

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Martina Slavková

Mechanismy autofagie a vztah tohoto procesu k virovým infekcím

Mechanisms of autophagy and their relation to virus infections

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha, 2013

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své rodině za projevenou shovívavost a podporu. A především bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. za udělené rady a vedení.

Prohlášení:

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

V Praze, 10. 5. 2013

Martina Slavková

Abstrakt

Autofagie je jeden z obranných mechanismů buněk. Je to proces vysoce konzervován od kvasinek po člověka. Tímto procesem jsou degradovány cytosolické proteiny nebo celé orgány. Autofagie je indukována různými podmínkami. Rozlišujeme několik typů autofagie např. makroautofagie, mikroautofagie a chaperonem zprostředkovaná autofagie. Makroautofagie je uskutečňována prostřednictvím buněčné struktury zvané autofagosom. Degradace probíhá v lysosomálním kompartmentu buněk. Na celém mechanismu se podílí velké množství proteinů a regulačních molekul. Autofagie je provázána s jinými buněčnými mechanismy jako je např. transport z cytoplazmy do vakuoly, který probíhá za optimálních růstových podmínek buněk. Autofagie funguje také jako obranný mechanismus i při virové infekci, nebo je viry zneužíván v jejich prospěch.

Klíčová slova: Makroautofagie, mikroautofagie, chaperonem zprostředkovaná autofagie, Atg proteiny, RNA viry

Abstract

Autophagy is one of the defense mechanisms of the cells. It is highly conserved from yeast to man. Cytosolic proteins or whole organelles are degraded by this process. Autophagy is induced by various conditions. We distinguish several types of autophagy, e. g. macroautophagy, microautophagy and chaperone-mediated autophagy. Macroautophagy is carried out through the cellular structure called autophagosome. Degradation takes place in the lysosomal compartment of the cells. A large number of proteins and regulatory molecules is involved in the whole mechanism. Autophagy is connected with the other cellular mechanisms such as the cytoplasm-to-vacuole pathway which extends under optimal growth conditions of the cells. Autophagy also works as a defense mechanism during viral infection or it is misused by viruses for their benefit.

Key words: Macroautophagy, microautophagy, chaperone-mediated autophagy, Atg proteins, RNA viruses

1. Úvod.....	1
2. Typy autofagie.....	2
2.1. Makroautofagie.....	2
2.1.1. Mechanismus makroautofagie.....	3
2.1.2. Regulace makroautofagie.....	8
2.2. Mikroautofagie.....	10
2.3. Chaperonem zprostředkovaná autofagie.....	13
2.4. RNautofagie.....	16
3. Geny související s autofagií a jejich proteiny.....	16
3.1. Kinázový komplex proteinu Atg1.....	17
3.2. Konjugační systémy proteinů Atg12 a Atg8.....	18
3.2.1. Konjugační systém proteinu Atg12.....	18
3.2.2. Konjugační systém proteinu Atg8.....	19
3.3. Atg9.....	20
4. Viry a autofagie.....	21
5. Závěr.....	28
6. Seznam použitých zkratk.....	29
7. Seznam použité literatury.....	31

1. Úvod

Autofagie je jedním z obranných mechanismů buněk. Je aktivována za různých podmínek, například při hladovění, anebo stresových podmínkách. Existuje několik typů autofagie, např. makroautofagie, mikroautofagie a chaperonem zprostředkovaná autofagie, a proto bych se především zaměřila v této práci na popis jejich mechanismů. Nakolik jsou si tyto typy podobné, a naopak v čem jsou rozdílné, zda jsou aktivovány všechny současně a navzájem se podporují, nebo působí na sobě nezávisle.

Mechanismus autofagie je konzervován od nižších až po vyšší organismy, od kvasinek po člověka. U *Saccharomyces cerevisiae* jsou obvykle geny související s autofagií označovány ATG (autophagy-related) a příslušným číslem. Většina genů má pak své homology i u ostatních organismů. Ovšem i v rámci jednoho organismu mohou být ATG geny označovány v různých pracích jinými názvy podle toho, z jakého úhlu geny studují, jakých jiných buněčných drah jsou součástí. Na autofagii se podílí celá řada dalších proteinů, mnoho regulačních molekul. Celkově vytváří proteiny autofagie rozsáhlou síť o mnoha interakcích. Popis proteinů a jejich funkce bude další součástí této práce.

Tak jako se viry dokázaly přizpůsobit celé řadě buněčných mechanismů a využívat buněčné komponenty, dokázalo mnoho z nich využít i autofagii ve svůj prospěch. Proto bych si ráda položila otázku, zda je možné těchto poznatků využít při léčbě nemocí způsobených těmito viry, zda lze příslušnou část autofagie vyřadit „z provozu“. Vzhledem ke skutečnosti že autofagie je obranný mechanismus buněk, je pravděpodobné, že ne vždy podporuje infekci. S čímž souvisí další otázka, nakolik je tento proces pro buňku nezbytný. Do jaké míry je případně zastupitelný.

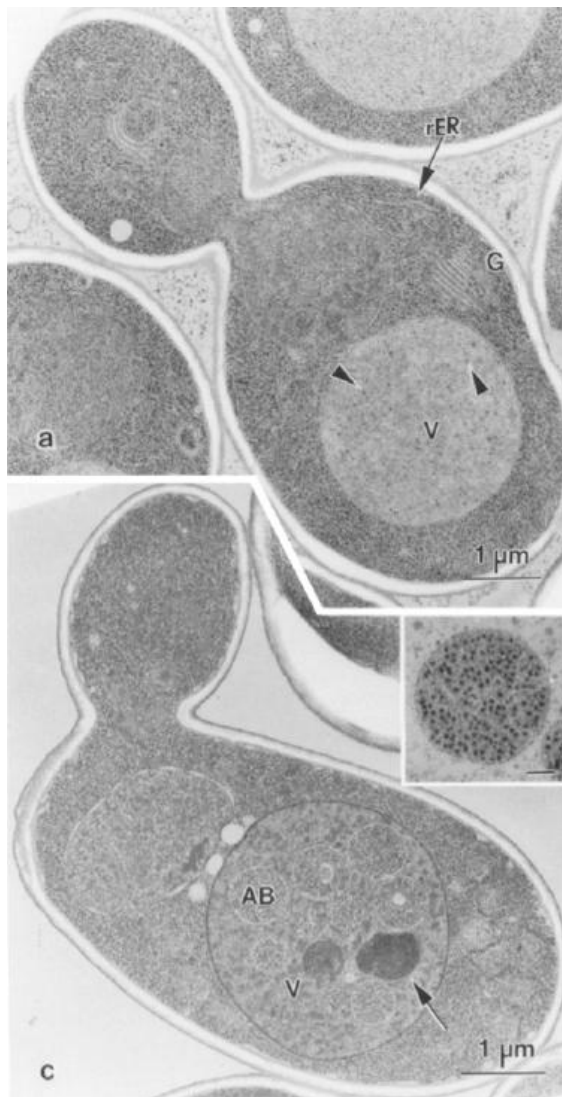
Autofagie je vědci blíže zkoumána posledních dvacet let, kdy v roce 1994 Misuzu Baba a jeho spolupracovníci popsali strukturu autofagosomu. V jejich době však již byla známa autofagická tělíska a autoři předpokládali, že vznikla fúzí autofagosomu s vakuolou. Tato práce by měla shrnout poznatky o autofagii a poukázat na probádanost celého fenoménu.

2. Typy autofagie

Je rozlišováno několik typů autofagie. Tyto typy mají celou řadu společných znaků. Přesto u nich nacházíme mnohé rozdíly, které je umožňují přesně rozdělit.

2.1. Makroautofagie

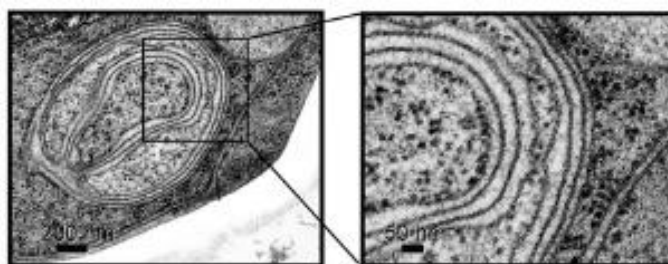
Pomocí buněčných struktur zvaných autofagosomy jsou do lysosomálního kompartmentu buněk dopravovány mitochondrie, drsné endoplasmatické retikulum, lipidová granula, glykogenová granula a membránové váčky (obrázek č. 1) [15].



Obrázek č. 1: Vakuola (V), AB (autofagická tělíska), rER (drsné endoplasmatické retikulum), G (Golgiho aparát) (převzato z Takeshige, K. et al. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. The Journal of Cell Biology (1992); 119(2):301-311.)

Akumulace autofagických tělísek ve vakuole je obecnou odpovědí buněk na podmínky, které nejsou optimální pro jejich růst. Za pro buňku různých nepříznivých podmínek je degradován především cytosol, který obsahuje ribozomy a mnoho enzymů.[15] Takovými enzymy jsou například ADH (alkohol dehydrogenáza), anebo PGK (fosfoglycerol kináza) [1].

Odpovědí buňky na nesbalené proteiny jsou změny endoplasmatického retikula (ER), které se zvětší a stává se kompaktnější strukturou. Po skončení této odpovědi se buňky potřebují „přebytečného ER zbavit“. Vytváří se dvojmembránové struktury podobné autofagosomům, které obsahují právě části ER (obrázek č. 2).[32]



Obrázek č. 2: Autofagosom s ER. Ve zvětšeném výřezu je dobře patrná dvojitá membrána autofagosomu a drsné endoplasmatické retikulum s ribozomy. (převzato z Bernales, S. et al. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. PLoS Biology (2006); 4(12):e423.)

2.1.1. Mechanismus makroautofagie

Z pre-autofagosomální struktury (PAS), která je tvořena izolovanými membránami, tubulárními a vesikulárními strukturami, které leží proximálně u vakuoly, dává Atg1 (uváděná též pod názvem Apg1) protein kináza vzniknout autofagosomům. Proteiny Atg13 (Apg13) a Atg17 (Apg17) jsou regulačními faktory Atg1 protein kinázy.[5]

V PAS je přítomno mnoho autofagických proteinů. Např. Atg6, jinak také Vps30 (vacuolar protein sorting 30), který je homologem lidského Beclinu 1, a protein Atg14 tvoří PI3 (fosfatidylinositol-3) kinázový komplex. Tento kinázový komplex je nezbytný pro cílení komplexů Atg12-Atg5 a Atg8-fosfatidylethanolamin (PE) do PAS. Atg6 a Atg9 jsou zodpovědné za organizaci PAS a lokalizaci Atg5 a Atg8 (jinak též Aut7) v PAS, ale již nemají vliv na tvorbu komplexu Atg8-PE. Interakce Atg5 a Atg16 je nutná pro lokalizaci Atg5 do PAS. Komplex Atg12-Atg5-Atg16 je nutný pro lokalizaci Atg8 v PAS. Mutace Atg16 se projeví poklesem hladiny Atg8-PE.[5] O některých těchto a dalších proteinech bude detailněji pojednáno v kapitole „Geny související s autofagií“.

PAS má při vyřazení produkce Atg13 a Atg14 jinou morfologii než při vyřazení Atg1. „Knock-out“ způsobí, že je PAS složené pouze z malých váčků o průměru 25-30nm. Je-li vyřazen gen pro Atg14 nalézají se v PAS delší tubulární struktury. Na vzniku dvojmembrány autofagosomu z PAS fúzí a remodelací membrán se podílejí proteiny Atg1, Atg13 a Atg14.[27]

Autofagosom v buňkách kvasinek se vyznačuje dvojitou membránou. Vnitřní i vnější membrána jsou užší, než je tomu u ostatních intracelulárních membrán. Svou velikostí se shodují s autofagickými tělísky ve vakuole.[1] Autofagosomy dosahují velikosti 300-900 nm [4]. Obsah většiny autofagosomů je shodný s cytolem, mají podobnou hustotu ribosomů. V některých tělískách je ovšem i vyšší hustota ribosomů.[15] V membráně autofagosomu je menší obsah polysacharidů než v membráně vakuoly. Liší se i morfologicky.[1]

U autofagosomů vyskytujících se v buňkách za podmínek nedostatku uhlíku lze pozorovat určitý prostor mezi membránami. Při nedostatku dusíku je mezi membránami pozorován tenčí lumenální prostor, autofagosomy jsou morfologicky komplexnější a je pozorována vyšší frekvence výskytu multilamelárních autofagosomů.[1] Jinak jsou tělíška ve vakuolách morfologicky stejná za obou podmínek, hladovění na uhlíku i dusíku [15].

