

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: BMOBIBO



**Dan Vávra**

Autofágie v imunitním systému

Autophagy in the immune system

Bakalářská práce

Školitel: Doc. RNDr. Jan Černý, Ph.D.

Praha, 2011

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 16. 8. 2011

Podpis

Děkuji Doc. RNDr. Janu Černému Ph.D. za cenné připomínky a rady při vypracování bakalářské práce.

## OBSAH

|   |    |
|---|----|
| Seznam použitých zkratek.....                                 | 5  |
| Abstrakt .....  | 7  |
| 1. Úvod.....  | 8  |
| 2. Autofagie.....   | 9  |
| 2. 1. Historie .....  | 9  |
| 2. 2. Molekulární mechanismy autofagie .....                  | 11 |
| 2.3. Funkce autofagie.....                                    | 14 |
| 2.3.1. Funkční typy autofagie .....                           | 14 |
| 2.3.2. Funkce autofagie v organismu .....                     | 15 |
| 3. Lysozomální a degradační systém buňky.....                 | 16 |
| 3. 1. Proteazóm .....   | 17 |
| 3. 2. Lysozóm .....   | 18 |
| 3. 3. Autofagozóm .....                                       | 19 |
| 4. Autofagie v imunitním systému .....                        | 21 |
| 4. 1. Autofagie v nespecifické/vrozené imunitě .....          | 23 |
| 4. 1. 1. Autofagie v obraně proti bakteriím a parazitům ..... | 23 |
| 4. 1. 2. Autofagie ve virové obraně.....                      | 25 |
| 4. 2. Autofagie ve specifické /adaptivní imunitě .....        | 27 |
| 4. 2. 1. Autofagie a prezentace antigenu .....                | 27 |
| 4. 2. 2. Autofagie a homeostáza T buněk.....                  | 28 |
| 5. Závěr.....   | 29 |
| 6. Seznam použité literatury.....                             | 30 |

## Seznam použitých zkratek

|                                |   |  |
|--------------------------------|---|--|
| <b>APC</b>                     | antigen presenting cell   | buňka prezentující antigen   |
| <b>AVd</b>                     | degradative autophagic vacuole  | degradativní autofagická vakuola   |
| <b>AVi</b>                     | initial autophagic vacuole  | iniciální autofagická vakuola  |
| <b>ATG</b>                     | autophagy-related genes   | geny podílející se na procesu autofagie  |
| <b>Atg</b>                     |   | produkty ATG genu  |
| <b>ATP</b>                     | adenosine triphosphate  | adenosintrifosfát  |
| <b>Bcl-2</b>                   | B-cell lymphoma protein 2   | protein lymfomu B-buněk 2  |
| <b>CMA</b>                     | chaperone-mediated autophagy  | chaperonem zprostředkovaná autofagie   |
| <b>CD</b>                      | cluster of differentiation  |  |
| <b>dsRNA</b>                   | double-stranded RNA   | dvouřetězcová RNA  |
| <b>eIF2<math>\alpha</math></b> | eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$   | eukaryotický iniciační translační faktor 2 $\alpha$  |
| <b>ER</b>                      | endoplasmatic reticulum   | endoplasmatické retikulum  |
| <b>ESCRT</b>                   | endosomal sorting komplex required for transport  |  |
| <b>GABA</b>                    | $\gamma$ -aminobutyric acid   | kyselina $\gamma$ -aminomáselná  |
| <b>GABARAP</b>                 | GABA(A) receptor-associated protein   | protein asociovaný s receptorem pro kyselinu $\gamma$ -aminomáselnou   |
| <b>GATE-16 (GABARAPL2)</b>     | 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 $\gamma$ -aminomáselnou 2, faktor exprese gangliosidu 2, protein příbuzný lehkému řetězci 3 MAP1 |
| <b>GCN</b>                     | general control nonderepressible  |  |
| <b>GTP</b>                     | guanosine triphosphate  | guanosintrifosfát  |
| <b>Hsc</b>                     | heat-shock chaperone  |  |
| <b>ICP34.5</b>                 | infected cell protein 34.5  | virový protein, patří mezi $\gamma$ neboli pozdní genové produkty  |
| <b>IFN</b>                     | interferon  | interferon   |

|                  |  |  |
|------------------|--|--|
| <b>IL</b>        |  | interleukin  |
| <b>LAMP 2a</b>   | lysosomal membrane protein 2a                                | lyzozomální membránový protein 2a  |
| <b>MAP-LC3</b>   | microtubule associated protein 1<br>light chain 3            | lehký řetězec 3 proteinu 1<br>asociovaného s mikrotubuly                               |
| <b>MHC</b>       | major histocompatibility complex                             | hlavní histokompatibilní komplex   |
| –                | class I MHC  | MHC I. třídy   |
| –                | class II MHC   | MHC II. třídy  |
| <b>PAMP</b>      | patogen-associated molecular patterns                        |  |
| <b>PE</b>        | phosphatidyl-ethanolamin                                     | fosfatidylethanolamin  |
| <b>PI3K</b>      | phosphatidylinositol 3-kinase                                | fosfatidylinositol 3-kináza  |
| –                | class I PI3K   | fosfatidylinositol 3-kináza třídy I  |
| –                | class III PI3K   | fosfatidylinositol 3-kináza třídy III  |
| <b>PKB (Akt)</b> | protein kinase B   | proteinkináza B  |
| <b>PKD 1</b>     | protein kinase D 1   | proteinkináze D 1  |
| <b>PKR</b>       | double-stranded RNA-dependent<br>protein kinase R            | proteinkináza R závislá na<br>dvojřetězcové RNA  |
| <b>PtdIns3P</b>  | phosphatidylinositol-3-phosphate                             | fosfatidylinositol-3-fosfát  |
| <b>PTEN</b>      | phosphatase and tensin homologue                             | fosfatáza a napětový homolog   |
| <b>RNAi</b>      |  | RNA-interference   |
| <b>SNARE</b>     | soluble NSF-attachment protein (SNAP) receptor               |  |
| <b>NSF</b>       | N-ethylmaleimide-sensitive<br>fusion protein                 |  |
| <b>Th</b>        | T helper lymphocyte  | T lymfocyty (pomocné)  |
| <b>TLR</b>       | Toll-like receptor   |  |
| <b>TNF</b>       | tumor necrosis factor  | faktor nekrotizující nádory  |
| <b>TOR</b>       | target of rapamycin  | proteinkináza, která je cílem<br>inhibitoru rapamycinu                                 |
| <b>mTOR</b>      | mammalian TOR  | savčí TOR  |
| <b>UPS</b>       | ubiquitin- proteasome system                                 | ubikvitin- proteazómový systém   |
| <b>UVRAG</b>     | UV irradiation resistanceassociated<br>gene                  | gen sdružený s resistencí k UV<br>záření   |
| <b>Vps</b>       | vacuolar protein sorting factor,<br>vacuolar protein-sorting | faktor podílející se na třídění<br>proteinu ve vakuole, třídění<br>proteinu ve vakuole |

## **Abstrakt**

Autofagie je základní homeostatický proces – jeden ze základních mechanismů přežití v nepříznivých podmínkách. Autofagie chrání buňky různými způsoby: buňky jsou schopné rozložit své vlastní komponenty, recyklovat živiny, přetvářet se a zbavovat nežádoucích cytoplazmatických složek (a to vše zvláště nejen za podmínek nedostatku výživy). Přísně regulované autofagické procesy se podílejí na degradaci proteinů s dlouhou životností a celých organel, paradoxně však v některých případech tyto funkce významné pro přežití mohou být i škodlivé. Autofagie hraje důležitou roli při vývoji i potlačení nádoru, v imunitě a je nezbytná pro adaptaci na různé stresy z prostředí jako např. hladovění. Nedávné studie dokazují, že role autofagie je klíčová v imunologické kontrole bakteriálních, parazitárních a virových infekcí. Proces autofágie může degradovat intracelulární patogeny. Tato práce popisuje mechanismus autofagie a zaměřuje se na roli autofagie ve vrozené a adaptivní imunitě, shrnuje některé nové poznatky v pochopení funkce autofagie a její možnou roli v příčinách a prevenci chorob.

## **Abstract**

Autophagy is an essential, homeostatic process – survival mechanism that protects cells by various ways: cells break down their own components to recycle nutrients, remodel and dispose unwanted cytoplasmic constituents. Autophagy is involved in the degradation of long-lived proteins and entire organelles, but paradoxically, considering important prosurvival functions, autophagy may be deleterious. It plays an important role during development, tumor suppression, immunity and is required for the adaptation to environmental stresses such as starvation. Recent studies indicate, that autophagy is a central player in the immunological control of bacterial, parasitic and viral infections. The process of autophagy may degrade intracellular pathogens. This work describes the mechanism of autophagy and highlights the role of autophagy in innate and adaptive immunity, summarizes some advances in understanding the functions of autophagy and its possible roles in the causation and prevention of human diseases.

**Klíčová slova:** Autofagie, autofagozóm, Atg, PI3K, degradace, imunita

**Keywords:** Autophagy, autophagosome, Atg, PI3K, degradation, immunity

## 1. Úvod

Autofagie je důležitý buněčný proces, jediný známý mechanismus, který eukaryotní buňky využívají k odstranění intracelulárních organel a proteinových agregátů, které jsou příliš velké, než aby byly odstraněny proteazómy. Podílí se spolu s ubikvitin-proteazómovým systémem (UPS) na udržování stálosti vnitřního prostředí buňky, tedy na vyrovnané bilanci proteinů, která je závislá na jejich syntéze a degradaci. Porušením této rovnováhy dochází k patologiím jako je rakovina, neurodegenerace apod. (Shintani a Klionsky, 2004). UPS je odpovědný za rychlou degradaci proteinů zvláště při nutnosti rychlé adaptace. Tato rychlost dovoluje buňkám přísnou kontrolu nad koncentrací proteinů.

Autofagie je nezbytná pro degradaci dlouho žijících proteinů a celých organel. Není překvapující, že tento mechanismus – modifikovaně využívaná lysozomální degradační cesta je použita i k odstraňování intracelulárních patogenů jako jsou např. viry a bakterie. Mutace genů regulujících autofagické procesy zvyšuje citlivost k infekci intracelulárními patogeny v hostitelských organismech. Autofagie hraje důležitou roli při potlačení růstu nádorů, v imunitě, tkáňové homeostáze a je vyžadována pro adaptaci na stresy prostředí jako je hladovění. Účastní se i dalších biologických procesů jako je vývoj, diferenciací a remodelace tkání (Levine a Klionsky, 2004).

