5th Edition. Lippincott Williams and Wilkins
- Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R. J., Kominami, E., Momoi, T. (2007): ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ*, 14(2): 230-9
- Lee, H. K., Iwasaki, A. (2008): Autophagy and antiviral immunity. *Current Opinion in Immunology* 20: 23-29
- Levine, B. (2005): *Eating Oneself and Uninvited Guests: Autophagy-Related Pathways in Cellular Defense*. *Cell*, Vol. 120: 159-162
- Levine, B., Klionsky, D. J. (2004): Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, 6: 463
- Liang, X. H., Yu, J., Brown, K., Levine, B. (2001): Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function. *Cancer Res.*, 61: 3443-3449
- Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B.-H., Jung, J. U. (2006): Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin 1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol*, 8: 688-699

- Leib, D. A., Machalek, M. A., Williams, B. R., Silverman, R. H., Virgin, H. W. (2000): Specific phenotypic restoration of an attenuated virus by knockout of a host resistance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 6097-6101
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., Kroemer, G. (2007): Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8(9):741-52.
- Marino, G., Uria, J. A., Puente, X. S., Quesada, V., Bordallo, J., Lopez-Otin, C. (2003): Human autophagins, a family of cysteine proteinases potentially implicated in cell degradation by autophagy. *J Biol Chem*, 278: 3871-3678
- Massey, AC., Zhang, C., Cuervo, AM. (2006): Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol*, 73: 205-235
- Meijer, A. J., Codogno, P. (2004): Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 36: 2445-2462
- Mills, K. R., Reginato, M., Debnath, J., Queenan, B., Brugge, J. S. (2004): Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 3438-3443
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishihii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M., Ohsumi, Y. (1998): A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395: 395-398
- Mizushima, N., Noda, T., Ohsumi, Y. (1999): Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J.*, 18(14): 3888-3896
- Mizushima, N., Ohsumi, Y., Yoshimori, T. (2002): Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct*, 27:421-429
- Mizushima, N. (2004): Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 36: 2491-2502
- Mizushima, N. (2007): Autophagy: process and function. *Genes&Development*, 21: 2861-2873
- Münz, C. (2006): Autophagy and antigen presentation. *Cellular Microbiology* 8(6): 891-898
- Nimmerjahn, F., Milosevic, S., Behrends, U., Jaffee, E. M., Pardoll, D. M., Bornkamm, G. W., Mautner, J. (2003): Major histocompatibility complex class I-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol*, 33: 1250-1259
- Nobukuni, T., Kozma, S. C., Thomas, G. (2007): hvps34, an ancient player, enters a growing game: mTOR Complex1/S6K1 signaling. *Curr Opin Cell Biol.*, 19(2): 135-141
- Noda, T., Kim, J., Huang, W.-P., Baba, M., Tokunaga, C., Ohsumi, Y., Klionsky, D. J. (2000): Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *J Cell Biol*, 148: 465-480
- Ogier-Denis, E., Couvineau, A., Maoret, J. J., Houri, J. J., Bauvy, C., De Stefanis, D., Isidoro, C., Laburthe, M., Codogno, P. (1995): A heterotrimeric Gi3-protein controls autophagic sequestration in the human colon cancer cell line HT-29. *J Biol Chem.*, 270(1):13-16
- Ogier-Denis, E., Houri, J. J., Bauvy, C., Codogno, P. (1996): Guanine nucleotide exchange on heterotrimeric Gi3 protein controls autophagic sequestration in HT-29 cells. *J Biol Chem*, 271: 28593-28600
- Ogier-Denis, E., Petiot, A., Bauvy, C., Codogno, P. (1997): Control of the expression and activity of the Galpha-interacting protein (GAIP) in human intestinal cells. *J Biol Chem*, 272: 24599-24603
- Ogier-Denis, E., Patingre, S., El Benna, J., Codogno, P. (2000): Erk1/2-dependent phosphorylation of Galpha-interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cells. *J Biol Chem*, 275: 39090-39095