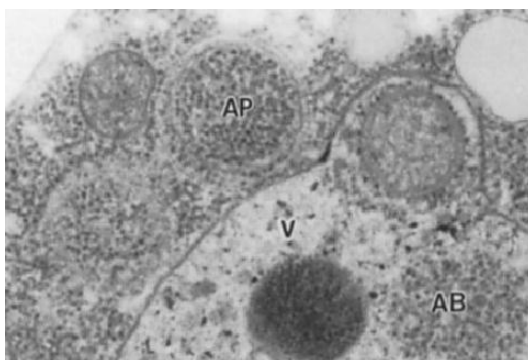
Autofagosomů se v kvasinkové buňce nachází poměrně malý počet v blízkosti vakuoly. Vedle klastru autofagosomů, v blízkosti Golgiho aparátu a malých váčků, se formují nově vznikající autofagosomy.[1]

V buňkách se vyskytují celkem tři populace autofagických struktur. Jednu tvoří skutečné autofagosomy, časné autofagické vakuoly (Avi) s obsahem shodujícím se s cytoplazmou, které nejsou kyselé, ani neobsahují výrazné množství hydrolázy cathepsin L. Další populaci tvoří pozdní autofagické vakuoly (AVd) s částečně degradovaným obsahem, které obsahují hodně cathepsinu L a jsou kyselé. Mezičlánek tvoří autofagolysosomy, které jsou kyselé jako AVd a mají málo cathepsinu L, jako je tomu u autofagosomů. AVd jsou bohaté nejen na cathepsin L, ale i cathepsin D a beta-glucuronidázu. Autofagosomy nemají fosfatázovou ani aryl sulfatázovou aktivitu, AVd je mají.[3] Na obou typech autofagických vakuol, časných i pozdních se nachází protein LAMP-2 (lysosom asociovaný membránový protein 2). Na pozdních se ho nachází asi pětikrát více.[24]

Zvýšený transport sekretorické dráhy vede k odštěpování LC3 (light chain 3) váčků, které jsou morfologicky podobné autofagosomům. (Savčí protein LC3 ortholog ke kvasinkovému Atg8.) LC3 váčky vznikají z TGN (Trans Golgi Network). Nejprve dochází k tvorbě tubulární struktury o průměru několika mikrometrů, LC3 jsou akumulovány na koncích. Nakonec dojde k odštěpení váčků. LC3 váčky neobsahují konstitutivní náklad ani

komponenty určené k transportu z Golgiho aparátu do endosomů. Na tvorbě váčků se podílejí i AP1 (clatrin adaptorový protein 1) a clatrin.[6]

V autofagii se několikrát uplatňuje proces fúze membrán, při spojování izolovaných membrán anebo při fúzi autofagosomů s vakuolami (obrázek č. 3) [14]. Při kontaktu vakuoly a autofagosomu, získává membrána vakuoly konkávní tvar. Vnější membrána splývá s vakuolární. Při kontaktu s vakuolou jsou vnitřní a vnější membrána autofagosomu v těsném kontaktu. Pokud nejsou vakuoly v buňce přítomny, dochází k akumulaci autofagosomů do klastrů v cytosolu.[1]



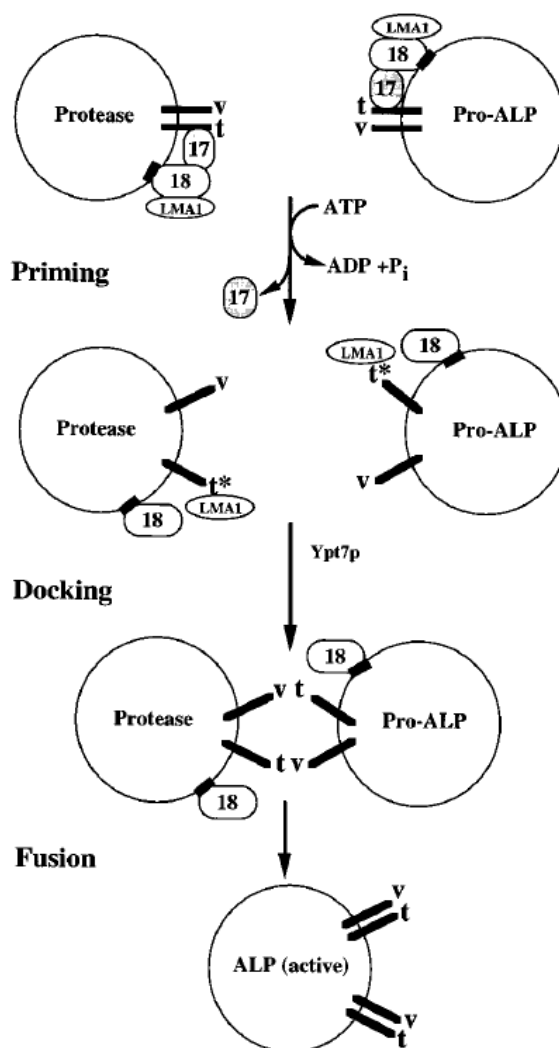
Obrázek č. 3: V (vakuola), AP (autofagosom), AB (autofagické tělísko). Fúzování AP s V. (převzato z Baba, M. et al. Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. The Journal of Cell Biology (1994); 124(6):903-913.)

Ve fúzi autofagosomů k vakuole v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* se uplatňují faktory sekretorických drah, např. Sec18p (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein; NSF) a Vti1P (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein [SNAP] receptor; SNARE).[14]

Ungermann a spolupracovníci postulovali model homotypické vakuolární fúze v kvasinkách (obrázek č. 4). Nejprve protein Sec17p asociuje s komplexem v-t-SNARE, vázaným k t-SNARE. Protein Vam3p funguje jako t-SNARE, protein Nyv1p jako v-SNARE.[34] Hydrolýza ATP (adenosintrifosfát) proteinem Sec18p, který je esenciální pro cytoplasma-vakuolární transport i autofagii [14], indukuje čtyři vzájemně vázané reakce: uvolnění proteinu Sec17p, disociace SNARE komplexu, aktivaci t-SNARE a transfer proteinu LMA1 (low Mr activity 1) k aktivaci komplexů SNARE, aby byly stabilizovány pro „docking“ a fúzi. Během spojení vakuol (docking), které vyžaduje G protein Ypt7p (GTP vazebný protein), interagují vzájemně v- a t-SNARE komplexy obou vakuol a zůstávají v komplexu i po fúzi. Paralelní uspořádání „coiled-coil“ domén komplexů SNARE by mohlo sloužit jako hnací síla pro fúzi obou spojených vakuol.[34]

Pro tvorbu autofagosomů jsou nezbytné také faktory spojené s pučením COPII (coatmer protein II) váčků, např. Sec12p (GDP/GTP „exchange“ faktor), Sec16, 23 a 24. To naznačuje úzký vztah autofagie se sekretorickými drahami.[14]

Výše uvedené faktory patří mezi časně sekretorické proteiny. Pozdní Sec proteiny se autofagie neúčastní.[14]



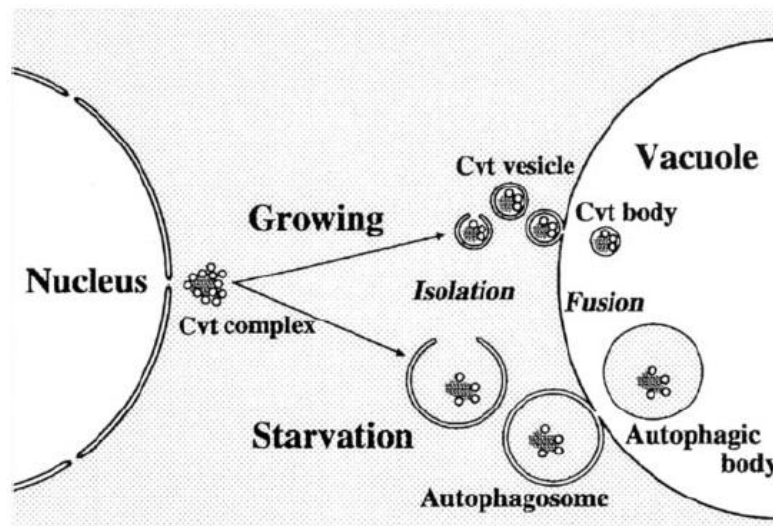
Obrázek č. 4: Homotypická fúze autofagosomu s vakuolou. Protein Sec17 asociuje s komplexem v-t-SNARE. Sec18 se váže na hypotetický receptor. Hydrolyza ATP proteinem Sec18 vede k uvolnění Sec17, disociaci SNARE komplexu, aktivaci SNARE proteinem LMA1 (t-SNARE označené hvězdičkou). Pomocí proteinu Ypt7p interagují v- a t-SNARE komplexy obou vakuol. V-t-SNARE komplexy jsou zachovány i po fúzi vakuol. Nejprve jsou v jedné vakuole přítomny proteázy a v druhé proALP (precursor form of alkaline phosphatase), po spojení vakuol se z proALP stává maturovaný protein ALP. (převzato z Ungermann, C. et al. A vacuolar v-t-SNARE complex, the predominant form in vivo and on isolated vacuoles, is disassembled and activated for docking and fusion. The Journal of Cell Biology (1998); 140(1):61-69.)

Mezi vnitřní a vnější membránou autofagosomu se nachází lysosomální integrální proteiny, hydrolázy, které jsou odpovědné za fúzi s vakuolou [3].

Nedostatek proteinázy B vede k akumulaci autofagických tělísek ve vakuole. Aktivita proteinázy B je inhibována v přítomnosti PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride).[15]

Protein ubiquilin spojuje makroautofagii a chaperonem zprostředkovanou autofagii (CMA). Ubiquilin je přítomen v autofosomech i autolysosomech, váže se na obě formy proteinu LC3, LC3-I a LC3-II (ortholog Atg8-PE). Vyřazení ubiquilinu zřejmě přímo zbraňuje tvorbě LC3-II. Proteiny vázající se na ubiquilin jsou degradovány procesem makroautofagie. Sám ubiquilin není jen nezbytný, ale je v procesu makroautofagie sám degradován. Navíc je ubiquilin substrátem CMA.[25]

Autofagie je blízce provázána s cytoplasma-vesikulárním transportem (Cvt) užívaným pro import API (vacuolar hydrolase aminopeptidase I) do vakuol. Cvt váčky jsou mnohem menší, 140-160 nm, než autofagické (300-900 nm). Mají však podobnou strukturu, oba typy mají vnější a vnitřní membránu. Váčky Cvt končí ve vakuole. Při hladovění jsou Cvt váčky zavzaty do autofagosomů spolu s cytosolickými komponentami.[4] Propojení drah a autofagie a cytoplasma-vakuolárního transportu je znázorněno na obr. č. 5. Evidence pro toto propojení přináší i další práce [29].



Obrázek č. 5: Propojení drah autofagie a cytoplasma-vakuolárního transportu (Cvt). ProAPI (precursor form of API) vytváří v cytosolu komplex. Tento Cvt komplex je zacílen k vakuole dvěma dráhami závislých na nutričních podmínkách. V růstových podmínkách se kolem Cvt komplexu vytváří Cvt váček. Naopak během hladovění buněk na dusík je Cvt komplex zavzat do autofagosomů. Nakonec vnější membrána Cvt váčku nebo autofagosomu fúzuje s vakuolou a po rozbití těchto váček se proAPI v lumen vakuoly stává maturovanou hydrolázou. (převzato z Baba, M. et al. Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. The Journal of Cell Biology (1997); 139(7):1687-1695.)

Atg9 se nachází na autofagosomech jak v kvasinkových tak savčích buňkách. Tento protein, také označován jako Cvt7, byl ukázán nezbytným jak pro Cvt i autofagii.[4]

2.1.2. Regulace makroautofagie

I během normálních růstových podmínek probíhá bazální hladina autofagie. Porušení těchto podmínek zvýší hladinu autofagie. Autofagii může vyvolávat např. hypoxie, nedostatek kyslíku u mnohobuněčných organismů, nebo oxidativní stres, vznik kyslíkových radikálů poškozujících buňky, dále také virová infekce, která spojuje autofagii s vrozenou a získanou imunitou, ER stres, tvorba nesbalených proteinů, nedostatek energie ve formě ATP a další.[50]

Primárně je autofagie regulována Atg (autophagy-related) proteiny, které se vyskytují v PAS a regulují vznik autofagosomů. Postupně dochází k regulaci všech kroků autofagie až po sfúzování autofagosomu s lysosomálním kompartmentem buněk a recyklaci.[50]

Hlavním regulátorem autofagie je protein kináza Tor (target of rapamycin), která negativně reguluje kinázu Atg1 za normálních růstových podmínek. Tor fosforyluje kvasinkový protein Atg13, který aktivuje Atg1. Hyperfosforylová forma Atg13 má potom nízkou afinitu k Atg1, který indukuje autofagii.[13] Současně DmATG1 gen kóduje ortholog ATG1 genu u *Drosophily*, který je schopen inhibovat fosforylaci a aktivaci efektoru Tor, kinázu S6K. U savců jsou homology proteinu Atg1 dva proteiny, ULK1 a ULK2 (Unc-51-like kinase 1 a 2).[46]