V posledních letech byl učiněn velký pokrok v porozumění molekulárním mechanismům autofagie a jejímu vlivu na dynamiku buněčných organel, regulaci buněčné smrti, prevenci stárnutí a na neurodegenerativní nemoci. Zajímavý je vztah mezi autofagií a UPS. Ubikvitin značí proteiny pro degradaci pomocí proteazómů, ale v poslední době se zdá, že by také mohl sloužit jako rozpoznávací signál pro eliminaci určitých organel a patogenů při autofagii.

Naše nástroje pro boj s intracelulárními patogeny zahrnují více aspektů vrozené a adaptivní imunity. V posledních několika desetiletích jsme byli svědky rozvoje v pochopení základních mechanismů: prezentace antigenu, imunitního rozpoznání nakažených buněk, buněčného vnímání patogenů a signálních drah, které navozují antimikrobiální stavy v infikovaných buňkách.



Jedna z největších výzev, kterým imunitní systém čelí v souvislosti s intracelulárními patogeny, je problém, jak se zbavit mikroorganismů bez likvidace celé infikované buňky (jak uzdravit nakaženou buňku). Jednoduchá a elegantní strategie pro řešení tohoto problému je nasnadě - řada buněk je schopná využívat evolučně konzervovanou lysozomální degradační cestu napojenou na autofagii pro selektivní likvidaci intracelulárních patogenů (Deretic a Levine, 2009). V posledních letech výzkum odhalil, že autofagie může sloužit k ochraně mnohobuněčných organismů nejen proti hrozbám infekce, ale i proti hrozbě autoimunitních poruch (Levine, 2007).

Ze všech výše zmíněných rolí se ve své práci zaměřím po popisu základních mechanismů na roli autofagie v imunitním systému.

## **2. Autofagie**

### **2. 1. Historie**

Evolučně je autofagie velmi stará, má tedy velký význam pro nižší i vyšší organismy.

Autofágie je odvozena z řeckých slov: *auto*, což znamená "já", a *phagy*, "jíst".

Poprvé byla popsána před více než 50 lety, přesto ale ve spojení s ní stále zůstává mnoho otázek, které bude třeba objasnit. Role autofagie při patologických stavech není zcela jasná, ale je jasné, že může pomoci zabránit nebo zastavit průběh některých chorob, jako jsou některé druhy neurodegenerace a rakoviny, může hrát ochrannou roli proti infekci intracelulárními patogeny, ale v některých situacích může přispět k rozvoji nemoci.

Výzkum a objev autofágie je úzce spjat s elektronovou mikroskopií. Po dlouhou dobu se jednalo o vlastně jediný způsob, jak spolehlivě detekovat autofagické složky v buňkách, protože nebyly známy žádné zvláštní proteinové markery. V 70. letech biochemické metody umožnily studie autofagických lysozomálních degradací a od 80. let máme k dispozici sofistikované biochemické metody pro charakterizaci autofagie jako takové. V 90. letech přebírá hlavní roli ve výzkumu autofagie fluorescenční mikroskopie spolu s biochemickými a genetickými metodami. Ačkoli autofagie byla známa po desetiletí, až v r. 1993 byly

identifikovány její molekulární komponenty průkopnickou genetickou studií využívající buněk *Saccharomyces cerevisiae*. Od té doby bylo nalezeno mnoho proteinů vztahujících se k průběhu a regulaci autofagie v eukaryotních buňkách. Doposud však molekulárním mechanismům autofagie nebylo plně porozuměno.

### **Historie výzkumu autofagie**

- 1955** objev lysozómů
- 1963** pojem autofagie
- 1967** glukagon indukuje autofagii
- 1973** selektivní degradace buněčných organel
- 1975** protein ubikvitin
- 1977** autofagie jako mechanismus buněčné smrti, aminokyseliny inhibují autofagii
- 1982** první biochemické analýzy autofagie, 3-metyladenin jako inhibitor autofagie
- 1988** popis amfizómů, struktur společných autofagii a endocytóze
- 1992** popis morfologických změn kvasinek během autofagie
- 1993** první kvasinky s mutantními autofagickými geny
- 1995** stimulační role rapamycinu na autofagii
- 1997** stimulační role PI3K a první klonované geny ATG1, popis dalších ATG genů u kvasinek
- 1998** první savčí ATG geny
- 1999** Beclin 1 jako interakční protein s Bcl-2 a potenciální nádorový supresor
- 2000** první metodiky pro sledování autofagie u vyšších eukaryot
- 2002** protektivní role autofagie u Huntingtonovy nemoci

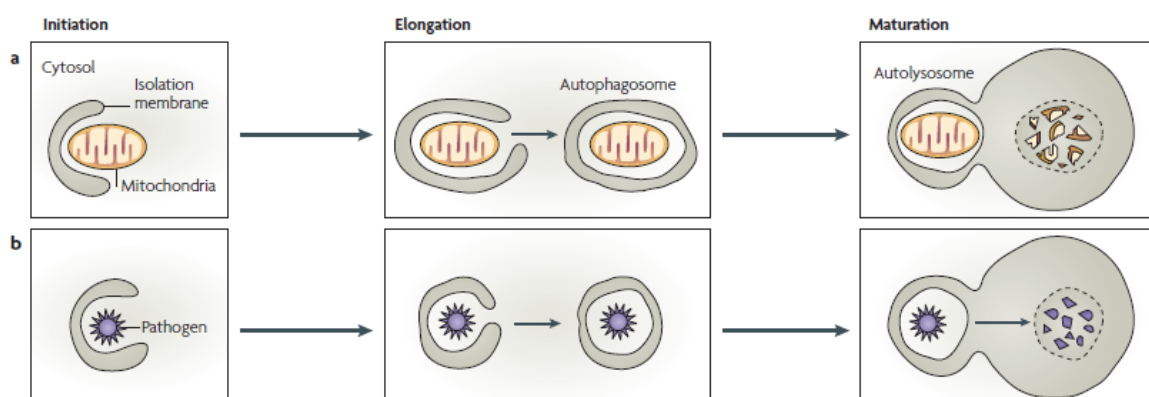
- 2003** potlačení autofagie přispívá k tumorigenezi a význam autofagie v procesech stárnutí
- 2004** význam autofagie v embryonálním vývoji, imunitních pochodech, buněčné smrti, je popsána krystalová struktura autofagických proteinů, formace autofagozómů (fluorescenčně značené proteiny)
- 2006** význam bazální autofagie v prevenci neurodegenerativních onemocnění
- 2010** původ membrány fagoforu (mitochondrie – vnější membrána, s přispěním ER)

V posledních letech výzkum v řadě laboratoří odhalil, že autofagie může sloužit k ochraně mnohobuněčných organismů nejen proti hrozbám infekce, ale i proti hrozbě autoimunitních onemocnění. Výzkum toho, jak se autofagie účastní známých imunitních procesů a objevování jiných, dosud neidentifikovaných imunitních funkcí je dnes jedním z významných témat imunologie.

## 2. 2. Molekulární mechanismy autofagie

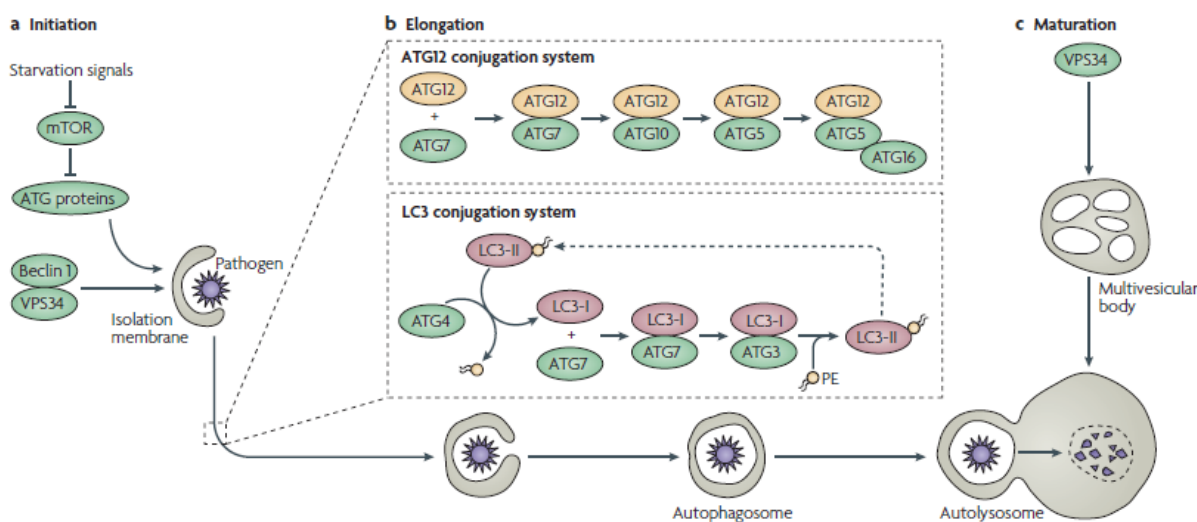
Molekulární události během autofagie (jak vlastních komponentů, tak intracelulárních patogenů) lze rozdělit na tři základní stupně:

- **iniciace** (formování fagoforu – izolační membrány)
- **elongace** (formace autofagozómu, růst a jeho ukončení)
- **zrání** (vznik autolysozómu a rozklad)



Obr. 1 **Fáze autofagie.** **a)** Odstranění buněčných složek z cytosolu. **b)** Autofagie může eliminovat stejným způsobem intracelulární patogeny. Převzato z Levine a Deretic (2007).

Molekulární mechanismus autofagie je regulován Atg proteiny (autophagy-related proteins). V nepřítomnosti aminokyselin, ATP nebo jako odpověď na další stimuly, Atg1 a komplex PI3K třídy III (fosfatidylinositol 3- kinaza)/VPS34 a Beclin 1 vede k aktivaci navazujících Atg faktorů, které jsou zapojené do a) zahájení b) elongace c) zrání autofagie (Obr. 2).