- Orvedahl, A., Alexander, D., Tallozy, Z., Sun, Q., Wey, Y., Zhang, W., Burns, D., Leib, D. A., Levine, B. (2007): HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe*, 1:37-49
- Orvedahl, A., Levine, B. (2008): Autophagy and viral neurovirulence. *Cellular Microbiology* 10(9): 1747-1756
- Paludan, C. (2005): Endogenous MHC Class II Processing of a Viral Nuclear Antigen After Autophagy. *Science* 307: 593-596
- Pasieka, T. J., Baas, T., Carter, V. S., Prohl, S. C., Katze, M. G., Leib, D. A. (2006): Functional genomic analysis of herpes simplex virus type 1 counteraction of the host innate response. *J. Virol.*, 80: 7600-7612
- Pattingre, S., Bauvy, C., Codogno, P. (2003): Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells. *J Biol Chem*, 278: 16667-16674
- Pattingre, S., De Vries, L., Bauvy, C., Chantret, I., Cluzeaud, F., Ogier-Denis, E., Vandewalle, A., Codogno, P. (2003): The G-protein regulator AGS3 controls an early event during macroautophagy in human intestinal HT-29 cells. *J Biol Chem*, 278: 20995-21002
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., Levine, B. (2005): Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122: 927-939
- Pattingre, S., Espert, L., Biard-Piechaczyk, M., Codogno, P. (2008): Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie*, 90: 313-323
- Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, F. C., Meijer, A. J., Codogno, P. (2000): Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 Cells. *J Biol Chem*, 275 (2): 992-998
- Pyo, J. O., Jang, M. H., Kwon Y. K. et al. (2005): Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *J Biol Chem*, 280: 20722-20729
- Ramaiah, K. V., Davies, M. V., Chen, J.-J., Kaufman, R. J. (1994): Expression of mutant eukaryotic initiation factor 2 α subunit (eIF-2 α) reduces inhibition of guanine nucleotide exchange activity of eIF-2B mediated by eIF-2 α phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.*, 14: 4546-4553
- Schmid, D., Münz, C. (2005): Immune surveillance of intracellular pathogens via autophagy. *Cell Death and Differentiation* 12: 1519-1527
- Schmid, D., Dengjel J., Schoor, O., Stevanovic, S., Münz, C. (2006): Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens. *J Mol Med* 84: 194-202
- Shieh, M. T., WuDunn, D., Montgomery, R. I., Esko, J. D., Spear, P. G. (1992): Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol.*, 116: 1273-1281
- Shintani, T., Klionsky, DJ. (2004): Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 306: 990-995
- Sodeik, B., Ebersold, M. W., Helenius, A. (1997): Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol.*, 136: 1007-1021
- Spear, P. G., Roizman, B. (1972): Proteins specified by herpes simplex virus. V. Purification and structural proteins of the herpes virion. *J Virol.*, 9: 143-159
- Stromhaug, P. E., Klionsky, D. J. (2001): Approaching the molecular mechanism of autophagy. *Traffic*, 2: 524-531

- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., Ohsumi, Y. (2001): The pre-autophagosomal structure organized by concerned functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J*, 20: 5971-5981
- Tallóczy, Z., Jiang, W., Virgin, H. W., Leib, D. A., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Eskelinen, E., Levine, B. (2002): Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2 α kinase signaling pathway. *PNAS*, vol. 99, no. 1: 190-195
- Tallóczy, Z., Virgin, H. W., Levine, B. (2006): PKR-Dependent Autophagic Degradation of Herpes Simplex Virus Type 1. *Autophagy* 2:1: 24-29
- Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen E.-L., Hartmann, D., Lüllmann-Rauch, R., et al. (2000): Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*, 406: 902-906
- Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E. (2004): LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.*, 36(12): 2503 – 2518
- Teter, S. A., Eggerton, K. P., Scott, S. V., Kim, J., Fisher, A. M., Klionsky, D. J. (2001): Degradation of lipid vesicles in the yeast vacuole requires function of Cvt17, a putative lipase. *J Biol Chem*, 276: 2083-2087
- Wagner, M. J., Summers, W. C. (1978): Structure of the joint region and the termini of the DNA of herpes simplex virus type 1. *J Virol.*, 27: 374-387
- Wang, C. W., Klionsky, D. J. (2003): The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med*, 9: 65-76
- Ward, S. L., Scheuner, D., Poppers, J., Kaufman, R. J., Mohr, I., Leib, D. A. (2003): In vivo replication of an ICP34.5 second-site suppressor mutant following corneal infection correlates with in vitro regulation of eIF2 α phosphorylation. *J. Virol.*, 77: 4626-4634
- Webber, J. L., Young, A. R., Tooze, S. A. (2007): Atg9 Trafficking in Mammalian Cells. *Autophagy*, 3: 54-56
- Whitley, R. J., Roizman, B. (2001): Herpes simplex virus infections. *Lancet*, 357: 1523-1518
- Williams, B. R. G. (1999): PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene*, 18: 6112-6120
- Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., Tashiro, Y. (1998): Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct*, 23: 33-54
- Yan, Y., Backer, J. M. (2007): Regulation of class III (Vps34) PI3Ks. *Biochem Soc Trans.*, 35(Pt 2): 239-41.
- Yang, Y. P., Liang, Z. Q., Gu, Z. L., Qin, Z. H. (2005): Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol Sin*, 26: 1421-1434
- Yang, Z., Huang, J., Geng, J., Nair, U., Klionsky, D. J. (2006): Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Mol Biol Cell*, 17: 5094-5104
- Yorimitsu, T., Klionsky, D. J. (2005): Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*, 12: 1542-1552
- Young, A. R., Chan, E. Y., Hu, X. W., Köchl, R., Crawshaw, S. G., High, S., Hailey, D. W., Lippincott-Schwartz, J., Tooze, S. A. (2006): Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci.*, 119(Pt 18):3888-3900
- Zeng, X., Overmeyer, J. H., Maltese, W. A. (2006): Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *J Cell Sci*, 119: 259-270
- Zhou, Z. H., Chen, D. H., Jakana, J., He, J., Rixon, F. J., Chiu, W. (1999): Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol*, 73: 3210-3218