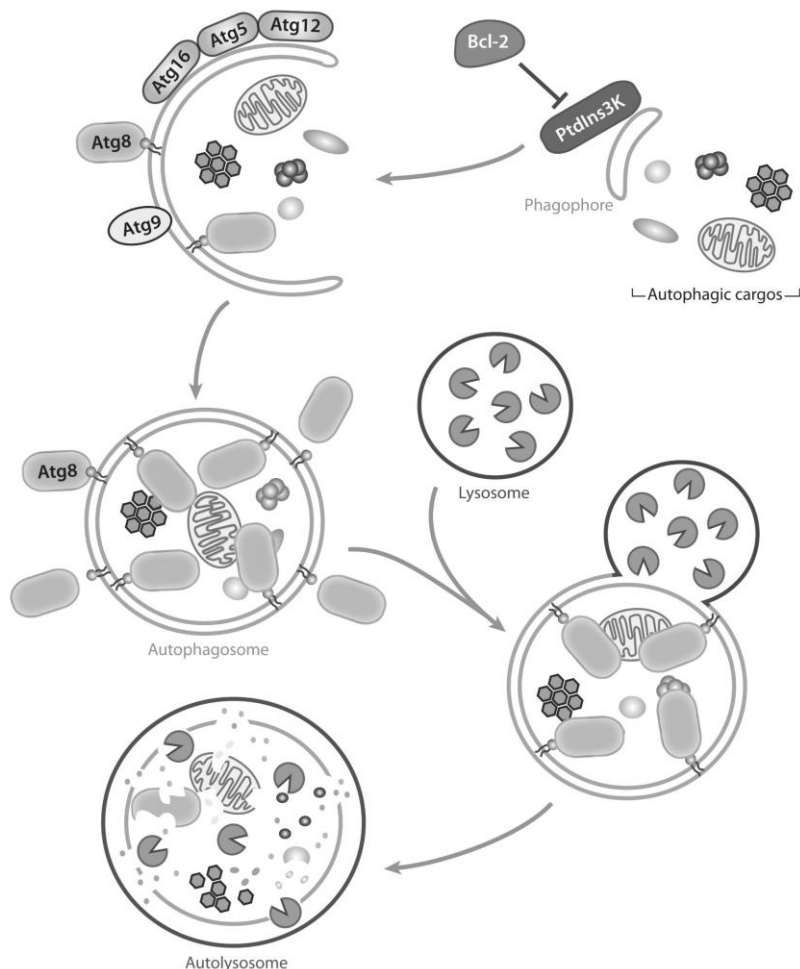
Samotná protein kináza Tor je regulována např. prostřednictvím proteinu p53, který se nachází v cytoplasmě a inhibuje autofagii. Jeho nedostatek autofagii indukuje.[49]

Mimo jiné je autofagie regulována i na transkripční úrovni. Při inhibici protein kinázy Tor je zvýšená exprese Atg8.[9] Atg proteiny jsou upravovány také post-translačně třeba fosforylací nebo acetylací [50].

Nejprve se do formace autofagosomu (obrázek č. 6) zapojí komplex PtdIns3K (phosphatidylinositol 3-kinase) tvořený proteiny Vps34, Atg14 a Atg6 (ortholog savčího proteinu Beclin 1). Aktivace tohoto komplexu způsobí vazbu dalších autofagických proteinů, např. Atg12-Atg5-Atg16 a Atg8-PE, které se podílí na zvětšování formujícího se autofagosomu.[50]

Během hladovění dochází k disociaci komplexu Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)/Beclin1. Bcl-2 je fosforylován a Beclin 1 se s ním již nemůže vázat. Fosforylaci zajišťuje kináza JNK (C-Jun N-terminal protein kinase), kináza z MAPK (mitogen-activated protein kinase) kinázové superrodiny.[47]

Úroveň autofagie je vyšší v buňkách nacházejících se v interfázi, než v buňkách mitotických. V mitóze je redukována hladina fosfatidylinositol-3-fosfátu (PtdIns3P), který je pod kontrolou komplexu Vps34-Beclin1. Aktivní kináza Cdk1 (cyklin dependentní kináza 1) brání interakci mezi Beclinem 1 a Vps34.[52]



Obrázek č. 6: Schematické zobrazení autofagie. Buněčné komponenty určené k degradaci jsou zavzaty do autofagosomu s jeho tvorbou, na které se podílí autofagické proteiny. PtdInc3K, který je za normálních podmínek inhibován Bcl-2 (B-cell lymphoma 2; protein regulující apoptózu), zajišťuje spojování fagoforů (membrán PAS) dohromady a váže na vznikající autofagosom další autofagické proteiny (Atg16, Atg5, Atg12, Atg8). Na autofagické membráně se rovněž nachází protein Atg9, který se také podílí na tvorbě autofagosomu. Po dokončení váčku autofagosom fúzuje s lysosomem, který obsahuje proteázy, a vzniká autolysosom. Proteázy degradují obsah původního autofagosomu. (převzato z *He, C., Klionsky, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. Annual Review of Genetics (2009); 43:67-93.)

Kromě Atg proteinů se na regulaci autofagie podílí mnoho dalších molekul [50].

Je regulováno i např. množství izolovaných membrán v PAS. Této oblasti regulace se účastní proteiny Arf6 (ADP ribosylační faktor 6), který se v buňkách vyskytuje ve dvou

stavech, s navázaným GTP (aktivní forma) nebo GDP (inaktivní forma), a protein ARNO (Arf nucleotide binding site opener), který výměnu GTP za GDP zajišťuje.[53]

Kvasinková kináza GCN fosforyluje eIF2 α (eukaryotický iniciační faktor-2- α). U savců se vyskytuje kináza PKR, která při virové infekci nebo hladovění na dusík fosforyluje eIF2 α . Při narušení fosforylace tohoto faktoru dochází k poruše autofagie.[45]

Během stárnutí dochází ke změně exprese lidských proteinů BAG (Bcl-2-associated athanogene). Exprese genů BAG1 a BAG2 je snižována, naopak exprese genu BAG3 zvyšována. Při snížení exprese BAG1 převažuje exprese BAG3 a naopak. Zvýšení hladiny exprese BAG3 vede ke zvýšení hladiny proteinu LC3 ve formě LC3-II. BAG3 zapojuje do procesu autofagie protein p62, ubiquitin vázající protein, který se přímo váže na protein LC3. Buňka potřebuje rovněž likvidovat ubiquitinylované proteiny. Staré buňky, které nemají přísun Bag3, jsou nuceny více využívat UPS (ubiquitin proteosomální systém).[51]

Výše uvedené způsoby regulace makroautofagie jsou spíše jen příklady. Existuje obrovské množství proteinů, které se na celém procesu podílí.[50]

2.2. Mikroautofagie

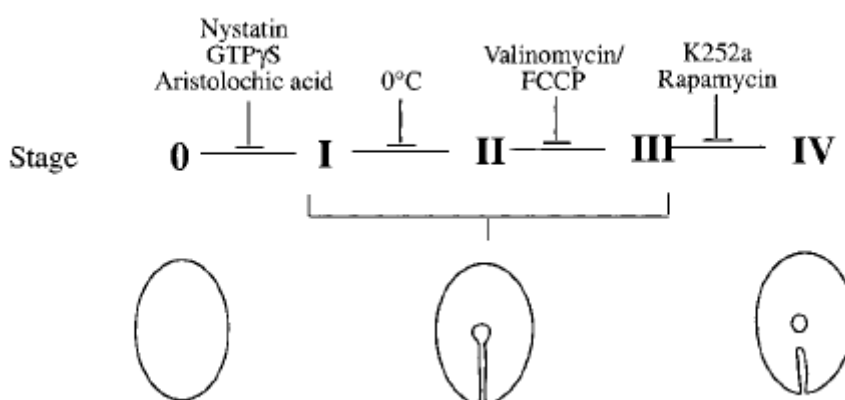
Mikroautofagii je možné rozdělit na typ I, kterým jsou ve vakuole degradovány rozpustné komponenty cytosolu, a typ II, kdy dochází k degradaci organel. Proces vyžaduje ATP. Inhibice závisí na koncentraci inhibitorů a přítomnosti cytosolu, inhibitory zřejmě zabraňují vázání cytosolických faktorů k vakuolární membráně.[17]

A právě na základě inhibičních studií rozdělili J. B. Kunz a jeho spolupracovníci mikroautofagii do čtyř fází (obrázek č. 7). První fáze je inhibována nystatinem, aristolochovou kyselinou a GTP γ S (guanosin 5'-3-O-(thio)trifosfát), druhá chladem, třetí valinomycinem a FCCP (carbonylkyanid-*p*-trifluoromethoxyfenylhydrazon) a čtvrtá rapamycinem a K252a ((9S-(9 α ,10 β ,12 α))-2,3,9,10,11,12-hexahydro-10-hydroxy-10-(methoxycarbonyl)-9-methyl-9,12-epoxy-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pyrrolo[3,4-i][1,6]-benzodiazocin-1-one). GTP γ S zřejmě působí na GTPázy, aristolochová kyselina ovlivňuje složení fosfolipidů působením na fosfolipázy. Proces mikroautofagie může být zastaven chlazením pouze do druhé fáze, pozdější zastavení chlazením není možné.[17]

Nystatin sice interferuje s funkcemi proteinů Sec17p a Sec18p, ale vzhledem k tomu, že mikroautofagie je nezávislá na SNARE, nebude tento fakt příčinou inhibice. Nystatin nenarušuje membránový potenciál. Váže ergosterol a zabraňuje tak invaginaci a/nebo odstřížení váčku, ovlivňuje fluiditu membrány.[17]

Fáze III je závislá na elektrochemickém gradientu. Zřejmě se některé cytosolické faktory váží na membránu a umožňují tvorbu váčků. Právě valinomycin narušuje membránový potenciál.[17]

Invaginace vakuolární membrány je děj nezávislý na mikrotubulech. Dochází k biochemickým změnám ve vakuolární membráně, aby mohl proběhnout poslední krok, rychlý vznik váčku. Proces nemá žádný stabilní meziprodukt. První tři fáze vedou k přípravě kompetentního stavu, následně rychlé odstřížení váčku odráží tuto předpřipravenost invaginace. Fáze IV je „skutečná“ fáze mikroautofagie. Nezávisí na cytosolu nebo ATP, v tomto kroku již působí vakuolární proteázy.[17]



Obrázek č. 7: Fáze mikroautofagie a jejich inhibitory. Fáze I inhibována nystatinem, GTP γ S a aristolochovou kyselinou. Fáze II inhibována chladem. Fáze III inhibována valinomycinem a FCCP. Fáze IV inhibována K252a a rapamycinem. Ve fázích I-III dochází k invaginaci membrány vakuoly a tvorbě váčku. Ve IV. Fázi dochází k odštěpení váčku. (převzato z Kunz, J. B. et al. Determination of four sequential stages during microautophagy *in vitro*. The Journal of Biological Chemistry (2004); 279(11):9987-9996.)

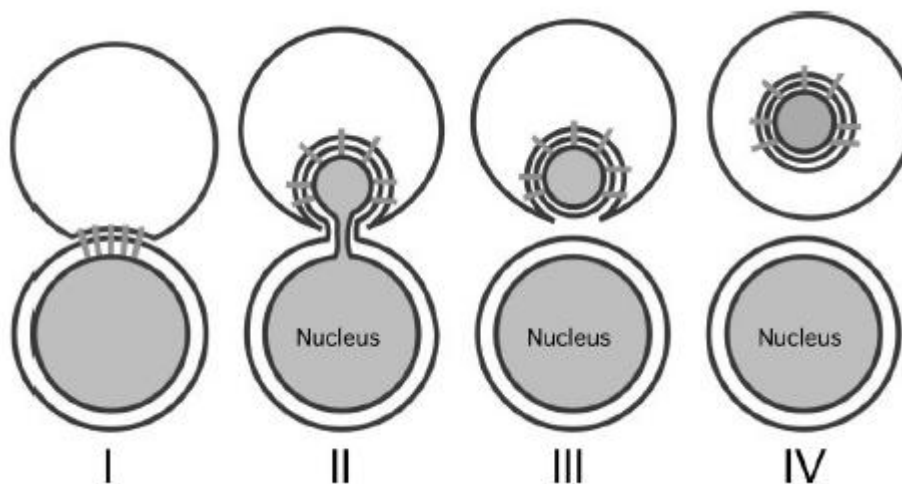
Za spotřeby ATP vstupují procesem mikroautofagie do pozdního endosomu (LE) rozpustné cytosolické proteiny. Na dopravě proteinů do LE se velmi malou měrou podílí i makroautofagie, ale nikoliv chaperonem zprostředkovaná autofagie (CMA).[18]

Mikroautofagie probíhá invaginací membrány a je nezávislá na receptoru LAMP-2A. Důležitou roli v selektivním transportu proteinů do LE hraje chaperon Hsc70 (heat shock cognate 70), který se váže na KFERQ motif proteinů. Ovšem jeho role v tomto procesu není udržování proteinů v jejich nesbaleném stavu. Hsc70 se svým bazickým koncem váže na záporně nabitou membránu endosomu.[18]

Určité množství proteinů konstitutivně podstupuje mikroautofagii během biogeneze multivesikulárních tělísek (MVB). Při narušení morfologie MVB, rovnováhy cholesterolu, je

narušena i endosomální mikroautofagie. Pro tvorbu MVB je potřeba ATPáza Vps4, sloužící k disociaci endosomálních sortujících komplexů (ESCRT) z endosomální membrány, a protein Tsg101, ESCRT I, pozitivní regulátor biogeneze MVB.[18]

Částečná mikroautofagie jádra (PMN; Piecemeal Microautophagy of the Nucleus) probíhá v kvasinkových buňkách pomocí váčků z jádra do vakuoly. Je jí možné navodit hladověním.[19] Bazální PMN však probíhá i za optimálních růstových podmínek [33]. Její jednotlivá stádia jsou schematicky ukázána na obr. 8. Pro účinnou PMN je nezbytný základní autofagický aparát.[19]



Obrázek č. 8: Schéma částečně mikroautofagie jádra. Fáze I – spojení jádra s vakuolou. Fáze II – vchlípení části jádra s membránou endoplasmatického retikula do vakuoly. Fáze III – odštěpení váčku odvozeného z jádra. Fáze IV – uzavření váčku do vakuoly a jeho degradace. (převzato z Krick, R. et al. Piecemeal microautophagy of the nucleus requires the core macroautophagy genes. *Molecular Biology of the Cell* (2008); 19(10):4492-4505.)