Obr. 2 **Molekulární mechanismy**. Regulace Atg proteiny. Převzato z Levine a Deretic (2007).

**Fáze iniciace** – Autofágie může být iniciována různými druhy buněčného stresu (infekce, hladovění). Savčí rapamycinem inhibovatelná serin/treoninová kináza mTOR je senzitivní ke změnám nutričních podmínek. mTOR autofagii inhibuje, jiné proteiny mají pozitivní či negativní vliv na mTOR a tak zprostředkovane působí na autofagii. Fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát a fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (produkty PI3K tř. I) se váží k PKD1 (fosfoinositid-dependentní aktivátor PKB) a k PKB. PKB a PKD1 inhibují autofagii aktivací mTOR. PTEN (napětový homolog) defosforuluje fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (potlačení PI3K tř. I signálu) a iniciuje autofagický proces, stejně jako rapamycin, inhibitor mTOR. mTOR v dráze signálních efektorů ovlivňuje transkripci i translaci a působí také na Atg proteiny, čímž je inhibována formace autofagozómů. Aminokyseliny autofagii neznámým způsobem inhibují.

Během iniciace a v počátcích formace autofagozómu je důležitý protein Beclin 1, který je v savčích buňkách jednou z komponent komplexu fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K) třídy III

(savčí homolog kvasinkového Vps34), jímž produkovaný PtdIns3P je důležitý pro seskupení Atg proteinů na fagoforu. V podmínkách bohatých na aminokyseliny PI3K třídy III přispívá k aktivaci mTOR (mammalian target of rapamycin), inhibici Atg1 a autofagie. PI3K třídy III fosforyluje fosfatidylinositol na PtdIns3P, který podporuje seskupení proteinů Atg4, Atg7, Atg10, nutné pro další tvorbu autofagozómu. Bcl-2 je při interakci s Beclinem 1 inhibitorem iniciace autofagie. Komplex PI3K třídy III může být aktivován Beclin-1-interagujícími partnery AMBRA1 (activating molecule in Beclin-1-regulated autophagy), UVERAG (UV irradiation resistance-associated gene).

Zdroje membrány pro zahájení tvorby autofagozómu a elongační fázi mohou zahrnovat ty, které obsahují jediný známý integrální membránový Atg protein Atg9, který je přerozdělen na zbylá místa v autofagozómech za pomoci Atg1 a PI3K. Přerozdělování Atg9 může záviset na Atg18, který váže fosfatidylinositol-3-fosfát (PtdIns3P).

eIF2 $\alpha$  kinázy jsou dalšími významnými regulátory autofágie. Fosforylují Ser-51 eIF2 $\alpha$  (eukaryotický iniciační transkripční faktor 2 $\alpha$ ) a hrají tak zásadní roli ve stresem vyvolaném zastavení translace. Je uznávanou hypotézou, že stres spolu se zastavením translace závislým na eIF2 $\alpha$  kinázách rovněž iniciuje i na nich závislou autofágii. GCN2 (kvasinková eIF2 $\alpha$ ) a GCN4 (eIF2 $\alpha$ -regulovaný transkripční transaktivátor) mají zásadní význam při hladověním vyvolané autofágii.

**Fáze elongace** – elongace a tvar autofagozómu jsou řízeny dvěma na sobě závislými konjugačními systémy Atg12/Atg5 a Atg8 (kvasinkový homolog savčího LC3)/PE (fosfatidylethanolamin), které jsou podobné ubikvitinačním systémům (podrobněji viz kapitola 3. 3.).

**Fáze zrání** - Vnější membrána autofagozómu splyne s membránou endozómu či lysozómu, vnitřní membránou ohraničený obsah pronikne do lumen endozómu/lysozómu; v lysozómu je štěpen přítomnými hydrolázami, přičemž produkty štěpení se uvolňují do cytoplazmy. Fúzí autofagozómu s endozómem vznikne amfizóm a fúzí autofagozómu či amfizómu s lysozómem vznikne autolysozóm (autofagolysozóm). Pokud je obtížné rozhodnout, zda autofagozóm splynul s endozómem či lysozómem, byl zaveden termín autofagická vakuola. Rozlišujeme autofagické vakuoly iniciální (AVi, čerstvěji vzniklé) a degradativní (AVd, již

započíná rozklad). AVd obsahuje velké množství lysozomálních proteinů. Membránovou fúzi (přichycení, zakotvení, fúze dvojvrstev) umožňuje seskupení párů proteinů SNARE (na každé ze splývajících membrán) a specifitu zaručují GTPázy rodiny Rab. Rab7 je zvláště důležitá pro dokončení pozdních autofagických vakuol. V-ATPázy provedou důležitou acidifikaci lumen autofagické vakuoly ještě před splynutím. Degradaci v autolysozómu provedou hydrolázy a u kvasinek ještě lipáza Atg15.

## 2.3. Funkce autofagie

### 2.3.1. Funkční typy autofagie

Existuje několik morfologicky a funkčně odlišných forem autofagie, které se liší hlavně způsobem dopravy cytoplazmatického materiálu do lysozómu.

**Makroautofagie** – většinou je označována obecně jako **autofagie** (ta je předmětem této práce). Jedná se o relativně neselektivní proces degradace proteinů, organel a patogenů. Je zprostředkována buněčnými organelami – autofagozomy (charakteristická dvojmembránová vakuola). Následnou fúzí s lysozomy vznikají autolysozomy (autofagolysozomy), kde probíhá hydrolýza bílkovin jejichž produkty mohou být recyklovány.

**Mikroautofagie** – jedná se o degradaci především solubilních cytoplazmatických proteinů, části cytoplazmy jsou likvidovány vchlípením lysozomální membrány.

**Chaperonem zprostředkovaná autofagie** (pouze vyšší eukaryota) – CMA (chaperone mediated autophagy) je selektivní formou intralysozomální degradace specifické skupiny cytosolických proteinů obsahujících KFERQ aminokyselinový motiv, který je nezbytný pro specifickou vazbu na chaperon. Pokud takový cytosolický protein získá konformačně nestabilní formu, může být rozpoznán chaperonovým proteinem Hsc70 a prostřednictvím lysozomálního membránového proteinu 2a (LAMP2a) translokován do lumen lysozómu, kde je degradován (Cuervo a Dice, 1996). CMA je také aktivovatelná stresovými podmínkami, jako jsou hladovění, oxidační stres nebo expozice toxickým látkám.

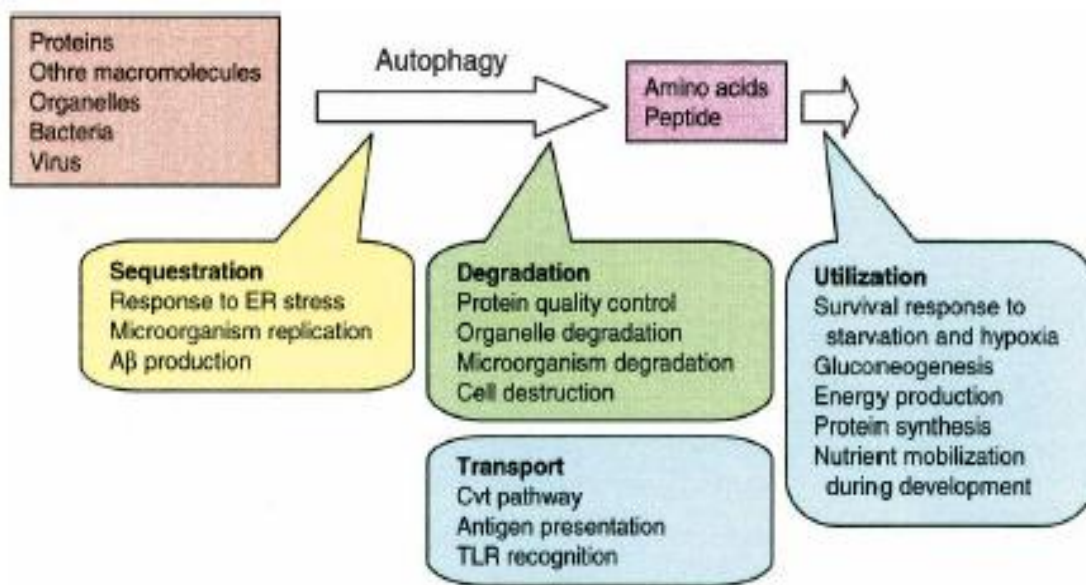
Někdy se podle různých kritérií vyčleňují další typy např.: Xenofagie – jedná se o selektivní odbourávání mikroorganismů (např. bakterie, plísňe, paraziti a viry).

### 2.3.2. Funkce autofagie v organismu

Nedávný vývoj ukázal, že autofagie hraje velmi důležitou roli ve fyziologických a patofyziologických procesech.

- a) **Adaptivní funkce** u eukaryotických organismů – je využita při buněčném hladovění, autofagie funguje pro zachování funkčnosti buněčné bioenergetiky tím, že poskytuje metabolické substráty (získané degradací části cytoplazmy (organel), např. aminokyseliny), které udržují makromolekulární syntézu a produkci ATP. Podílí se na regulaci embryonálního a novorozeneckého vývoje.
- b) **Ochranná funkce** proti různým patologiím – má schopnost provádět „běžný úklid“ a odstranit toxické nebo poškozené cytoplazmatické složky. Tento proces může být více selektivní než autofagie vyvolaná hladověním buňky. Tato funkce autofagie přispívá k ochraně proti neurodegenerativním onemocněním (Parkinsonova nemoc, Huntingtonova nemoc, apod.), kde hraje významnou roli nahromadění poškozených či toxických proteinů. Autofagie má bazální roli v prevenci abnormální akumulace ubiquitinyvaných proteinových agregátů a degraduje specificky toxické agregativní mutantní polyglutamin-proteiny.
- c) **Anti-ageing (protistárnoucí) účinky a tumor supresivní účinky** – jsou spojeny s degradací poškozených mitochondrií a dalších organel, tím, že pomáhají redukovat genotoxický stres a slouží jako prevence poškození DNA a genomické instability. Indukce autofagie může brzdit růst raných stádií některých nádorů, růst rozvinutých tumorů může naopak podporovat (ani toto však nemá všeobecnou platnost).
- d) **Ochrana proti intracelulárním patogenům** (bakterie, viry) – současně s čištěním endogenních celulárních složek, autofagie odstraňuje intracelulární patogeny, a tím chrání proti nemocem způsobeným intracelulárními patogeny (viz kapitola 4.).
- e) **Ovlivnění imunitního systému** – autofagie může selektivně dodávat mikrobiální genetický materiál a antigeny pro vrozený i adaptivní imunitní systém (viz kapitola 4.).

Autofagie – intracelulární degradační systém se skládá z několika kroků: sekvestrace, transport do lysozómů a degradace, využití degradovaných produktů. Každý krok umožňuje vykonávat jinou funkci (Mizushima, 2007).



Obr. 3 **Funkce autofagie.** Převzato z Mizushima (2007).

### 3. Lysozomální a degradační systém buňky

Dva hlavní způsoby degradace proteinů v buňce:

- **proteazóm** - multiproteinový komplex (degradace proteinů s krátkou životností), působící v rámci UPS (ubikvitin-proteazómový komplex)
- autofagie (degradace proteinů s dlouhou životností) zprostředkovaná **autofagozómy** - organelami, které zachycují buněčné komponenty a transportují je do **lysozómu** k rozkladu



### 3. 1. Proteazóm

Proteazóm (tvořící přibližně 1% všech buněčných proteinů) je v cytosolu umístěný rozsáhlý proteinový komplex s proteolytickou aktivitou, zodpovědný za degradaci proteinů k destrukci určených označením ubikvitinací nebo některými jinými způsoby. Je to hojně se vyskytující kompartmentalizovaná ATP-dependentní proteáza s aktivními místy s rozdílnou substrátovou specifitou. Nejvíce proteazómů se nachází v cytoplazmě, jejich přenos do jádra je pomalý, z jádra zpět neprobíhá vůbec (během mitózy se však obě oddělené populace mohou promísit) (Reits et al., 1997). Degraduje aberantní (špatně sbalené či sestavené) proteiny (individuální proteiny, nadbytečné proteiny tvořící části vícepodjednotkového proteinu nebo komplexu proteinů, proteiny ER) a hlavně proteiny s krátkým poločasem (cca 90% štěpených proteinů).

V důsledku mutací a chyb v transkripci, sestřihu pre-mRNA nebo translaci, některé proteiny nikdy nenabydou správné konformace, jedná se o asi 30% všech nativních proteinů (Schubert et al., 2000). Pro buňku je mimořádně důležité se těchto potenciálně škodlivých proteinů zbavit (jejich degradace probíhá buď ihned během translace nebo krátce po ní). Jsou rozpoznány a opatřeny řetězcem ubikvitinu - „adresou“ pro degradaci v proteazómu nebo špatně uspořádaná místa ve struktuře již přímo slouží jako signál pro proteazóm (asi 20% štěpených proteinů). Chybně poskládané a agregované nenativní proteiny jsou v cytosolu vychytávané kompartmenty JUNQ (juxta-nuklear quality kontrol), IPOD (insoluble protein deposit) a rovněž končí v proteazómech. U defektních proteinů syntetizovaných v endoplazmatickém retikulu (ER) se většinou jedná o chybu poskládání terciárních struktur. Proteazómy v tomto případě spolupracují s ER v procesu ERAD (ER-associated degradation). Protein je označen glykanovým kódem, transportován přes membránu ER a v cytoplazmě degradován přílehlými proteazómy.

Označení pro degradaci v ubikvitin-dependentní proteolytické dráze je ve formě řetězce ubikvitinů. Molekula ubikvitinu se skládá ze 76 aminokyselin. Ubikvitin je aktivován enzymem E1 a předán ubikvitin-konjugujícímu enzymu E2. Ubikvitin-ligáza E3 (rozpozná proteiny k degradaci) ho připojí C-koncem k Lys daného proteinu nebo k předchozí molekule vznikajícího ubikvitinového řetězce.

Tělo proteazómu (běžný 26S) tvoří centrální část tvaru válce (cylindr, 20S, core) a dva postranní cap (čepičkové) regulační proteinové komplexy (19S). Dutý centrální cylindr obsahuje proteolytický aparát (proteázy), zodpovědný za degradaci proteinů (20S drží celý substrát vázán tak dlouho, dokud není kompletně konvertován na krátké peptidy). Tělo proteazómu je složeno z mnohočetných proteinových podjednotek naskládaných na sebe ve čtyřech heptamerních prstencích (dva vnější z  $\alpha$  a vnitřní z  $\beta$  podjednotek). Některé z podjednotek jsou proteázy ( $\beta 1$  s aktivitou podobnou kaspázám,  $\beta 2$  s aktivitou podobnou trypsinu,  $\beta 5$  s aktivitou podobnou chymotrypsinu) a jejichž aktivní místa směřují do vnitřní dutiny 20S proteazómu. Toto uspořádání brání vysoce aktivním enzymům, aby nekontrolovaně štěpily buněčné komponenty. Postranní cap komplexy obsahují prsteneček ze šesti podjednotek a dělí se na dvě základní, navzájem spojené části: bázi a víko. V bázi se nachází šest rozdílných AAA+ATPáz a čtyři další podjednotky. Báze reguluje vstup substrátů do nitra 20S proteazómu. Víko obsahuje 9 podjednotek a jeho hlavní funkcí je deubikvitinace ubikvitinovaných proteinů. 19S proteazómy selektují proteiny pro degradaci (rozpoznání substrátu a regulace), které jsou prstencem za spotřeby ATP provlékány (během čehož dochází k jejich rozbalování a tím odhalování některých předtím skrytých částí) do centrální dutiny 20S části kde probíhá štěpení.

### 3. 2. Lysozóm

Lysozomy jsou membránou obalené buněčné kompartmenty naplněné solubilními hydrolytickými enzymy zodpovědnými za intracelulární trávení makromolekul přijatých endocytózou nebo opotřebovaných vlastních částí buňky (přijatých autofagií nebo vchlípením lysozomální membrány pomocí ESCRT komplexu). V lysozómech se nachází okolo 40 typů hydrolytických enzymů (kyselého typu), mezi něž patří např. proteázy, nukleázy, glykosidázy, lipázy, fosfolipázy, fosfatázy, sulfatázy. Pro optimální fungování musí být vesměs aktivovány naštěpením proteázou z neaktivního pro-enzymu a vyžadují kyselé prostředí, které lysozóm zajišťuje udržováním vnitřního pH v rozmezí 4,5 – 5,0. Komponenty cytosolu jsou tedy dvojnásobně chráněné před útokem vlastního buněčného trávicího systému: trávicí enzymy jsou membránou oddělené od cytoplazmy, ale i kdyby se nějak dostaly ven, nebudou příliš aktivní při cytosolickém pH okolo 7,2.

Jako všechny ostatní intracelulární orgány, lysozomy neobsahují pouze unikátní soubor enzymů, ale také unikátní vnější membránu. Většina lysozomálních membránových proteinů je např. neobvykle silně glykosylovaná, což je chrání před účinkem lumenálních proteáz. Transportní proteiny v lysozomální membráně přenášejí finální produkty trávení makromolekul (aminokyseliny, sacharidy, nukleotidy) do cytosolu, kde mohou být použity znovu nebo vyloučeny z buňky.

H<sup>+</sup> ATPáza v lysozomální membráně za spotřeby energie hydrolýzy ATP přenáší H<sup>+</sup> ionty do lumen lysozomu a udržuje v něm tak kyselé pH. Tato ATPáza patří do rodiny V-ATPáz a má rovněž podobnou stavbu jako F-ATPázy mitochondrií a chloroplastů využívající energii H<sup>+</sup> gradientu k syntéze ATP. Na rozdíl od nich však lysozomální ATPáza pracuje obráceně, pumpuje H<sup>+</sup> do organely. Kromě toho, že udržování prostředí s nízkým pH je důležité pro reakce probíhající uvnitř lysozomu, gradient H<sup>+</sup> představuje zdroj energie pro transport malých molekul přes membránu do cytosolu.

Vývoj lysozomu zahrnuje ranný endozóm, pozdní endozóm (obsahuje membránový materiál získaný endocytózou z plazmatické membrány, nově syntetizované hydrolázy a je tedy již podobnost s hotovým lysozómem), fúzí pozdního endozómu s již existujícím lysozómem vzniklý endolysozóm (který může splývat s dalším a dalším). Když je většina endocytovaného materiálu v endolysozómu strávena a pouze rezistentní a těžko stravitelné zbytky zůstanou, organela se stává lysozómem, který může opět vstoupit do cyklu a splýnout s pozdním endozómem, endolysozómem, ale také amfizómem či autofagozómem (viz kapitola 2. 2.)

### **3. 3. Autofagozóm**

Poté, co membránová cisterna obklopí část cytoplazmy nebo organelu, vznikne váček ohraničený dvěma membránami – autofagozóm.

U kvasinek je znám výskyt pre-autofagozomální struktury (PAS). Autofagozóm, který neobsahuje žádné lysozomální proteiny, je tvořen izolační membránou (fagoforem), jejíž materiál pochází zřejmě převážně z vnější mitochondriální membrány (Lippincott-Schwartz, 2010) a z části ER (McEwan & Dikic, 2010).

Při tvorbě autofagozómu se uplatňují Atg proteiny (produkty ATG = autophagy-related genes). Na počátku vzniku autofagozómu komplex Beclin I/PI3K tř. III produkuje fosfatidylinositol-3-fosfát, důležitý pro seskupení Atg proteinů na fagoforu. Atg jsou důležité jako součást dvou konjugačních systémů, jejichž fungování lze připodobnit k procesu ubikvitinace (E1 enzym aktivace, E2 enzym konjugace, ligáza E3). Atg7 jako E1, Atg10 nebo Atg3 jako E2, enzym s funkcí ligázy E3 není zatím znám. Atg7 za spotřeby ATP aktivuje Atg12 a postoupí ho Atg10. Potom vznikne konjugát Atg12/Atg5, v němž je Atg12 svým C-koncovým glycinem kovalentně vázán k aminoskupině určitého lysinu na Atg5. Makromolekulární komplex Atg12/Atg5 – Atg16L vzniklý nekovalentní interakcí konjugátu Atg12/Atg5 s Atg16L (u savců, kvasinky Atg16) asociuje s rostoucí vnější izolační membránou, kterou však opustí dříve, než dojde k ukončení vývoje autofagozómu.