Biogeneze váčků PMN je závislá na proteinech Atg1 a Atg15. Protein Atg8 ve váčcích přítomen není. Protein Atg15, který zajišťuje lyzi autofagických tělísek ve vakuole, se podílí na degradaci mikroautofagických váčků. Pro účinnou PMN jsou třeba funkce dalších proteinů, mimo jiné, Vac8, Atg7, 10, 12, 16 a 18. Některé proteiny, jako např. Atg11 a Atg17, jsou specifické pro mikroautofagii, některé Atg proteiny nejsou naopak pro tento proces potřeba, např. Atg26 a Atg19.[19]

V PMN se uplatňuje V-ATPáza. Po zablokování její funkce vykazují buňky fenotyp neindukované PMN. ATPázová aktivita hraje roli ve dvou krocích mikroautofagie. Prvním je invaginace membrány v místě spojení jádra s vakuolou, druhým krokem je odstřížení váčku do vakuolárního lumenu. Spojení jádra s vakuolou vytváří difúzní bariéru ve vakuolární membráně. ATPáza je vytlačena z těchto spojů, jsou v nich přítomny dlouhé řetězce

nenasyčených mastných kyselin. Samotné formování spojů probíhá ve dvou krocích, proteiny Nvj1p a Vac8p vytváří interakce mezi membránami jádra a vakuoly.[33]

PMN je více podobná makroautofagii než Cvt transportu, ale je závislá na faktorech obou cest degradace. Fúze s vakuolou probíhá odlišným způsobem, než je tomu u homotypické fúze autofagosomu s vakuolou. Během PMN se část endoplasmatického retikula stává součástí PMN váčků, ovšem jiným způsobem než je tomu u ER fagie. PMN se částečně odlišuje od jiných procesů podobných mikroautofagii.[19]

2.3. Chaperonem zprostředkovaná autofagie

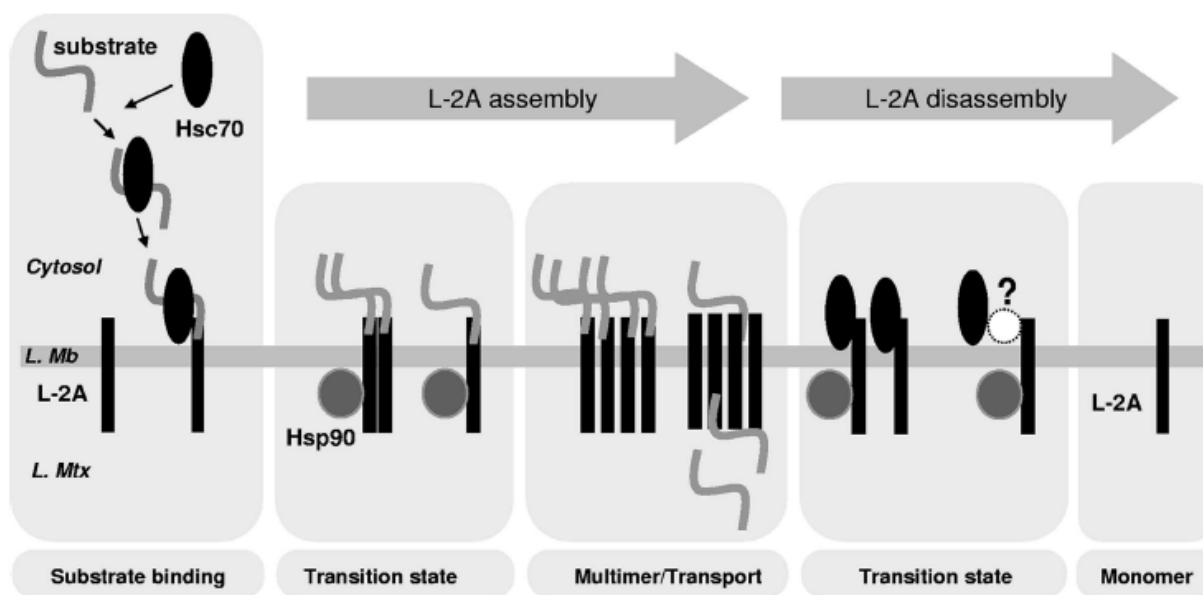
Substráty určené k chaperonem zprostředkované autofagii (CMA) se váží na receptor lysosom LAMP-2A (lysosome-associated membrane protein type 2A). LAMP-2A interaguje s jinými proteiny v lysosomální membráně a tvoří komplexy. Vyskytuje se v pěti různých typech komplexů odlišených podle velikosti, od 150 kDa po více než 850 kDa. Přímou na lysosomální membráně tvoří LAMP-2A komplexy o vysoké a střední molekulové hmotnosti, zatímco v lysosomálním lumen tvoří 200-400 kDa komplexy, které se skládají především z LAMP-2A a Hsc70. Lysosomy účastníci se CMA (CMA+ lysosomy) mají v lumenu vyšší koncentraci Hsc70 a nižší pH než ostatní (CMA-) lysosomy.[20]

LAMP-2A monomery mají velikost 90-110 kDa. Tento protein je silně glykosylován. Lysosomy s vyšší CMA aktivitou vážou více LAMP-2A v 700 kDa komplexu. Stejně tak 700 kDa komplex převládá při podmínkách podporující translokaci substrátu. Při mutagenезi tohoto komplexu se snižuje rychlost procesu CMA.[20]

Chaperon Hsc70 nemigruje s LAMP-2A do 700 kDa komplexu, ale vyskytuje se pouze v komplexu o velikosti 250 kDa. Hsc70 rozvolňuje multimerické LAMP-2A komplexy. Tento proces opět vyžaduje ATP. Jakmile se LAMP-2A nachází ve vysokomolekulárním komplexu, substrát se nemůže navázat. Hsc90, další chaperon potřebný v CMA, interaguje s LAMP-2A v lysosomální membráně a podílí se na multimerizaci LAMP-2A. V lysosomech s vysokou CMA aktivitou je množství Hsc90 nižší, stejně je tomu u Hsc70. Oba chaperony asociují s oběma stranami lysosomu. Působení Hsc70 sice vede ke zvýšení monomerů LAMP-2A, ale po inhibici Hsc90 je LAMP-2A zřejmě nestabilní. Stabilizační efekt na LAMP-2A má Hsc90 na lumenální straně lysosomální membrány. Absence Hsc90 zvyšuje citlivost LAMP-2A k proteázám.[20]

LAMP-2A je v lysosomální membráně organizován velmi dynamicky. Nízkomolekulární komplexy vážou substrát, vysokomolekulární ho translokují do lumen.

Hsc70 způsobuje posun do nízkomolekulárních komplexů. Avšak jakmile se utvoří 700 kDa komplex, dochází k translokaci substrátu (obrázek č. 9).[20]



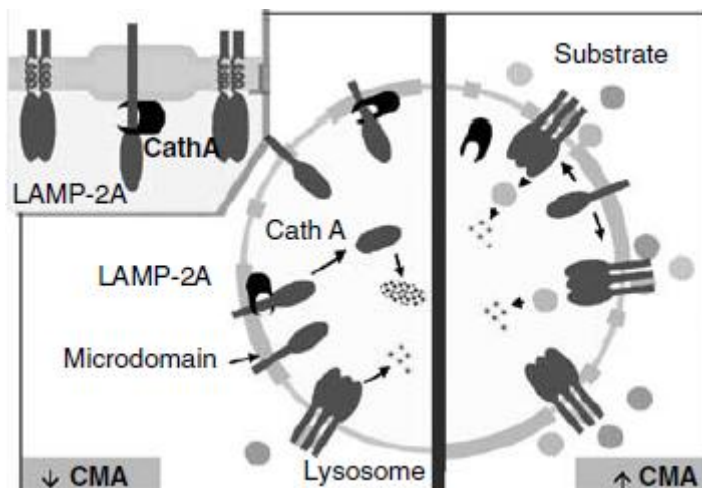
Obrázek č. 9: Změny receptoru LAMP-2A (L-2A) na lysosomální membráně (L. Mb). Lysosomální matrix (L. Mtx). CMA substrát dopraven cytosolickým chaperonem Hsc70 na monomer L-2A. Vazba substrátu zapříčiní vznik multimerického L-2A komplexu. Substrát je translokován do L. Mtx. Chaperon Hsc90 (Hsp90; heat shock protein) stabilizuje 700kDa L-2A komplexy. Hsc70 rozvolňuje 700kDa L-2A komplexy. (převzato z Bandyopadhyay, U. et al. The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Molecular and Cellular Biology* (2008); 28(18):5747-5763.

LAMP-2A se za normálních podmínek vyskytuje v určitých oblastech lysosomální membrány, s definovaným složením lipidů. Jedná se o oblasti bohaté na cholesterol a gangliosid GM1 (monosialotetrahexosylganglioside). Asociace LAMP-2A s mikrodomény je závislá na cholesterolu. Hsc70 a Hsc90 se v mikrodoménách nevyskytují. Změny přítomnosti LAMP-2A v membránových mikrodoménách korelují se změnami nutričních podmínek buněk.[21]

Během hladovění se LAMP-2A dostává z mikrodomén (obrázek č. 10). Rozrušení těchto domén vede k aktivaci CMA i makroautofagii. Vazba substrátu má zřejmě vliv na mobilizaci LAMP-2A z mikrodomén, ve kterých existuje jako monomer. Množství LAMP-2A v membráně je regulováno cathepsinem A a membránovou metaloproteázou. LAMP-2A, který je štěpen cathepsinem A mezi transmembránovým a lumenálním úsekem, je zavzat do lumenu lysosomu. Právě v mikrodoménách je LAMP-2A odstraňován z membrány.[21]

Při narušení makroautofagie je CMA konstitutivně aktivována. Lysosomální schopnost translokace CMA substrátu je zvýšena a CMA aktivní lysosomy jsou lokalizovány

v perinukleární oblasti. Nárůst CMA v makroautofagicky defektních buňkách je výsledkem nárůstu lysosomů s Hsc70. Tento přechod z makroautofagie na CMA je umožněn právě zvýšením stability Hsc70 v lumen lysosomu. Pokud je vyřazen protein Atg5, rovněž dochází k vyšší úrovni CMA. Mechanismy zodpovědné za změny v regulaci jsou odlišné v konstitutivním a indukibilní aktivaci CMA.[22]



Obrázek č. 10: Uvolňování LAMP-2A z mikrodomén v závislosti na CMA aktivitě. Cath A (Cathepsin A) odstraňuje LAMP-2A z mikrodomén při zvýšení aktivity CMA. (převzato z Kaushik, S. et al. Lysosome membrane lipid microdomains: novel regulators of chaperone-mediated autophagy. The EMBO Journal (2006); 25(17):3921-3933.)

Monomery gliového fibrilárního kyselého proteinu (GFAP) o velikosti 50 kDa jsou součástí LAMP-2A komplexů o velikosti 100, 250 a 700 kDa. GTP zvyšuje tuto vazbu k lysosomu, konkrétně ke 100 kDa komplexu. GTP snižuje aktivitu CMA, míra inhibice je dána koncentrací GTP. GTP inhibuje CMA právě prostřednictvím GFAP. V nepřítomnosti GTP zvýšená koncentrace GFAP zvyšuje CMA na CMA+ lysosomech. Na CMA- lysosomy se GFAP váže mnohem méně než na CMA+ lysosomy, je to neselektivní vazba necitlivá ke GTP. V přítomnosti GTP je množství LAMP-2A v mikrodoménách zvyšováno, při GFAP snižováno.[23]

GTP se na GFAP neváže přímo, ale přes GTP-vazebný protein, elongační faktor 1 alfa (EF1 α). GFAP a EF1 α jsou detekovány v 100 kDa komplexu, ale v komplexu velkém 700 kDa se nachází pouze GFAP. Většina GFAP ve 100 kDa komplexu je fosforylována. GFAP a EF1 α tvoří v membráně heterodimery, které jsou v přítomnosti GTP rozrušeny. Pod vlivem GTP je EF1 α uvolňován z membrány. EF1 α se nikdy nevyskytuje v komplexu s LAMP-2A. GFAP se k LAMP-2A váže selektivně. EF1 α ke své vazbě k lysosomální membráně potřebuje

GFAP. Pouze lysosomální isoforma EF1 α asociuje s lysosomy a mění náboj během aktivace CMA.[23]

2.4. Rnautofagie

Nejnověji objeveným typem autofagie je Rnautofagie. Během ní dochází k přímému transportu RNA (ribonukleová kyselina) do lysosomu, který vyžaduje hydrolýzu ATP.[2]

Receptorem pro tento typ autofagie je protein LAMP2C, jedna ze tří sestřihových variant proteinu LAMP2, který se nachází v membráně lysosomu. S LAMP2C interagují RNA-vazebné proteiny po navázání RNA. RNA interaguje přímo s LAMP2C, částečně s LAMP2B, což je ovšem interakce nefyziologická. S proteinem LAMP2A RNA neinteraguje.[2]

Tímto mechanismem je degradováno 10-20% RNA v živých buňkách [2].