Atg4 lyzuje protein Atg8 (u kvasinek, savci homolog MAP-LC3), jež je následně aktivován enzymem Atg7 a posléze postoupen enzymu Atg3. Kovalentní vazbou Atg8 k PE (fosfatidylethanolamin) vznikne konjugát Atg8/PE, přítomen na lumenálním i vnějším povrchu autofagozómu, pro jehož dokončení je tento konjugát velmi důležitý.

Atg12/Atg5 – Atg16 je potřebný pro vytvoření Atg8/PE a oba konjugační systémy jsou propojeny. Konjugace Atg12 a Atg5 je usnadněna výskytem velkého množství Atg3. Velké množství Atg10 podporuje tvorbu MAP-LC3, přílišná koncentrace Atg12/Atg5 ji naopak inhibuje.

LC3-I savců je solubilní forma, po rozštěpení pomocí Atg4 (odhalení C-koncového glycinu) a navázání PE vznikne LC3-II. Z vnějšího povrchu hotového autofagozómu je vlivem Atg4 protein LC3 odštěpen a je poté recyklován. Degradace LC3 na lumenálním povrchu proběhne až po splnutí s lysozómem. Fluorescenčně nebo zlatem značený LC3 bývá využíván ke sledování vývoje autofagozómu a jeho hustota v pozdních autofagických vakuolách značně klesá. Kromě LC3 také GATE-16 a GABARAP jsou savčími homology Atg8.

hAtg4B patří mezi autofaginy (savčí homology Atg4) a štěpí Atg8 i jeho savčí homology. U kvasinek je ještě nezbytný Atg9 pro tvorbu PAS. Probíhá zde formace komplexu za pomoci

Atg9 a Atg2. Savčí mAtg9 vykazuje pohyb mezi Golgiho aparátem a endozómy. Transport Atg proteinů k a od izolační membrány je nejspíše regulován Atg1.

#### 4. Autofagie v imunitním systému

Dvě základní zbraně imunitního systému – nespecifická/vrozená imunita a adaptivní /specifická imunita – mají odlišné role, existuje však souhra mezi těmito systémy (komponenty vrozeného imunitního systému ovlivňují adaptivní imunitní systém a naopak).

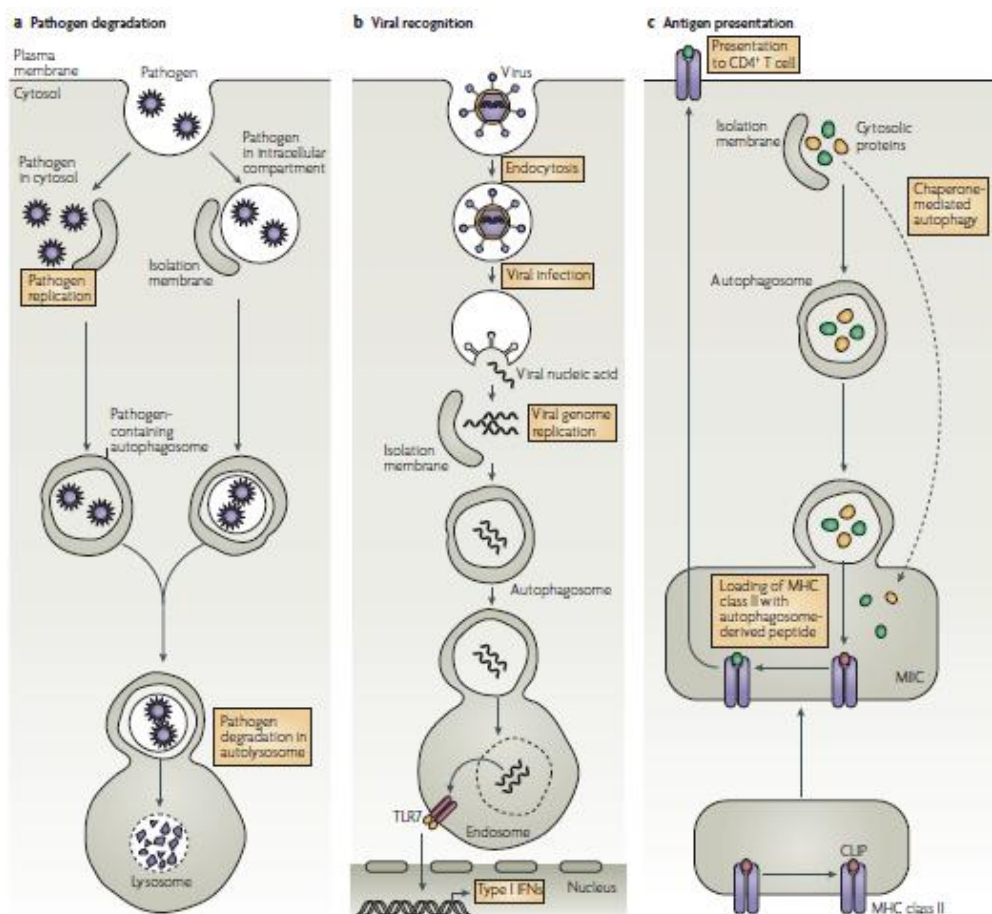
Autofagie hraje nezanedbatelnou roli v obraně proti intracelulárním patogenům, ve vývoji, přežívání a odumírání některých imunocytů. Podílí se také na dopravě peptidomů do MHC II a některých imunitních regulačních událostech (Levine, Deretic, 2007).

Vztah mezi autofagií a imunitou je obousměrný. Autofagie v jistých kontextech posiluje vrozenou a adaptivní imunitní odpověď, ale zároveň cytokiny, receptory a ligandy podílející se na obou typech imunitních odpovědí stimulují autofagii (která také možná může zprostředkovaně ovlivňovat expresi cytokinů). Imunitní signální molekuly, které byly popsány jako pozitivní regulátory autofagie, zahrnují PKR, IFN $\gamma$ , TNF (tumor-necrosis factor) nebo CD40 – CD40L (CD40 ligand) interakce. Negativně je autofagie regulována Th2 cytokiny, např. IL-4 a IL-13 (Levine a Deretic, 2007).

Lipopolysacharid gramnegativních bakterií vyvolává autofagii v makrofázích po interakci s TLR4 (Xu et al., 2007). V imunocytech může být autofagie stimulována při interakci mezi CD40 – CD40L (CD40 na B lymfocytech, CD40L na Th2 lymfocytech) a následně chránit buňky před vakuolárním parazitem *Toxoplasma gondii*. IFN $\gamma$  a TNF (Th1 cytokiny) mají velký význam proti mykobakteriálním a jiným infekcím, protože indukují autofagii v makrofázích a dalších typech buněk. Th1 cytokiny aktivují autofagii, Th2 cytokiny pak na ni mají tlumivý účinek, což by mohlo být vysvětlením negativní role Th2 při degradaci intracelulárních patogenů.

Poruchy autofagie (mutace ATG nebo mikrobiální antagonismus) mohou být základem neurodegenerativních poruch a stárnutí, infekčních onemocnění, zánětlivých syndromů a tumorigeneze. Odstraňování apoptotických odumřelých buněk pomocí autofagie je pravděpodobně spojeno s její rolí v prevenci zánětu a autoimunity. Podle Qu et al. (2007)

autofagie poskytuje buňkám signály, aby bylo zajištěno jejich odstranění při apoptóze. Defekt autofagického odstraňování apoptotických buněk u *Atg5*<sup>-/-</sup> myších embryí zapříčinil enormní výskyt zánětů ve tkáních (Qu et al., 2007). Vadné čištění od odumřelých buněk nejspíše také vede k narušení tolerance vlastních antigenů a tedy k autoimunitním onemocněním, jako je systémový lupus erythematosus. Mezi Crohnovou chorobou (chronické zánětlivé onemocnění střeva) a poruchou autofagického procesu byla také odhalena silná genetická souvislost (Barret et al., 2008).



Obr. 4 **Fukce autofagie ve vrozené a adaptivní imunitě při infekci intracelulárními patogeny.** **a)** Patogeny (bakterie, viry a parazité), které jsou buď volně v cytosolu, uvnitř fagozómů nebo jiných vakuolárních útvarů jsou obklopeny izolačními membránami, uzavřeny do autofagozómů. Následuje fúze autofagozómů s lysozomy a degradace patogenů uvnitř autolysozómů. **b)** Virové nukleové kyseliny jsou autofagií dopraveny do intracelulárních kompartmentů obsahujících Toll-like receptor 7 (TLR7), který signalizuje indukci produkce interferonu I (IFN I). **c)** Virové (a nejspíše i mikrobiální a vlastní) antigeny jsou pohlceny autofagozomy (které fúzí s pozdními endozomy obsahujícími MHC II) a následně jsou dodány molekulám MHC II pro prezentaci CD4<sup>+</sup> T buňkám. Cytosolické antigeny obsahující KFERQ motiv mohou být do pozdních endozómů importovány přímo, prostřednictvím CMA. CLIP, MHC II – asociovaný invariantní peptidový řetězec. Převzato z Levine et al. (2011).

## **4. 1. Autofagie v nespecifické/vrozené imunitě**

Vrozená neboli nespecifická imunita je první linií obrany proti invazi mikroorganismů.

Nespecifické (neadaptivní) imunitní mechanismy jsou v organismu předem připraveny (vznikly během dlouhé evoluční interakce hostitelů s patogeny) a reagují na strukturní a funkční rysy společné mnoha patogenům. Jsou evolučně starší, rychlejší (minuty) a není po setkání s nimi „imunologická paměť“. Humorální složky zahrnují komplementový systém, interferony, lektiny a jiné sérové proteiny. Mezi buněčné složky patří fagocyty, přirozeně cytotoxické buňky, všechny myeloidní buňky, buňky prezentující antigen, makrofágy (monocyty) a dendritické buňky jsou i komponentou antigenně specifické části imunitního systému.

Mikroby čelí velkému selekčnímu tlaku na vývoj strategií blokování obranných mechanismů hostitele. Viry a intracelulární bakterie vyvinuly mnoho způsobů, aby se přizpůsobily autofagickým procesům v hostitelské buňce. Mohou m.j. blokovat iniciaci autofagie, autofagozomální maturaci, obejít autofagické rozpoznání nebo využít komponenty autofagického procesu k replikaci či přežití.

### **4. 1. 1. Autofagie v obraně proti bakteriím a parazitům**

První indikace, že intracelulární bakterie může být degradována něčím jako je autofagický proces se objevila více než před dvěma desítkami let v morfologických studiích polymorfonukleárních buněk infikovaných *Rickettsia conorii*. Nicméně, před objevem složek autofagického mechanismu to bylo těžké dokázat. Chyběly markery jednoznačně identifikující autofagozomy. S objevem nových technik, které selektivně značí autofagozomy a inaktivují autofagické dráhy v infikovaných buňkách se podařilo prokázat, že autofagie je důležitý mechanismus pro odstraňování intracelulárních bakterií a prvoků. Mnoho patogenů vyvinulo strategie k ochraně před autofagií nebo k využití součástí autofagického procesu ve svůj vlastní prospěch, ale obecně molekulární detaily těchto strategií nejsou dobře definovány.

Jeden z prvních náznaků, že autofagie může hrát roli v imunitě proti intracelulárním bakteriím, přineslo pozorování role PtdIns3P v nespecifických imunitních procesech. Bylo známo, že PtdIns3P se účastní vývoje fagolysosómu a likvidace mikroorganismů hned po jejich fagocytoze makrofágy. Tento poznatek inicioval výzkum, který odhalil roli zvýšené produkce PtdIns3P indukující autofagii (PtdIns3P se podílí na zahájení autofagie přes mTOR – při odstraňování některých intracelulárních patogenů, jako je *Mycobacterium tuberculosis*, které blokuje normální vývoj fagolysosómu). Gutierrez et al. 2004 popsal, že mykobakterie usazené ve zralém fagolysosómu mohou být zneškodněny aktivací buněčné autofagie (hladem nebo inhibicí mTOR). Jiná studie zjistila (Ogawa et al., 2005), že autofagie dokáže identifikovat a zlikvidovat bakterie, které lyzovaly fagozóm a unikly do cytosolu (*Shigella* spp.) nebo extracelulární bakterie, které pronikly do cytoplazmy (*Streptococcus*) (Nakagawa et al., 2004). Později byl seznam intracelulárních bakterií a parazitů, které jsou terčem autofagie rozšířen např. o *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Francisella tularensis* a *Toxoplasma gondii*.

Velikost autofagozómů pohlcujících intracelulární bakterie bývá podstatně větší než těch, které degradují cytoplazmatické složky. Velikost LC3-pozitivních struktur však je u obou podobná, což naznačuje, že tvorba velkých autofagozómů, které by mohly mít i odlišný proces vývoje není vyhrazena pouze pro mikroorganismy (Yamamoto et al., 2006).

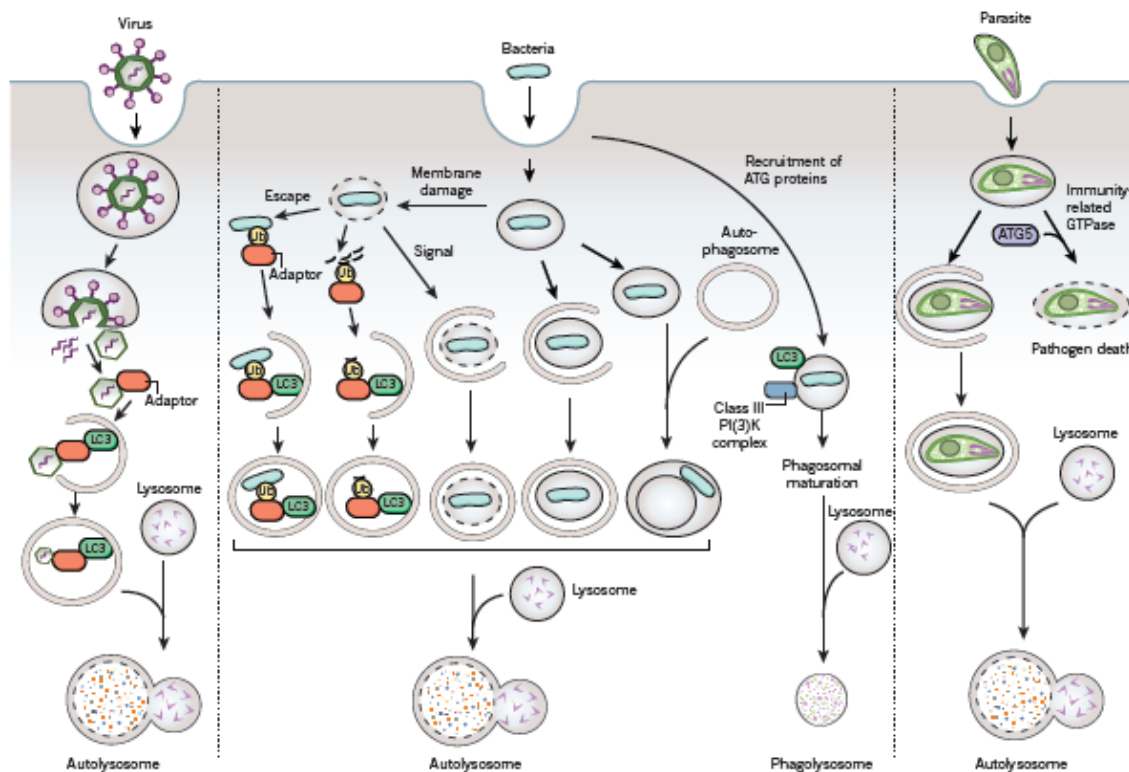
Experimentálně bylo zjištěno, že v buňkách infikovaných *T. gondii* fungují dva stejně významné způsoby autofagické eliminace patogenu, přičemž jeden vyžaduje narušení parazitoformní vakuoly a druhý nikoliv. Zapouzdření patogenu ve vakuole se tedy nezdá být překážkou pro jeho odstranění autofagií (Ling et al., 2006; Andrade et al., 2006).

Mikrobiální proteiny nejspíš mohou být pro likvidaci pomocí autofagie označeny modifikacemi jako je ubiquitinace nebo jinými způsoby, které ještě nebyly identifikovány. Receptory jako jsou TLR, NOD-like receptory, mohou rozpoznat PAMP (patogen-associated molecular patterns) a vést ke stimulaci autofagie. S tím souvisí možnost, že expozice některých epitopů na povrchu mikroorganismů se může podílet na jejich cílení do autofagozómů. Například u rodu *Shigella* vede expozice epitopu, který normálně exponován není (v důsledku maskování jiným exprimovaným proteinem) k autofagickému odstraňování bakterií v buňkách infikovaných mutanty postrádajícími epitop-maskující protein (Ogawa et al., 2005). Jiným možným signálem spojeným s přítomností mikrobů a autofagií, by mohla



být produkce reaktivních kyslíkových intermediátů, často spjatá s rozpoznáním patogenů hostitelskou buňkou, neboť je známo, že indukuje autofagii (Djavaheri-Mergny et al., 2006; Scherz-Shouvai et al., 2007).

Existují nejméně čtyři možné způsoby autofagické degradace intracelulárních patogenů.



Obr. 5 **Způsoby degradace patogenů.** Možné cesty autofagického mechanismu, kterými jsou viry, bakterie a parazité cíleni do lysozomu, což může zahrnovat ubiquitin dependentní a independentní mechanismy. Jaké konkrétní adaptory se mohou podílet na rozpoznání patogenů, není zatím známo. Převzato z Levine et al. (2011).

#### 4. 1. 2. Autofagie ve virové obraně

Viry obecně, aby dokázaly realizovat svůj životní cyklus, nejspíš téměř vždy potřebují úspěšně čelit autofagii. Možnost, že virus, který právě vstoupil do buňky, se může stát terčem

autofagie, nabízí vysvětlení, proč v jedné buňce často musí být velké množství virových partikulí, aby mohla být progresivně infikována.

V neuronech a fibroblastech infikovaných virem *herpes simplex* (DNA virus, který se replikuje v jádře) jsou virové nukleokapsidy pohlcovány autofagozomy ve chvíli, kdy pronikají z jádra do cytoplazmy. Základní neurovirulentní protein (ICP34.5) viru *herpes simplex* je patogenní svou vazbou na Beclin 1 a působením proti hostitelské autofagické odpovědi. Gamma herpes viry mohou inhibovat Beclin 1 produkcí Bcl-2 podobných proteinů (rozličné způsoby blokování proteinu Beclin 1, můžeme nalézt i u jiných virů). Některé viry mohou blokovat PKR (savčí typ eIF2 $\alpha$  kinázy, IFN-indukovatelná dsRNA-dependentní proteinkináza) antivirovou signální dráhu, potřebnou pro vyvolání autofagie ve virem infikovaných buňkách nebo aktivovat PI3K tř. I – Akt (PKB) – mTOR dráhu inhibice iniciace autofagie (viz kapitola 2. 2.) (Levine, 2006).

Autofagie může pravděpodobně za určitých podmínek být „viru-přátelský“ proces, protože může poskytnout virům zdroj intracelulární membrány, která slouží jako lešení pro virový RNA replikační komplex, nutný pro cytoplazmatickou replikaci některých virů. Nejlépe prostudované příklady jsou savčí picornavirus poliovirus a původce myší hepatitidy (coronavirus). Při infekci jedním z těchto virů, snížení exprese genů ATG snižuje virové titry. Je však zajímavé, že picornavirus *Drosophila melanogaster* se také replikuje ve spojení s dvojitou membránou vakuol (morfologicky podobnou dvojitě membráně spojené s replikací picornaviru u savců), ale ATG nejsou nezbytné pro normální replikaci (Cherry et al., 2006). To naznačuje, že požadavky na autofagické mechanismy v generaci dvoumembránových vakuol, které podporují replikaci picornaviru mohou být specifické pro daný typ buněk nebo omezené na určité fylogenetické hostitele. Kromě toho replikace viru vakcinie (DNA virus, který se replikuje v cytoplazmě ve spojení s dvojitou membránou vakuol) také nevyžaduje autofagický mechanismus (Zhang et al., 2006).