3. Geny související s autofagií a jejich proteiny

Na autofagii v kvasinkách *S. cerevisiae* se podílí, kromě jiného, přes 30 Atg (autophagy related) proteinů. Z nich 16 je nezbytných pro tvorbu autofagosomu během hladovění. Vzájemné vztahy mezi těmito proteiny nejsou dosud příliš jasné. Pro alespoň částečné pochopení funkcí některých z nich, byla důležitým momentem identifikace pre-autofagosomální struktury (PAS). PAS je sestavována pomocí hierarchických interakcí mezi Atg proteiny.[58]

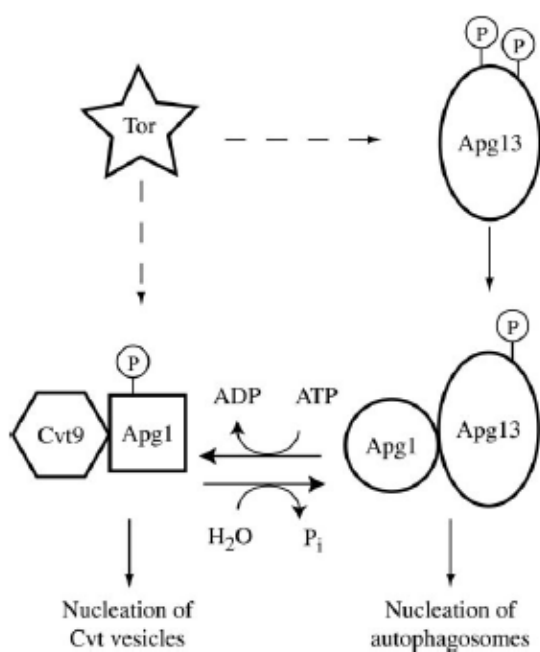
Wiebe H. Meijer a jeho spolupracovníci provedli analýzu protein-genomových databází kvasinek, vláknitých hub, *Arabidopsis thaliana* a člověka nebo alespoň některých genomových oblastí, pro která jsou dostupná data. Vycházeli z předpokladu, že konzervovaná sekvence odráží funkční ekvivalenci.[16]

Zjistili, že některé geny a jejich produkty mají své homologы od kvasinek až po člověka. Takovými jsou například ATG1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 16 a 18. Ale např. ATG22 a ATG17 byly nalezeny pouze u kvasinek a vláknitých hub. Stejně tak ATG29 nebyl nalezen u mnoha organismů. Ovšem některé další komponenty autofagie jako jsou Vps15 a Vps34 byly nalezeny u všech živočichů.[16] To nasvědčuje tomu, že Atg proteiny požadované pro neselektivní autofagii jsou vysoce konzervované. Ukazuje to také na důležitost procesu autofagie pro buněčné přežití a životaschopnost.

3.1. Kinázový komplex proteinu Atg1

Kvasinkový protein Atg1 (Apg1) je velký protein (897 aminokyselin) s N-koncovou protein kinázovou doménou. Jeho homology byly nalezeny u člověka, myši a dalších živočichů.[12]

Aktivace Atg1 indukuje autofagii (obr. 11). Klíčovou roli v aktivaci Atg1 hrají další Atg proteiny – proteiny Atg17 a Atg13. Protein Atg13 se k Atg1 váže svou centrální částí, aminokyselinami 432 až 520.[13] Pouze při podmínkách vedoucích k autofagii Atg1 interaguje s proteinem Atg13. Naopak při Cvt transportu k interakci nedochází. Autofagie není ovlivněna kinázovou aktivitou Atg1, ale je závislá na interakci s Atg13. Při přechodu Atg1 z autofagie a Cvt transportu dochází ke změně konformace proteinu. Posledních 18 C-terminálních aminokyselin je důležitých pro Cvt transport, vytváří specifické interakce, které jsou zrušeny po indukci autofagie. Na strukturních změnách Atg1 se zřejmě podílí protein Cvt9.[12]



Obrázek č. 11: Aktivace Atg1 v Tor dráze. Za normálních podmínek indukuje kinázová aktivita proteinu Tor autofosforylaci Atg1 kinázy a to buď přímým působením na Atg1 nebo přes modulaci fosforylace proteinu Atg13. Inhibice Tor má za následek částečnou defosforylaci Atg13 a pokles autofosforylace Atg1, který vede k defosforylaci a strukturní změně proteinu Atg1. Tato strukturní změna koreluje se zvýšenou interakcí Atg1 s proteinem Atg13 a spoluúčinkuje při ní protein Cvt9. Defosforylovaná forma Atg1 řídí (v interakci s Atg13) formování autofagosomu, zatímco fosforylovaná forma řídí nukleaci Cvt váčků. (převzato z Abeliovich, H. et al. Chemical genetic analysis of Apg1 reveals a nonkinase role in the

induction of autophagy. *Molecular Biology of the Cell* (2003); 14(2):477-490.)

Během Cvt transportu prochází Atg1 cykly fosforylace a defosforylace. Bez C-terminální oblasti zůstává Atg1 v autofagickém modu. Aminokyseliny 880 až 886 mají zřejmě specifickou roli pro funkci ve Cvt transportu. Mutace v L886 na glycin vede ke specifickému bloku Cvt. V této oblasti má protein strukturu alfa helixu.[12]

3.2. Konjugační systémy proteinu Atg12 a Atg8

V prodlužování izolovaných membrán PAS jsou zahrnuty dva „ubiquitin-like“ konjugační systémy založené na dvou Atg proteinech – Atg12 a Atg8, svou terciární strukturou (nikoliv sekvenční homologii) příbuzných ubiquitinu. V jednom z nich je protein Atg12 (v roli posttranslačního modifikátoru) aktivován a konjugován s proteinem Atg5 a poté tvoří komplex Atg12-Atg5-Atg16, který se váže k vnější izolované membráně. Ve druhém je protein Atg8 konjugován k lipidické složce – fosfatidylethanolaminu (PE) a posléze integrován do obou, vnitřní i vnější, membrán tvořícího se autofagosomu.[59, 10]

3.2.1. Konjugační systém proteinu Atg12

Atg12 byl prvním identifikovaným proteinem v autofagii, který měl prvky terciární struktury podobné ubiquitinu. Nejprve je Atg12 aktivován proteinem Atg7. Ten funguje jako E1 enzym ubiquitinového systému. Atg7, jiným názvem Cvt2, se thioesterovou vazbou váže na C koncový glycin Atg12 a vytváří spolu přechodný enzym-substrát komplex. Pro vytvoření přechodného komplexu Atg12 a Atg7 je esenciální ATP vazebná doména, stejně tak Cys⁵⁰⁷ proteinu Atg7. Protein Atg7 se převážně vyskytuje v cytoplazmě.[7] Následně je Atg12 přenesen k proteinu Atg10 (enzym podobný enzymu E2 ubiquitinového systému), který katalyzuje konjugaci Atg12 s proteinem Atg5 [11].

Ubiquitinu podobná C-koncová oblast Atg12 je nezbytná pro tvorbu komplexu Atg12-Atg5 a také pro autofagii [11]. Protein Atg5 se skládá ze tří domén, N-koncové „ubiquitin-like“ (Ubl) domény UblA a C-koncové „ubiquitin-like“ domény UblB, které jsou navzájem spojeny HR (helix-rich) doménou bohatou na alfa helixy. Celkem je Atg5 tvořeno 9 alfa helixy a 10 beta listy. Každá ubiquitin-like doména obsahuje dva alfa helixy a pět beta listů (homologie ubiquitin a „ubiquitin-like“ proteinů). Mezi jednotlivými doménami dochází k mnoha interakcím a ve výsledku tvoří globulární strukturu. Lys¹⁴⁹, který je lokalizován na alfa4 Atg5, která je součástí HR domény, je identifikován jako konjugační místo pro Atg12.[8]

Atg12-Atg5 konjugát pak interaguje dále s proteinem Atg16. Aminokyselinový zbytek F154 proteinu Atg12 je důležitý pro agregaci s Atg16. Jeho mutace mění biochemické vlastnosti komplexu, který pak agreguje v cytosolu.[11] Helix N-koncové domény Atg16 interaguje s Atg5. Přímá interakce Atg5 a Atg16 je nutná pro lokalizaci Atg16 do PAS, ale také pro účinnou tvorbu komplexu Atg8-PE.[8]

Atg5 je lokalizován na izolovaných membránách. Přičemž rozložení proteinu je velmi asymetrické. Většina se nachází na vnější straně, jen několik málo molekul na vnitřní. Téměř

žádný Atg5 se nevyskytuje na autofagosomech a autolysosomech, odpoj se krátce před, anebo po, vytvoření autofagosomu.[31]

Vytvoření komplexu Atg12-Atg5 není rozhodující pro lokalizaci Atg5 do membrány, ale pro elongaci izolovaných membrán do tvaru hrnku a autofagosomu. Atg12-Atg5 je primárně v cytosolu a velmi malá část je vázána na membránu. Po přechodu do podmínek hladovění dochází k akumulaci Atg5 na membráně.[31]

3.2.2. Konjugační systém proteinu Atg8

Tento druhý „ubiquitin-like“ konjugační systém zahrnuje konjugaci proteinu Atg8 k lipidické složce PE. Kvasinky mají pouze jeden ATG8 gen (kódující hydrofilní protein Atg8 o 117 aminokyselinách), zatímco savci mají několik genů kódujících proteiny podobné Atg8. Ty mohou být rozděleny do tří podrodin: i) protein LC3 (light chain 3), ii) GABARAB (c-aminobutyric acid (GABA) receptor associated protein) a GATE16 (Golgi-associated ATPase enhancer of 16kDa; GATE16 známý též jako GABARAPL2).[62, 9]

Proteiny Atg8 jsou syntetizovány jako prekurzory, jež jsou ihned štěpeny v jejich C-konci specifickou glycinovou proteázou Atg4.[63] Atg8 interaguje s Atg4, který je alelický k proteinu Aut2. Předpokládalo se, že Atg8 se váže na mikrotubuly právě přes Aut2 a tím se autofagosomy dostávají k vakuole, ovšem depolymerizace mikrotubulů nemá vliv na autofagii.[9]

Štěpení proteinem Atg4 vede k vytvoření C-koncového glycinu [63]. Karboxylová skupina koncového glycinu je aktivována enzymem Atg7, což je stejný enzym („E1-like“), který aktivuje Atg12. Aktivací vzniká thioesterová vazba mezi Atg8 a Atg7. Glycinový zbytek je pak přenesen k Atg3 („E2-like“ enzym) a tato interakce vede k tvorbě amidové vazby mezi PE a glycinovým zbytkem Atg8.[60]

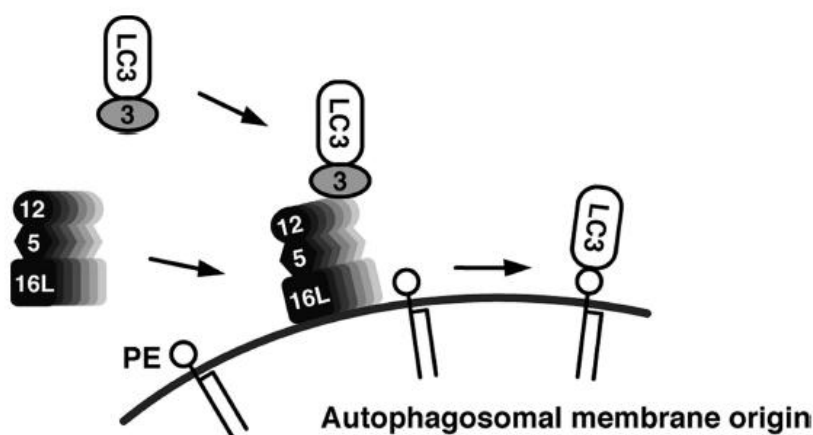
Při záměně cysteinu v pozici 234 za serin vytváří Atg8 a Atg3 stabilní komplex, esterová vazba s C-terminálním glycinem Atg8, a nemůže dojít k tvorbě Atg8-PE. Divoký typ vytváří vazbu nestabilní. Koncentrace Atg12-Atg5 má vliv na tvorbu Atg8-PE.[10]

I při růstových podmínkách dochází k expresi Atg8, ale během hladovění dochází ke zvýšení jeho transkripce. Žádné další Atg proteiny nejsou potřeba pro indukci Atg8. Atg8 se váže k membránovým strukturám. Při podmínkách růstu je Atg8 rozptýlen po cytoplazmě, ale jakmile buňka přejde do podmínek hladovění, shromažďuje se Atg8 v blízkosti vakuoly, do lumen autofagosomu. V maturovaných autofagosomech se ovšem vyskytuje pouze ojedinele. Atg8 se vyskytuje na povrchu zvlněného membránového vaku, strukturách s částečnou

dvoumembránou, polokruhových izolovaných membránách. Atg8 je potřebný k fúzi autofagosomu s vakuolou, porucha vede k akumulaci autofagosomů v cytoplazmě.[9]

Atg12-Atg5-Atg16 komplex má důležitou regulační roli v Atg8 konjugaci. Deficience nebo mutace Atg5 proteinu, která brání vytvoření Atg12-Atg5 komplexu zmaří téměř úplně konjugaci Atg8-PE.[11, 31] *In vitro* pokusy ukázaly, že Atg12-Atg5 konjugát zesiluje tvorbu Atg8-PE interakcí s Atg3 a stimulací jeho aktivit [10]. Atg16 je důležitý pro lokalizaci Atg8 v PAS [5]. Savčí Atg16L určuje místo LC3 lipidizace [35].

LC3 se vyskytuje v savčích buňkách ve dvou formách. První je LC3-I a druhou LC3-II (obrázek č. 12). LC3-I se vyskytuje v cytoplazmě, kdežto LC3-II je součástí membrán autofagosomů, na vnitřní i vnější. Po indukci autofagie se množství LC3-II zvyšuje.[30] LC3 je ve studiích běžně používaným markerem autofagosomů [6].



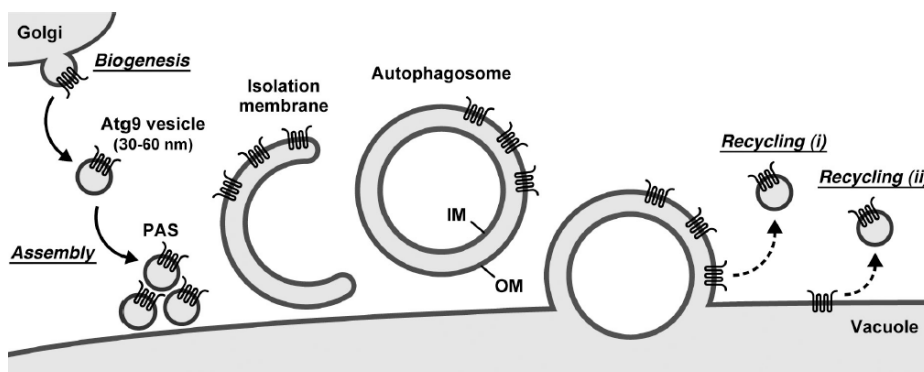
Obrázek č. 12: Vazba proteinu LC3 na autofagickou membránu. Komplex Atg12-Atg5-Atg16L se naváže na membránu autofagosomu. Tento komplex uvolní LC3 z jeho vazby s Atg3 a přeneseme ho na PE, který je součástí membrány autofagosomu. (převzato z Fujita, N. et al. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Molecular Biology of the Cell* (2008); 19(5):2092-2100.)

3.3. Atg9

Atg9 je membránový protein integrovaný do váčků odvozených od Golgiho aparátu, zvaných Atg9-váčky [61]. Tento protein funguje v časných fázích vzniku autofagosomu [26].

Zdroj Atg9 je v kvasinkách spojen s mitochondriemi. Atg9 koluje mezi mitochondrii a PAS prostřednictvím lipidické dvojvrstvy, protein je spojen s membránou. Molekuly Atg9 jsou schopny spolu interagovat a vytvářet klastry.[28] V klastrech se Atg9 nachází za optimálních podmínek. Tyto klastry se skládají z váčků o průměru 30-40nm a tubulárních struktur. Počet klastrů na buňku činí 1 až výjimečně 4. Protein je vždy na cytosolické straně lipidové dvojvrstvy. Klastr, vždy pouze jeden, může obklopovat Cvt komplex.[27] Při

podmínkách hladovění složky Cvt transportu podporují transport membrán obsahujících Atg9 do nově vznikajících autofagosomu a zpět. Atg9 prochází přes endoplazmatické retikulum a časný Golgiho aparát, a právě z časného Golgiho aparátu se musí dostat až do autofagosomu.[29] Odštěpování Atg9-váček, jejich zapojení do tvorby autofagosomu a recyklace zpět do cytoplasmy znázorněna na obr. 13.



Obrázek č. 13: Cyklus Atg9 proteinu. Atg9-váčky jsou odštěpeny z Golgiho aparátu, mají pouze jednu membránu. Během hladovění se Atg9 váčky stávají součástí PAS a následně vnější membrány autofagosomu. Po dokončení autofagosomu jsou klastry proteinu Atg9 recyklovány zpět do cytosolu: i) při fúzi autofagosomu s vakuolou, ii) z vakuolární membrány. (převzato z Yamamoto, H. et al. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. The Journal of Cell Biology (2012); 198(2):219-233.)

V kvasinkových buňkách divokého typu nelze rozlišit mezi PAS a Atg9 rezervoárem. Patrně klastry v blízkosti mitochondrií jsou právě oním rezervoárem, kde je nejvyšší koncentrace tohoto proteinu. PAS se potom projevuje jako Atg9 klastr v blízkosti vakuoly.[27]

Pro úplné pochopení vzájemného působení jednotlivých Atg proteinů při tvorbě autofagosomů bude třeba dalšího výzkumu.

4. Viry a autofagie

Autofagie je proces důležitý pro vývoj a homeostázi tkání. Je to vysoce regulovaná buněčná degradační dráha pro recyklaci proteinů a poškozených organel. Autofagie je také buňkou používána jako obranný mechanismus – proti vnitrobuněčným patogenům, včetně virů, při kterém patogeny, nebo jejich části mohou být uvězněny do autofagosomů a degradovány lysosomálními enzymy. Proteiny účastníci se autofagie hrají také roli v iniciaci vrozených i adaptivních odpovědí imunitního systému na virovou infekci. Na druhé straně byly pod evolučním tlakem selektovány u virů molekulární strategie, kterými viry tuto obranu

překonávají, aby se mohly v buňce replikovat, nebo dokonce autofagii zneužívají ve svůj prospěch.

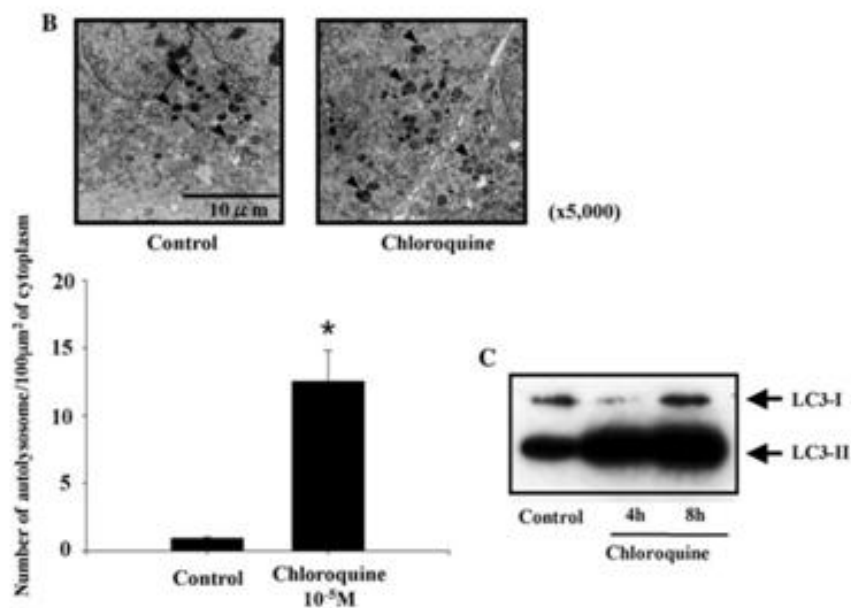
Jedním z virů, u nichž byl vliv autofagie na jejich replikaci studován a kterému autofagie pomáhá k účinné replikaci, je virus Hepatitidy C (HCV).

HCV je virus z rodiny *Flaviviridae* a jediný člen rodu *Hepacivirus*. Genom HCV (dlouhý 9600 nukleotidů) je jednořetězcová +RNA, funkčně se jedná o mRNA (messenger RNA) kódující polyprotein o délce 3000 aminokyselin. Polyprotein je po translaci rozštěpán hostitelskými a virovými proteázami na tři strukturální proteiny, tvořící kapsidu a obálku virionu, a šest nestrukturních virů sloužících k replikaci virové RNA. Primárně HCV infikuje hepatocyty, do kterých se dostává pomocí čtyř buněčných receptorů. Clatrinem-mediovaná endocytóza viru je krátce následovaná uvolněním virové RNA z obálky do cytoplasmy. Na specializovaném ER pak dochází k translaci a replikaci. Následné složení a uvolnění virionů je asociováno s lipoproteinovou dráhou.[54]

Po infekci virem HCV dochází ke zvětšování buněk, jejich lysosomálního kompartmentu. Infekce indukuje tvorbu autofagosomů (obrázek č. 14). Přesněji HCV infekce indukuje tvorbu Atg5 komplexů o vysoké molekulové hmotnosti.[36] Tento virus je také schopen vyvolat změnu proteinu LC3 (savčí ortholog kvasinkového Atg8) z cytosolické formy na membránovou formu LC3-II [37]. Ovšem replikační komplex HCV viru neasociuje s autofagickými vakuolami, ale vyskytuje se v nich virový obalový protein E1 (envelope 1) [36].

HCV nezvyšuje degradaci proteinů prostřednictvím autofagie. V buňkách, které jsou infikovány virem HCV, neprobíhá účinně fúze autofagosomů s lysosomy. Zablokování autofagie a akumulace autofagosomů má za následek pokles replikace viru.[37]

Chloroquin, který zvyšuje pH lysosomu a inhibuje lysosomální proteázu, inhibuje replikaci HCV bez toxického účinku na buňky. Chloroquin v kombinaci s IFN α (interferon α) výrazně snižuje replikaci HCV, ale tento účinek chloroquinu je na interferonové dráze nezávislý. Přidání chloroquinu mnohonásobně zvyšuje počet autofagosomů na buňku, ale degradace proteinů je snížena, je narušena autofagická proteolýza. Tyto výsledky naznačují, že replikace HCV využívá mašinerie zahrnující buněčnou autofagickou proteolýzu [39].



Obrázek č. 14: Inhibiční efekt chloroquinu na autofagii – hromadění autofagosomů v cytosolu. B) Metodou elektronové mikroskopie vizualizován počet autofagosomů (kontrola a buňky opůsobené chloroquinem). C) Analýza proteinu LC3 metodou Western blot. (převzato z Mizui, T. et al. Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy. *Journal of Gastroenterology* (2010); 45(2):195-203.)

Infekce HCV indukuje autofagii a také odpověď na nesbalené proteiny (UPR; unfolded protein response). UPR je odpověď na buněčný stres spojený s endoplasmatickým retikulem (v tomto případě vyvolaný přítomností glykoproteinů tvořící obal viru). UPR je aktivována v odpovědi na hromadění špatně poskládaných proteinů v lumen ER. Jejím cílem je obnovit normální funkci buňky pozastavením translace a aktivováním signální dráhy vedoucí ke zvýšené produkci chaperonů. O aktivaci UPR se soudilo, že je odpovědná za následnou indukci autofagie. Výsledky studie Bjorn-Patricka Mohla a spolupracovníků ukázala, že HCV je schopen indukovat oba tyto buněčné procesy. Ukázala ale také to, že indukce autofagie virem HCV je nezávislá na indukci UPR. Zatímco zablokování UPR neblokuje replikaci HCV, autofagické proteiny jsou pro účinnou replikaci požadovány.[44]

Rozpoznání virové RNA receptory vrozené imunitní odpovědi spouští produkci protivirotických molekul, např. interferonu α a β a dalších cytokinů, které kontrolují infekci a zesilují imunitní odpovědi. Virové RNA jsou rozpoznávány cytosolickými receptory a „Toll-like“ receptory (TLRs) přítomnými v endosomálních a lysosomálních kompartmentech buněk.[64]

Bylo nedávno zjištěno, že proteiny autofagie jsou klíčovými regulátory vrozené odpovědi hostitele na virovou infekci tím, že aktivují (nebo inaktivují) indukci protivirových molekul v infikovaných buňkách [65]. Inhibice procesu autofagie (umlčením exprese Beclinu 1 – savčího orthologu kvasinkového Atg6) v hepatocytech infikovaných HCV aktivovala signalizační dráhu interferonu a indukovala apoptózu. Byla tak redukována virová replikace. Při inhibici autofagie umíralo cca 70% buněk infikovaných HCV, při fungující autofagii jen cca 20%. [38]

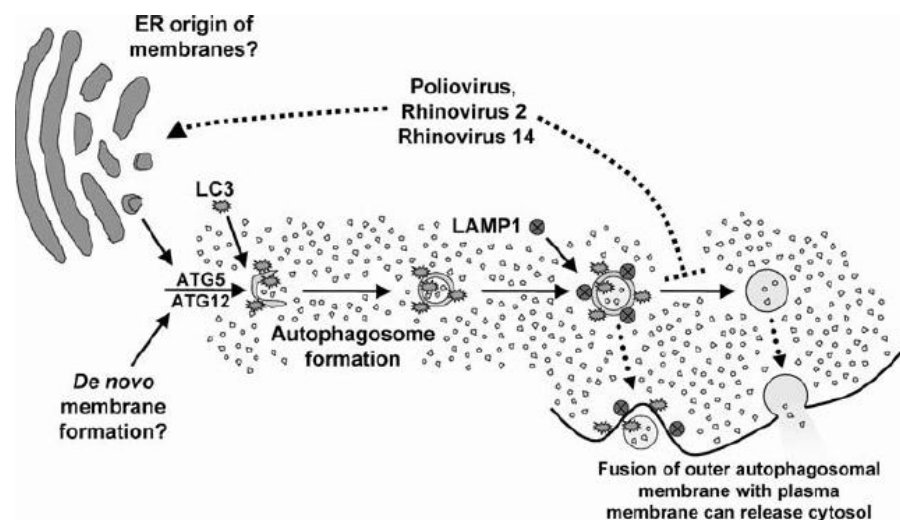
Autofagie indukovaná infekcí HCV tedy potlačuje vrozenou imunitu, produkci interferonů, a umožní tak viru HCV persistovat [38].