Autofagický proces může dodávat virové nukleové kyseliny do endozomálně lokalizovaných TLR v dendritických buňkách *in vitro*, což vede k produkci IFN I. U infekce dvěma různými ssRNA viry, produkce IFN dendritickými buňkami myší vyžadovala živé (ne UV – inaktivované) virové částice, expresi TLR7 a Atg5 (Lee et al., 2007).

U myší indukovaná exprese Beclin 1 snižuje replikaci alfaviru i jím vyvolané neuronální apoptózy a chrání před encefalitidou. RNAi zprostředkované umlčování několika různých ATG podporuje replikaci viru tabákové mozaiky a apoptózu infikovaných buněk. Autofagie

tedy funguje v antivirové imunitě *in vivo* nejen tím, že omezí replikaci viru, ale omezí i viry vyvolanou buněčnou smrt, může proto fungovat při přímé eliminaci virů.

## **4. 2. Autofagie ve specifické /adaptivní imunitě**

Adaptivní imunitní mechanismy reagují na cizorodé struktury prostřednictvím vysoce specifických molekul a aktivují se až po setkání s daným antigenem. Jsou evolučně mladší, pomalejší (dny, týdny), vedou k indukci tzv. „imunologické paměti“. Humorálními složkami jsou protilátky, buněčnými hlavně T a B lymfocyty.

Umlčení různých ATG ve specifických populacích myších lymfocytů ukázalo velký význam ATG pro udržování standardních množství B lymfocytů, CD4<sup>+</sup> T buněk, CD8<sup>+</sup> T buněk a fetálních hematopoetických buněk.

### **4. 2. 1. Autofagie a prezentace antigenu**

Objev, že autofagozomy mohou dodávat endogenní antigeny do tzv. MHC II – loading kompartmentů (kde se MHC II třídy plní antigenními peptidy), počal osvětlovat jednu z velkých záhad antigenní prezentace – jak imunitní systém realizuje odpovědi Th lymfocytů na intracelulární antigeny.

Bylo experimentálně dokázáno, že inhibice autofagie 3 – methyladeninem zrušila či snížila prezentaci některých endogenně exprimovaných bakteriálních peptidů prostřednictvím MHC II (Nimmerjahn et al., 2003). Rovněž farmakologické a genetické inhibice autofagie snižují prezentaci prostřednictvím MHC II endogenně syntetizovaného Epstein-Barr nukleárního antigenu 1 (EBNA1) a jiných virových proteinů. Výsledkem řady studií bylo zobecnění, že proces autofagie umožňuje přenos cytosolických antigenů do pozdních endozómů a lysozómů (viz obrázek 4). Avšak EBNA2 a EBNA3C jsou pro MHC II prezentaci přednostně zpracovány intracelulárním přenosem a endocytózou z média (Taylor et al., 2006).

U epiteliálních buněk thymu čerstvě narozených myši transgenně exprimujících GFP (green fluorescent protein) značené LC3, byla zjištěna vysoká hladina autofagické aktivity, což naznačuje, že autofagie těmto buňkám umožňuje prezentovat vlastní antigeny lymfocytům při pozitivní a negativní selekci. Genetické poškození Atg5 (genový knock-out) v epiteliálních buňkách thymu vede ke změně pozitivní a negativní selekce pomocných T buněk a k autoimunitě (Nedjic et al., 2008).

Během diferenciací autofagozomu v B lymfocytech, dendritických a epiteliálních buňkách alespoň jedna polovina všech autofagozómů souvisí s tzv. MHC II-loading kompartmenty. To může být velmi důležité pro prezentaci antigenu, protože cílení matrixového proteinu (MP) chřipkového viru do autofagozómů vazbou s LC3, vedlo k mnohonásobnému zvýšení MHC II prezentace MP- specifickým Th lymfocytům.

Chaperonem zprostředkovaná autofagie (CMA, viz kapitola 2.3.1., obr. 4) se může podílet na prezentaci prostřednictvím MHC II několika konkrétních cytoplazmatických antigenů. Zvýšená exprese LAMP2a nebo Hsc70 vede ke zvýšení MHC II prezentace vlastních cytosolických antigenů, snížení exprese Hsc70 zeslabuje na MHC II závislou odezvu T buněk na tyto antigeny (Zhou et al., 2005). Signál (KFERQ) iniciující CMA je přítomen u přibližně 30% všech cytosolických proteinů (Cuervo, 2004).

#### **4. 2. 2. Autofagie a homeostáza T buněk**

Autofagie hraje jednu z ústředních rolí při rozhodování mezi přežitím a indukci buněčné smrti v mnoha typech buněk různých typů organismů. Funguje jako mechanismus pro přežití při nedostatku živin i dalších formách buněčného stresu a v jiných kontextech jako mechanismus buněčné smrti, např. v buňkách s defektní apoptózou nebo s velmi vysokou úrovní autofagie. Podle nedávných studií se tato homeostatická role autofagie vztahuje i na T buňky (Levine a Yuan, 2005; Yoshimori, 2007).

Zásoba zralých periferních T lymfocytů podléhá přísné regulaci, která závisí na rovnováze mezi množstvím naivních T buněk procházejících selekcí v thymu a proliferací efektorových T buněk - buněčnou smrtí a diferenciací. Role autofagie v přeživších a proliferujících T lymfocytech byla zkoumána *in vivo* na smrtelně ozářených myších osídlených krvetvornými buňkami z fetálních jater Atg5<sup>-/-</sup> myši. CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocyty z Atg5<sup>-/-</sup> myši po

stimulaci T buněčného receptoru selhávají v efektivní proliferaci. V brzlíku se vyvíjejí normálně, ale nedaří se jim osídlit periferii v důsledku kompletní eliminace programovanou buněčnou smrtí. Jedna z interpretací tvrdí, že při výstupu z brzlíku jsou T buňky v důsledku omezení podpory trofických faktorů (např. IL – 7) vystaveny nutričnímu stresu a defektní autofágie jim nedovolí přežít toto období (Pua et al., 2007).

Autofagický proces může za určitých podmínek nahradit apoptózu. Th2 buňky se stávají více odolnými vůči buněčné smrti vyvolané odnětím růstového faktoru, pokud je autofagie blokována pomocí farmakologických nebo genetických metod. Tento způsob buněčné smrti může být využíván například virem HIV. Glykoproteinový obal HIV navozuje autofagickou buněčnou smrt vazbou na CXC – chemokinový receptor 4 (CXCR4) neinfikovaných Th (Espert et al., 2006). Významnou rolí autofagie je také eliminace autoreaktivních T lymfocytů v thymu.

Vzhledem k rozsáhlosti molekulární interakce mezi autofagií a apoptózou, není divu, že autofagie může mít dvojí roli v T-buněčné homeostaze.

## **5. Závěr**

Autofagie pravděpodobně vznikla k degradaci buněčných složek, recyklaci živin a zajištění přežití buněk v období hladovění. S velkou pravděpodobností, v konfrontaci mezi primitivními eukaryoty a bakteriemi, se tato starobylá lysozomální degradační cesta dále vyvíjela a stala se součástí koordinované mnohonásobné obrany proti intracelulárním patogenům. Proces autofágie degraduje řadu intracelulárních patogenů, dodává mikrobiální genetický materiál a antigeny do potřebných buněčných kompartmentů za účelem aktivace přirozené i adaptivní imunity. Avšak složité regulační dráhy podílející se na autofagii poskytují patogenům značnou škálu možností jak tento mechanismus poškodit, obejít nebo využít ve svůj prospěch.

Kromě obrany proti patogenům se autofagie podílí na homeostáze imunitních buněk a případně na prevenci zánětu nebo autoimunity. Velká většina molekulárních mechanismů autofagického procesu a jeho interakcí s okolím teprve čeká na objasnění.

## 6. Seznam použité literatury

1. Amano, A., Nakagawa, I. & Yoshimori, T. Autophagy in innate immunity against intracellular bacteria. *J. Biochem.* **140**, 161–166 (2006).
2. Andrade, R. M., Wessendarp, M., Gubbels, M. J., Striepen, B. & Subauste, C. S. CD40 induces macrophage anti-*Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fusion of atogenous-containing vacuoles and lysosomes. *J. Clin. Invest.* **116**, 2366–2377 (2006).
3. Arico, S. *et al.* The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 35243–35246 (2001).
4. Balachandran, P. *et al.* The ubiquitin ligase Cbl-b limits *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin T-mediated virulence. *J. Clin. Invest.* **117**, 419–427 (2007).
5. Baumgart, D. C. & Carding, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* **369**, 1627–1640 (2007).
6. Birmingham, C. L., Smith, A. C., Bakowski, M. A., Yoshimori, T. & Brumell, J. H. Autophagy controls *Salmonella* infection in response to damage to the *Salmonella*-containing vacuole. *J. Biol. Chem.* **281**, 11374–11383 (2006).
7. Bjorkoy, G., Lamark, T. & Johansen, T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell. Biol.* **171**, 603–614 (2005).
8. Brazil, M. I., Weiss, S. & Stockinger, B. 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 (1997).
9. Byfield, M. P., Murray, J. T. & Backer, J. M. hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J. Biol. Chem.* **280**, 33076–33082 (2005).
10. Cuervo, A. M. Autophagy: many paths to the same end. *Mol. Cell. Biochem.* **263**, 55–72 (2004).
11. Cuervo, A. M., Dice, J. F. (1996): A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*, **273**; 501-503
12. Dengjel, J. *et al.* Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 7922–7927 (2005).
13. Deretic, V. Autophagy as an immune defense mechanism. *Curr. Opin. Immunol* **18**, 375–382 (2006).
14. Deretic, V. Autophagy in innate and adaptive immunity. *Trends. Immunol.* **26**, 523–528 (2005).
15. Djavaheri-Mergny, M. *et al.* NF- $\kappa$ B activation represses tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced autophagy. *J. Biol. Chem.* **281**, 30373–30382 (2006).
16. Dorfel, D. *et al.* 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 (2005).
17. Espert, L. *et al.* Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J. Clin. Invest.* **116**, 2161–2172 (2006).
18. Fimia, G. M. *et al.* Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* **447**, 1121–1125 (2007).