Dalšími viry využívající autofagii pro svou replikaci jsou zástupci čeledi *Picornaviridae*. Poliovirus, původce dětské obrny, je virus patřící do rodu *Enterovirus*. Tato čeleď spadá do řádu *Picornavirales*, ve které se nachází mnoho lidských a zvířecích patogenů. Genom polioviru je jednořetězcová +RNA. 5' konec genomu je kryt peptidem o 22 aminokyselinách, na 3' konci je poly(rA) řetězec. Genom kóduje jediný polyprotein o délce cca 3000 aminokyselin, který je štěpen na jednotlivé proteiny. Pomocí buněčného receptoru se virus dostává do buňky, protein na 5' konci buněčným aparátem odstraněn, genom je translatován a replikován a vytváří se nové viriony. [55]

O polioviru je dlouho známo, že indukuje tvorbu váčků s dvojitou membránou, jejichž povrch využívá jako místa pro replikaci virové RNA [66]. Původ těchto váčků nebyl jasný. Experimentální data Jacksona a spolupracovníků [40] přinášejí důkazy o tom, že poliovirus a také příbuzný rhinovirus indukují tvorbu autofagosomálních struktur, které tyto viry využívají jako lešení pro replikaci jejich genomové RNA. Replikační aparát polioviru se tedy sestavuje na membránách autofagosomů (obrázek č. 15). Nestrukturní poliovirové proteiny 2BC a 3A indukují maturaci autofagosomu. Míra aktivity autofagie koreluje s úrovní replikace viru. Je tedy zřejmé, že ačkoliv autofagie může sloužit jako obrana proti invazi vnitrobuněčných patogenů, poliovirus využívá tento proces ve svůj prospěch. Autofagie poliovirus neničí. Degradací Atg12 a LC3 (savčí ortholog Atg8) dojde k mnohonásobnému snížení výnosů replikace polioviru. Autoři této studie navíc postulovali, že vedle funkce autofagosomů v replikaci poliovirové RNA, umožňují tyto struktury (fúzí s cytoplasmatickou membránou) viru uvolnit se z buněk pro další infekci ještě před jejich lyzí. [40]

Tři z nestrukturních proteinů polioviru, 2B, 2C a 3A, které jsou, vedle virové polymerázy nezbytné pro replikaci virové RNA asociují s membránami. V další práci [43] bylo ukázáno, že samostatná produkce stabilního proteinového prekurzoru 2BC a proteinu 3A

(v kombinaci, nikoliv odděleně) indukuje tvorbu váčků s dvojitou membránou tak, jak se to děje při poliovirové infekci. Prekurzorový protein 2BC indukuje tvorbu formy LC3-II.[43]



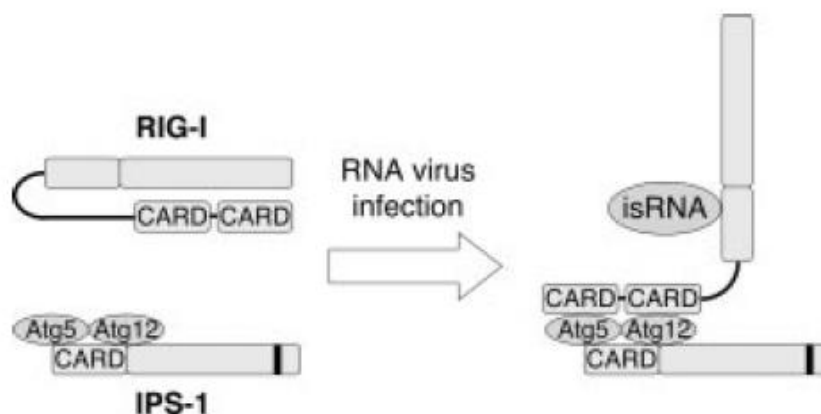
Obrázek č. 15: Model interakce polioviru s autofagosomálními strukturami. Poliovirus a jemu příbuzné viry indukují tvorby autofagosomálních struktur, ale blokují maturaci autofagosomu, aby předešly degradaci jeho fúzí s lysosomem. Namísto toho vnější membrána autofagosomu fúzuje s plasmatickou membránou a virus opouští buňku ještě před její lýzí. Proteiny Atg5, Atg12 a LC3 regulují vznik autofagosomu. Protein LAMP1 označuje autofagosomy připravené k maturaci. (převzato z Jackson, W. T. et al. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. PLoS Biology (2005); 3(5):e156.)

Při studiu infekce virem vezikulární stomatitidy (VSV) bylo ukázáno, že autofagie nemá ani pro tento virus destruktivní roli, ale místo toho přispívá k inhibici protivirové interferonové odpovědi, čímž umožní viru se replikovat [42].

VSV (Vesicular Stomatitis Virus) patří mezi *Rhabdoviridae*, která obsahuje více než 150 virů živočichů a rostlin. Konkrétně tento virus spadá do rodu *Vesiculovirus*. Existují dva hlavní sérotypy VSV, New Jersey a Indiana, které infikují hmyz a savce, způsobují ekonomické škody chovných zvířat. Genom tohoto viru (dlouhý 11-12 tisíc nukleotidů) je v podobě jednořetězcové minus RNA, takže musí být nejprve přepsán do mRNA, aby mohl být translatován. Genom kóduje pět virových proteinů. Virová RNA je ve virionu obklopena nukleoproteinem, dále si s sebou do hostitele přináší RNA-dependentní RNA polymerázu protein L a fosfoprotein P. Obal viru fúzuje s lipidovou dvojrůstvou hostitelské buňky, genom je uvolněn do cytoplasmy.[56]

Komplex Atg5-Atg12, který je klíčovým regulátorem autofagie hraje také důležitou roli v mechanismech vrozené antivirové odpovědi. Bylo ukázáno, že myší fibroblasty deficientní v expresi ATG5 byly rezistentní na VSV infekci. Důvodem byla hyperprodukce

interferonu typu I v odpovědi na imunostimulační RNA (isRNA), kterou mohou být úseky dsRNA (double-strand RNA) nebo 5' fosforylovaná RNA virového původu. Podobně silná interferonová odpověď byla zaznamenána i v buňkách deficientních na Atg7, ve kterých je rovněž inhibována konjugace Atg5-Atg12. Bylo zjištěno, že Atg5-Atg12 konjugát negativně reguluje dráhu indukující interferon typu I přímou interakcí s RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) a IPS-1 (IFN promoter stimulator; protein stimulující interferonový promotor). Model navržený autory studie (obrázek č. 16) předpokládá, že (i) Atg5-Atg12 konjugát interaguje s IPS-1 i za fyziologických podmínek, ale s RIG-I, který rozpoznává virové isRNA, jen velmi slabě. (ii) Infekce VSV a případně dalšími RNA viry může způsobit konformační změnu RIG-I a dovolí N-koncovými CARD (caspase recruitment domain) doménami interagovat s CARD IPS-1. (iii) Atg5-Atg12 konjugát se vkládá mezi CARD domény RIG-I a IPS-1 a inhibuje transmissi signálu vedoucího k tvorbě interferonu.[42]



Obrázek č. 16: Interakce IPS-1 a RIG-I prostřednictvím konjugačního komplexu Atg12-Atg5. Virové isRNA se vázají na RIG-I, čímž se uvolní jeho CARDs domény, které interagují s komplexem Atg5-Atg12, který rovněž interaguje s CARD na IPS-1. Výsledek této interakce je inhibice dráhy vedoucí k indukci interferonu. (převzato z Jounai, N. et al. The Atg5-Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. PNAS (2007); 104(35):14050-14055.)

Některé viry, jako např. zástupci čeledi *Herpesviridae*, vyvinuly naopak strategii jak potlačit autofagii, aby zabránily jejím nežádoucím protivirovým účinkům [57, 45].

Herpes Simplex virus 1 (HSV-1; HHV1) a další lidské herpesviry, např. HHV8 (lidský herpes virus 8, spojovaný s Kaposiho sarkomem) inhibují tvorbu autofagosomu. Např. HSV-1 kóduje protein ICP34.5, který se váže k proteinu Beclin-1 (savčímu orthologu kvasinkového Atg6) a tím inhibuje jeho interakci s proteinem Vps34 (fosfoinositol kináza požadovaná pro iniciaci tvorby autofagosomu) a zabrání tvorbě autofagosomu. HHV8 kóduje homolog buněčného proteinu Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), který váže Beclin-1 s mnohem vyšší afinitou

než buněčný Bcl-2 a opět brání jeho interakci s Vps34. Zajímavé je, že delece proteinu ICP34.5 u HSV vede k hromadění virových částic HSV v autofagosomálních strukturách.[67]

Protein ICP34.5 může inhibovat autofagii ještě jedním mechanismem, a sice schopností mařit funkci kinázy PKR, což je kináza inducibilní interferonem a aktivovatelná dsRNA, která fosforyluje mimo jiné, translační faktor eIF2 α a zastavuje proteosyntézu. Bylo dokumentováno, že funkční PKR kináza je v savčích buňkách požadována pro indukci autofagie.[45]

Pozorování, že protein ICP34.5 inhibuje indukci autofagie v infikovaných buňkách přinejmenším dvěma mechanismy, ukazuje na roli autofagie v buněčné obraně proti herpesvirové infekci.

Je zjevné, že viry vyvinuly nejrůznější strategie pro zabránění autofagii, nebo naopak pro její zneužití.

Nedávná studie Isabel Pombo Grégoire a spolupracovníků [41] identifikovala pomocí kvasinkového dvojhybridového systému a bioinformatické analýzy 83 proteinů kódovaných RNA viry různých čeledí (*Paramyxoviridae*, *Flaviviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Togaviridae*, *Retroviridae*), které interagovaly se 44 proteiny lidských buněk, které mají nějakou funkci v autofagii. Identifikované proteiny představují více než 35% proteinů autofagie. Zajímavé je, že viry všech pěti čeledí interagovaly s proteinem IRGM (immunity-associated GTPase family M), jehož role v autofagii namířené proti bakteriím byla popsána [68, 48]. Absence tohoto proteinu je nepříznivá pro replikaci HCV a také např. HIV (Human Immunodeficiency Virus). Tato data ukazují, že i rozdílné viry mohou užívat podobné strategie v interakcích s autofagií. Na druhé straně, i jeden virus může atakovat autofagii na mnoha úrovních a interferovat s proteiny autofagie různými způsoby. Na základě studia protein-proteinových interakcí a s využitím bioinformatiky se podařilo autorům studie [41] vytvořit síť proteinů asociovaných s autofagií, která je velmi propojeným systémem, ve kterém jen několik málo proteinů spojeno jen s jedním dalším proteinem a jen několik málo z nich působí izolovaně. Atg proteiny interagují s velkým množstvím dalších proteinů. Jen některé z nich mají svou hlavní roli v autofagii, např. Atg3, Atg4, Atg7. Řada z nich má své hlavní funkce jinde, např. Bcl-2, Atg5, Atg12. Dochází k propojování mnoha buněčných drah. Proteiny účastníci se těchto drah mají dvě důležité vlastnosti, schopnost interagovat s dalšími proteiny a své důležité místo v této síti.[41] Bude zapotřebí ještě mnoho experimentálního úsilí k detailnímu pochopení mechanismů autofagie i způsobů jakým s nimi viry interferují. Je však naděje, že by právě interference virů s autofagií mohla představovat cíl účinných zásahů protivirové terapie.

5. Závěr

Autofagie je buněčný mechanismus, na kterém se podílí obrovské množství proteinů a regulačních molekul. Proto jsem v této práci musela provést určitou selekci. Jen interakce mezi jednotlivými autofagickými proteiny a regulační dráhy zapojené v procesu autofagie by vydaly na samostatné práce.

Autofagie je indukována za různých podmínek, jako je hladovění na dusík nebo uhlík, oxidační stres, virová infekce, působení látek různého účinku. Každá z těchto podmínek jistě vyvolává, alespoň částečně odlišnou, odpověď. Tyto rozdíly by bylo třeba detailněji prostudovat, avšak rozsah této práce to neumožňuje, stejně jako je tomu u mnohých autofagických proteinů.

Jednotlivé typy autofagie, ačkoliv mají stejné jádro v podobě základních autofagických proteinů, se vzájemně liší. Jejich aktivace je rozdílná a jak jsem ve své práci poukázala, mohou být částečně zastupitelné.

Obecně je autofagie velmi složitým procesem jehož se účastní mnoho molekulárních interakcí. Navíc je tento proces velmi provázán s dalšími buněčnými mechanismy.

Bazální úroveň autofagie probíhá i v „normálních“, nijak nestrádajících, buňkách. Ovšem při „odchylkách“ od normálního fyziologického stavu se její úroveň prudce zvýší.

Takovým případem je i autofagie vyvolaná virovou infekcí. Můžeme se setkat s dvěma možnostmi. Jednou je autofagie pro virus podporující složkou, bez ní by nedocházelo k účinné infekci, např. je inhibována interferonová signální dráha nebo se replikační komplex virové nukleové kyseliny sestavuje na autofagosomech. V té druhé se autofagie jeví jako součást protivirové obrany, vedoucí např. ke snížení tvorby infekčních virových částic. Viry však vyvinuly během evoluce funkce, kterými se snaží tuto obranu překonávat. V obou případech může autofagie představovat cíl kde zasáhnout, utlumit a léčit virovou infekci.

Vzhledem k rozsáhlosti tématu jsem tedy mohla jen v poměrně hrubých rysech nastínit danou problematiku. K hlubšímu porozumění a prozkoumání je zapotřebí dalšího studia.

6. Seznam použitých zkratk

AB – autofagická tělíska
AP – autofagosom
ADH – alkohol dehydrogenáza
ADP – adenosindifosfát
AP1 – clatrin adapterový protein
API – vacuolar hydrolase aminopeptidase I
Arf6 – ADP ribosylační faktor 6
ARNO – Arf nucleotide binding site opener
ATG – autophagy-related
ATP – adenosintrifosfát
Avt – pozdní autofagické vakuoly
Avi – časně autofagické vakuoly
BAG – Bcl-2-associated athanogene
Bcl-2 – B-cell lymphoma 2
CARD – caspase recruitment domain
Cdk1 – cyklin dependentní kináza 1
CMA – chaperonem zprostředkovaná autofagie
COP II – coatmer protein II
Cvt – cytoplasma-vakuolární transport
dsRNA – double-strand RNA
E1 – envelope 1
eIF2 α – eukaryotický iniciační faktor 2- α
EF1 α – elongační faktor 1 alfa
ER – endoplasmatické retikulum
ESCRT – endosomální sortující komplexy
FCCP – carbonylcyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone
G – Golgiho aparát
GABARAB – γ -aminobutyric acid (GABA) receptor associated protein
GATE16 – Golgi-associated ATPase enhancer of 16kDa
GFAP – gliový fibrilární kyselý protein
GDP – guanosindifosfát

GM1 – monosialotetrahexosylganglioside
GTP – guanosintrifosfát
GTP γ S – guanosine 5'-3-*O*-(thio)triphosphate
HCV – Hepatitis C virus
HIV – Human Immunodeficiency Virus
HR – helix-rich
Hsc – heat shock cognate
HSV/HHV – Herpes Simplex virus
IFN – interferon
IPS-1 – IFN promoter stimulator
isRNA – imunostimulační RNA
IRGM – immunity-associated GTPase family M
JNK – C-Jun N-terminal protein kinase
K252a – ((9*S*-(9 α ,10 β ,12 α))-2,3,9,10,11,12-hexahydro-10-hydroxy-10-(methoxycarbonyl)-9-methyl-9,12-epoxy-1*H*-diindolo[1,2,3-*fg*:3',2',1'-*kl*]pyrrolo[3,4-*i*][1,6]benzodiazocin-1-one)
L-2A – LAMP-2A
LAMP – lysosom asociovaný membránový protein
LC3 – light chain 3
LE – pozdní endosom
LMA1 – low Mr activity 1
L. Mb – lysosomální membrána
L. Mtx – lysosomální matrix
MAPK – mitogen-activated protein kinase
mRNA – messenger RNA
MVB – multivesicular bodies
NSF – N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein
PAS – pre-autofagosomální struktura
PE – fosfatidylethanolamin
PGK – fosfoglycerol kináza
PI3 – fosfatidylinositol-3
PMN – Piecemeal Microautophagy of the Nucleus – částečná mikroautofagie jádra
PMSF – Phenylmethanesulfonylfluoride
PtdIns3K – phosphatidylinositol 3-kinase
PtdIns3P – fosfatidylinositol-3-fosfát

proALP – precursor form of alkaline phosphatase
proAPI – precursor form of API
rER – drsné ER
RIG-I – retinoic acid-inducible gene I
RNA – ribonukleová kyselina
SNAP – soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein
SNARE – SNAP receptor
TGN – Trans Golgi Network
TLRs – „Toll-like“ receptory
Tor – Target of Rapamycin
Ubl – ubiquitin-like
ULK – Unc-51-like kinase
UPR – unfolded protein response
UPS – ubiquitin proteosomální systém
V – vakuola
Vps30 – vacuolar protein sorting 30
VSV – Vesicular Stomatitis Virus

7. Seznam použité literatury

- [1] Baba, M. et al. Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *The Journal of Cell Biology* (1994); 124(6):903-913.
- [2] Fujiwara, Y. et al. Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy* (2013); 9(3):403-409.
- [3] Dunn, W. A. Jr. Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *The Journal of Cell Biology* (1990); 110(6):1935-1945.
- [4] Baba, M. et al. Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *The Journal of Cell Biology* (1997); 139(7):1687-1695.
- [5] Suzuki, K. et al. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *The EMBO Journal* (2001); 20(21):5971-5981.

- [6] Guo, Y. et al. AP1 is essential for generation of autophagosomes from the trans-Golgi network. *Journal of Cell Science* (2012); 125(7):1706-1715.
- [7] Tanida, I. et al. Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Molecular Biology of the Cell* (1999); 10(5):1367-1379.
- [8] Matsushita, M. et al. Structure of Atg5·Atg16, a complex essential for autophagy. *The Journal of Biological Chemistry* (2007); 282(9):6763-6772.
- [9] Kirisako, T. et al. Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *The Journal of Cell Biology* (1999); 147(2):435-446.
- [10] Hanada, T. et al. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *The Journal of Biological Chemistry* (2007); 282(52):37298-37302.
- [11] Hanada, T., Ohsumi, Y. Structure-function relationship of Atg12, a ubiquitin-like modifier essential for autophagy. *Autophagy* (2005); 1(2):110-118.
- [12] Abeliovich, H. et al. Chemical genetic analysis of Apg1 reveals a nonkinase role in the induction of autophagy. *Molecular Biology of the Cell* (2003); 14(2):477-490.
- [13] Kamada, Y. et al. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *The Journal of Cell Biology* (2000); 150(6):1507-1513.
- [14] Ishihara, N. et al. Autophagosome requires specific early Sec proteins for its formation and NSF/SNARE for vacuolar fusion. *Molecular Biology of the Cell* (2001); 12(11):3690-3702.
- [15] Takeshige, K. et al. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *The Journal of Cell Biology* (1992); 119(2):301-311.
- [16] Meijer, W. H. et al. ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes. *Autophagy* (2007); 3(2):106-116.
- [17] Kunz, J. B. et al. Determination of four sequential stages during microautophagy *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry* (2004); 279(11):9987-9996.
- [18] Sahu, R. et al. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Developmental Cell* (2011); 20(1):131-139.
- [19] Krick, R. et al. Piecemeal microautophagy of the nucleus requires the core macroautophagy genes. *Molecular Biology of the Cell* (2008); 19(10):4492-4505.
- [20] Bandyopadhyay, U. et al. The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Molecular and Cellular Biology* (2008); 28(18):5747-5763.

- [21] Kaushik, S. et al. Lysosome membrane lipid microdomains: novel regulators of chaperone-mediated autophagy. *The EMBO Journal* (2006); 25(17):3921-3933.
- [22] Kaushik, S. et al. Constitutive activation of chaperone-mediated autophagy in cells with impaired macroautophagy. *Molecular Biology of the Cell* (2008); 19(5):2179-2192.
- [23] Bandyopadhyay, U. et al. Novel regulators of chaperone-mediated autophagy. *Molecular Cell* (2010); 39(4):535-547.
- [24] Eskelinen, E.-L. et al. Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular Biology of the Cell* (2002); 13(9):3355-3368.
- [25] Rothenberg, C. et al. Ubiquitin functions in autophagy and is degraded by chaperone-mediated autophagy. *Human Molecular Genetics* (2010); 19(16):3219-3232.
- [26] Orsi, A. Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Molecular Biology of the Cell* (2012); 23(10):1860-1873.
- [27] Mari, M. et al. An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. *The Journal of Cell Biology* (2010); 190(6):1005-1022.
- [28] Reggiori, F. et al. Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy* (2005); 1(2):101-109.
- [29] Ohashi, Y., Munro, S. Membrane delivery to the yeast autophagosome from the Golgi-endosomal system. *Molecular Biology of the Cell* (2010); 21(22):3998-4008.
- [30] Kabeya, Y. et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal* (2000); 19(21):5720-5728.
- [31] Mizushima, N. et al. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *The Journal of Cell Biology* (2001); 152(4):657-668.
- [32] Bernales, S. et al. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biology* (2006); 4(12):e423.
- [33] Dawaliby, R., Mayer, A. Microautophagy of the nucleus coincides with a vacuolar diffusion barrier at nuclear-vacuolar junctions. *Molecular Biology of the Cell* (2010); 21(23):4173-4183.
- [34] Ungermann, C. et al. A vacuolar v-t-SNARE complex, the predominant form in vivo and on isolated vacuoles, is disassembled and activated for docking and fusion. *The Journal of Cell Biology* (1998); 140(1):61-69.
- [35] Fujita, N. et al. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Molecular Biology of the Cell* (2008); 19(5):2092-2100.

- [36] Ait-Goughoulte, M. et al. Hepatitis C virus genotype 1a growth and induction of autophagy. *Journal of Virology* (2008); 82(5):2241-2249.
- [37] Sir, D. et al. Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology* (2008); 48(4):1054-1061.
- [38] Shrivastava, S. et al. Knockdown of autophagy enhances innate immune response in hepatitis C virus infected hepatocytes. *Hepatology* (2011); 53(2):406-414.
- [39] Mizui, T. et al. Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy. *Journal of Gastroenterology* (2010); 45(2):195-203.
- [40] Jackson, W. T. et al. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biology* (2005); 3(5):e156.
- [41] Grégoire, I. P. et al. IRGM is a common target of RNA viruses that subvert the autophagy network. *PLoS Pathogens* (2011); 7(12):e1002422.
- [42] Jounai, N. et al. The Atg5–Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *PNAS* (2007); 104(35):14050-14055.
- [43] Taylor, M. P., Kirkegaard, K. Modification of cellular autophagy protein LC3 by poliovirus. *Journal of Virology* (2007); 81(22):12543-12553.
- [44] Mohl, B. P. et al. Hepatitis C virus-induced autophagy is independent of the unfolded protein response. *Journal of Virology* (2012); 86(19):10724-10732.
- [45] Tallóczy, Z. et al. Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2 α kinase signaling pathway. *PNAS* (2002); 99(1):190-195.
- [46] Lee, S. B. et al. ATG1, an autophagy regulator, inhibits cell growth by negatively regulating S6 kinase. *EMBO Reports* (2007); 8(4):360-365.
- [47] Wei, Y. et al. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Molecular Cell* (2008); 30(6):678-688.
- [48] Singh, S. B. et al. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* (2006); 313(5792):1438-1441.
- [49] Tasdemir, E. et al. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nature Cell Biology* (2008); 10(6):676-687.
- [50] *He, C., Klionsky, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual Review of Genetics* (2009); 43:67-93.
- [51] Gamerding, M. et al. Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *The EMBO Journal* (2009); 28(7):889-901.
- [52] Furuya, T. et al. Negative regulation of Vps34 by Cdk mediated phosphorylation. *Molecular Cell* (2010); 38(4):500-511.

- [53] Moreau, K. et al. Arf6 promotes autophagosome formation via effects on phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phospholipase D. *The Journal of Cell Biology* (2012); 196(4):483-496.
- [54] *Wilson, G. K., Stamataki, Z. In vitro systems for the study of hepatitis C virus infection. *International Journal of Hepatology* (2012); 2012:292591.
- [55] *Cameron, C. E. et al. Expanding knowledge of P3 proteins in the poliovirus lifecycle. *Future Microbiology* (2010); 5(6):867-881.
- [56] *Sun, X. et al. Internalization and fusion mechanism of vesicular stomatitis virus and related rhabdoviruses. *Future Virology* (2010); 5(1):85-96.
- [57] *Salameh, S. et al. Early event in herpes simplex virus lifecycle with implications for an infection of lifetime. *The Open Virology Journal* (2012); 6:1-6.
- [58] Suzuki, K. et al. Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes to Cells* (2007); 12(2):209-218.
- [59] *Shpilka, T. et al. Ubiquitin-like proteins and autophagy at a glance. *Journal of Cell Science* (2012); 125:2343-2348.
- [60] Ichimura, Y. et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* (2000); 408(6811):488-492.
- [61] Yamamoto, H. et al. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *The Journal of Cell Biology* (2012); 198(2):219-233.
- [62] Weidberg, H. et al. LC3 and GATE-16/GABARAP superfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *The EMBO Journal* (2010); 29(11):1792-1802.
- [63] Kirisako, T. et al. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *The Journal of Cell Biology* (2000); 151(2):263-276.
- [64] *Kawai, T., Akira, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology* (2009); 21(4):317-337.
- [65] *Dreux, M., Chisari, F. V. Impact of the autophagy machinery on hepatitis C virus infection. *Viruses* (2011); 3(8):1342-1357.
- [66] Schlegel, A. et al. Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *Journal of Virology* (1996); 70(10):6576-6588.
- [67] * Chiramel, A. I. et al. Divergent roles of autophagy in virus infection. *Cells* (2013); 2:83-104.
- [68] McCarroll, S. A. et al. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered expression and Crohn's disease. *Nat Genet* (2008); 40(9):1107-1112.