19. Fratti, R. A., Backer, J. M., Gruenberg, J., Corvera, S. & Deretic, V. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J. Cell. Biol.* **154**, 631–644 (2001).
20. Gaipf, U. S. *et al.* Inefficient clearance of dying cells and autoreactivity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **305**, 161–176 (2006).
21. Gale, M. Jr & Katze, M. G. Molecular mechanisms of interferon resistance mediated by viral-directed inhibition of PKR, the interferon-induced protein kinase. *Pharmacol. Ther.* **78**, 29–46 (1998).
22. Grossmayer, G. E. *et al.* Removal of dying cells and systemic lupus erythematosus. *Mod. Rheumatol.* **15**, 383–390 (2005).
23. Gutierrez, M. G. *et al.* Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* **119**, 753–766 (2004).
24. Hampe, J. *et al.* A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in *ATG16L1*. *Nature Genet.* **39**, 207–211 (2007).
25. Harris, J. *et al.* Autophagy is an effector of Th1–Th2 polarization: Th2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity* (in the press).
26. Checroun, C., Wehrly, T. D., Fischer, E. R., Hayes, S. F. & Celli, J. Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 14578–14583 (2006).
27. Cherry, S. *et al.* COPI activity coupled with fatty acid biosynthesis is required for viral replication. *PLoS Pathog.* **2**, e102 (2006).
28. Inbal, B., Bialik, S., Sabanay, I., Shani, G. & Kimchi, A. DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J. Cell. Biol.* **157**, 455–468 (2002).
29. Jackson, W. T. *et al.* Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol.* **3**, e156 (2005).
30. Jia, G., Cheng, G., Gangahar, D. M. & Agrawal, D. K. Insulin-like growth factor-1 and TNF- $\alpha$  regulate autophagy through c-jun N-terminal kinase and Akt pathways in human atherosclerotic vascular smooth cells. *Immunol. Cell Biol.* **84**, 448–454 (2006).
31. Kawai, T. & Akira, S. Innate immune recognition of viral infection. *Nature Immunol.* **7**, 131–137 (2006).
32. Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T. Beclin–phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the *trans*-Golgi network. *EMBO Rep.* **2**, 330–335 (2001).
33. Kirkegaard, K., Taylor, M. P. & Jackson, W. T. Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nature Rev. Microbiol.* **2**, 301–314 (2004).
34. Klionsky, D. J. & Emr, S. D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290**, 1717–1721 (2000).
35. Klionsky, D. J. *et al.* A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell* **5**, 539–545 (2003).
36. Lee, H. K., Lund, J. M., Ramanathan, B., Mizushima, N. & Iwasaki, A. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cell. *Science* **315**, 1398–1401 (2007).

37. Levine, B. & Klionsky, D. J. Development by selfdigestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* **6**, 463–477 (2004).
38. Levine, B. & Yuan, J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest.* **115**, 2679–2688 (2005).
39. Levine, B. Eating oneself and uninvited guests; autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* **120**, 159–162 (2005).
40. Levine, B. in *Autophagy in Immunity and Infection: a novel immune effector* (ed. Deretic, V.) 227–241 (Wiley-VCH Weinheim, Germany 2006) .
41. Levine&Deretic (2007): Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nature reviews, immunology*.
42. Levine et al (2011): . Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 323-333
43. Li, C. *et al.* Autophagy is induced in CD4+ T cells and important for the growth factor-withdrawal cell death. *J. Immunol.* **177**, 5163–5168 (2006).
44. Liang, C. *et al.* Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin 1-binding protein UVRAG. *Nature Cell Biol.* **8**, 688–699 (2006).
45. Liang, X. H. *et al.* Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by Beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J. Virol.* **72**, 8586–8596 (1998).
46. Ling, Y. M. *et al.* Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *J. Exp. Med.* **203**, 2063–2071 (2006).
47. Lippincott-Schwartz et al. 2010: Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation, *Cell*, 656-667
48. Liu, Y. *et al.* Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* **121**, 567–577 (2005).
49. Lum, J. J., DeBerardinis, R. J. & Thompson, C. B. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**, 439–448 (2005).
50. Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R. & Iwasaki, A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* **198**, 513–520 (2003).
51. McEwan and Dikic. (2010): Not all Autophagy membranes are created Equal. *Cell* 564-566).
52. Maderna, P. & Godson, C. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* **1639**, 141–151 (2003).
53. Massey, A. C., Zhang, C. & Cuervo, A. M. Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* **73**, 205–235 (2006).
54. Meijer, A. J. & Codogno, P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **36**, 2445–2462 (2004).
55. Meijer, A. J. & Codogno, P. Signalling and autophagy regulation in health and disease. *Mol. Aspects. Med.* **27**, 411–425 (2006).
56. Menéndez-Benito, V. & Neefjes, J. Autophagy in MHC class II presentation: sampling from within. *Immunity* **26**, 1–3 (2007).
57. Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. *In vivo* analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1101–1111 (2004).
58. Mizushima, N. (2007); Autophagy: process and fiction. *Genes&Development*, 21: 2861-2873



59. Nakagawa, I. *et al.* Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science* **306**, 1037–1040 (2004).
60. Nedjic *et al.* (2008): Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* **455**, 396–400.
61. Nimmerjahn, F. *et al.* Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1250–1259 (2003).
62. Nobukuni, T. *et al.* Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 14238–14243 (2005).
63. Ogawa, M. & Sasakawa, C. Intracellular survival of *Shigella*. *Cell. Microbiol.* **8**, 177–184 (2006).
64. Ogawa, M. *et al.* Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science* **307**, 727–731 (2005).
65. Ohsumi, Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 211–216 (2001).
66. Orvedahl, A. *et al.* HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe* **1**, 23–35 (2007).
67. Paludan, C. *et al.* Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* **307**, 593–596 (2005).
68. Parkes, M. *et al.* Sequence variants in the autophagy gene *IRGM* and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nature Genet.* **39**, 830–832 (2007).
69. Pattingre, S. *et al.* Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**, 927–939 (2005).
70. Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E. F., Meijer, A. J. & Codogno, P. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 992–998 (2000).
71. Prentice, E., Jerome, W. G., Yoshimori, T., Mizushima, N. & Denison, M. R. Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. *J. Biol. Chem.* **279**, 0136–10141 (2004).
72. Prescott, N. J. *et al.* A nonsynonymous SNP in *ATG16L* predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology* **132**, 1665–1671 (2007).
73. Pua, H. H., Dzhagalov, I., Chuck, M., Mizushima, N. & He, Y. W. A critical role for the autophagy gene *Atg5* in T cell survival and proliferation. *J. Exp. Med.* **204**, 25–31 (2007).
74. Py, B. F., Lipinski, M. M. & Yuan, J. Autophagy limits *Listeria monocytogenes* intracellular growth in the early phase of primary infection. *Autophagy* **3**, 117–125 (2007).
75. Pyo, J. O. *et al.* 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 (2005).
76. Qu, X. *et al.* Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* **128**, 931–946 (2007).
77. Rich, K. A., Burkett, C. & Webster, P. Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy. *Cell. Microbiol.* **5**, 455–468 (2003).
78. Rikihisa, Y. Glycogen autophagosomes in polymorphonuclear leukocytes induced by rickettsiae. *Anat. Rec.* **208**, 319–327 (1984).

79. Rioux, J. D. *et al.* Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nature Genet.* **39**, 596–604 (2007).
80. Sartor, R. S. Mechanisms of disease pathogenesis: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* **3**, 390–407 (2006).
81. Seglen, P. O. & Gordon, P. B. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **79**, 1889–1892 (1982).
82. Shintani, T. & Klionsky, D. J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**, 990–995 (2004).
83. Scherz-Shouvali, R. *et al.* Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* **26**, 1749–1760 (2007).
84. Schmid, D., Dengjel, J., Schoor, O., Stevanovic, S. & Munz, C. Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens. *J. Mol. Med.* **84**, 1–9 (2006).
85. Schmid, D., Pypaert, M. & Munz, C. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* **26**, 79–92 (2007).
86. Singh, S. B., Davis, A. S., Taylor, G. A. & Deretic, V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* **313**, 1438–1441 (2006).
87. Subauste, C., Andrade, R. & Wessendarp, M. CD40–TRAF6 and autophagy-dependent antimicrobial activity in macrophages. *Autophagy* **3**, 245–248 (2007).
88. Suzuki, K. & Ohsumi, Y. Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **581**, 2156–61.(2007).
89. Talloczy, Z. *et al.* Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2 $\alpha$  kinase signaling pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 190–195 (2002).
90. Talloczy, Z., Virgin, H. W. & Levine, B. PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy* **2**, 24–29 (2006).
91. Taylor, G. A., Feng, C. G. & Sher, A. p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nature Rev. Immunol.* **4**, 100–109 (2004).
92. Taylor, G. S. *et al.* A role for intercellular antigen transfer in the recognition of EBV-transformed B cell lines by EBV nuclear antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* **177**, 3746–3756 (2006).
93. The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* **447**, 661–678 (2007).
94. Vergne, I. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest: mycobacterial phosphatidylinositol analog phosphatidylinositol mannoside stimulates early endosomal fusion. *Mol. Biol. Cell* **15**, 751–760 (2004).
95. Vergne, I., Chua, J. & Deretic, V. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest: selective targeting of PI3P-dependent membrane trafficking. *Traffic* **4**, 600–606 (2003).
96. Wright, K., Ward, S. G., Kolios, G. & Westwick, J. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by interleukin-13. An inhibitory signal for inducible nitric-oxide synthase expression in epithelial cell line HT-29. *J. Biol. Chem.* **272**, 12626–12633 (1997).

97. Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**, 471–484 (2006).
98. Xu, Y. *et al.* Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity* **27**, 135–144 (2007).
99. Yamamoto, A., Cremona, M. L. & Rothman, J. E. Autophagy-mediated clearance of huntingtin aggregates triggered by the insulin-signaling pathway. *J. Cell Biol.* **172**, 719–731 (2006).
100. Yorimitsu, T. & Klionsky, D. J. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.* **12** (Suppl. 2), 1542–1552 (2005).
101. Yoshimori, T. Autophagy: paying Charon's toll. *Cell* **128**, 833–836 (2007).
102. Zhang, H. *et al.* Cellular autophagy machinery is not required for vaccinia virus replication and maturation. *Autophagy* **2**, 91–95 (2006).
103. Zhou, D. *et al.* Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity* **22**, 571–581 (2005).