

# Univerzita Karlova v Praze

## Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie (Fyziologie buňky)



**Bc. Ivana Žigová**

Úloha autofágie v indukci apoptózy mastnými kyselinami u  
pankreatických  $\beta$  buniek

The role of autophagy in apoptosis induction by  
fatty acids in pancreatic  $\beta$ -cells

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Vlasta Němcová, PhD.

Praha, 2013

Ďakujem kolektívu na Oddělení buněčné a molekulární biologie 3. LF a všem,  
ktorí prispeli k vzniku tejto práce.

Zvláštne poďakovanie patrí mojim rodičom, sestre a Michalovi Ferencovi.

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, 30. 4. 2013

.....

Podpis

# Obsah

<b>POUŽITÉ SKRATKY</b> .....	5
<b>1 ABSTRAKT</b> .....	8
<b>2 ABSTRACT</b> .....	9
<b>3 LITERÁRNY PREHĽAD</b> .....	10
3.1 Úvod .....	10
3.2 Apoptóza .....	11
3.2.1 Mechanizmus aktivácie apoptózy .....	11
3.2.1.1 Aktivácia kaspáz .....	12
3.2.1.2 Receptorom sprostredkovaná aktivácia apoptózy .....	13
3.2.1.3 Aktivácia mitochondriálnej dráhy apoptózy .....	14
3.2.1.4 Exekúčná fáza apoptózy .....	14
3.3 Autofágia .....	16
3.3.1 Typy autofágie .....	16
3.3.2 Molekulárny mechanizmus autofágie .....	18
3.3.2.1 Základný priebeh autofagickej dráhy .....	18
3.3.2.2 Výber materiálu pre degradáciu .....	18
3.3.2.3 Iniciácia a formovanie autofagozómu .....	20
3.3.2.4 Elongácia fagofóru .....	21
3.3.2.4.1 Konjugácia Atg5 s Atg12 .....	21
3.3.2.4.2 Konjugácia LC3 s PE .....	22
3.3.2.5 Fúzia autofagozómu s lyzozómom a degradácia materiálu .....	23
3.3.2.6 Regulácia autofágie .....	24
3.4 Úloha autofágie vo fyziológii a patofyziológii .....	25
3.5 Vzájomný vzťah autofágie a apoptózy .....	26
3.6 Autofágia a apoptóza u pankreatických $\beta$ buniek .....	27
3.6.1 Indukcia apoptózy masnými kyselinami u pankreatických $\beta$ buniek .....	27
3.6.2 Indukcia autofágie pôsobením masných kyselín u pankreatických $\beta$ buniek .....	29
3.7 Metódy pre štúdium autofágie .....	30
3.7.1 Detekcia autofagozómov a autofagolyzozómov .....	30
3.7.2 Metódy založené na sledovaní proteínových markerov autofágie .....	31
3.7.3 Monitorovanie autofagickeho toku .....	32
3.7.4 Modulatory autofágie použité v experimentoch tejto diplomovej práce .....	32
3.7.5 Umlčanie expresie esenciálnych proteínov autofágie pomocou siRNA .....	34
3.8 Mechanizmus indukcie apoptózy masnými kyselinami u $\beta$ buniek línie NES2Y .....	34
<b>4 CIELE PRÁCE</b> .....	36
<b>5 MATERIÁL</b> .....	37
5.1 Použité chemikálie .....	37
5.2 Použité kity a súpravy .....	38
5.3 Použité prístroje .....	38
5.4 Základné roztoky používané pri kultivácii buniek a aplikácii masných kyselín .....	39
5.5 Roztoky masných kyselín .....	41
5.5.1 Príprava zásobných roztokov masných kyselín viazaných na BSA .....	41
5.5.2 Stanovenie koncentrácie masných kyselín .....	41

5.6	Zásobné roztoky autofagických modulátorov .....	42
5.7	Ďalšie použité roztoky .....	42
<b>6</b>	<b>METÓDY</b> .....	<b>44</b>
6.1	Kultivácia buniek.....	44
6.1.1	Bunkový model.....	44
6.1.2	Pasážovanie .....	44
6.2	Experimenty.....	45
6.2.1	Experimentálne podmienky .....	45
6.2.2	Nasadenie buniek pre experimenty.....	45
6.2.3	Aplikácia mastných kyselín.....	46
6.2.4	Aplikácia autofagických modulátorov.....	47
6.2.4.1	Inhibícia autofágie.....	47
6.2.4.2	Aktivácia autofágie .....	47
6.2.5	Aplikácia siRNA.....	49
6.3	Detekcia expície proteínov metódou western blot.....	50
6.3.1	Príprava proteínových lyzátov.....	50
6.3.1.1	Lyzovanie buniek v kultivačnom plastiku .....	50
6.3.1.2	Lyzovanie buniek pomocou trypsínu .....	50
6.3.1.3	Stanovenie koncentrácie proteínov v lyzátoch.....	51
6.3.2	Elektroforéza SDS-PAGE .....	52
6.3.3	Western blot.....	53
6.4	Analýza kyslých vezikulárných organel.....	55
6.4.1	Analýza pomocou prietokovej cytometrie.....	55
6.4.2	Optimalizácia metódy.....	56
6.5	Vizualizácia autofagozómov konfokálnou mikroskopiou .....	58
6.5.1	Použitie konfokálnej mikroskopie .....	58
6.5.2	Optimalizácia metódy.....	59
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>60</b>
7.1	Zavedenie metodiky pre detekciu autofágie .....	60
7.2	Vplyv mastných kyselín na expresiu esenciálnych autofagických proteínov ..	61
7.3	Vplyv mastných kyselín na tvorbu kyslých vezikulárných organel .....	64
7.4	Vplyv mastných kyselín na tvorbu autofagozómov .....	66
7.5	Vplyv mastných kyselín na autofagický tok.....	68
7.6	Úloha autofágie v regulácii apoptózy po pôsobení mastných kyselín.....	71
7.6.1	Vplyv rapamycinu na indukciu autofágie po pôsobení mastných kyselín	71
7.6.2	Vplyv bafilomycinu A1 a rapamycinu na reguláciu apoptózy indukovanej pôsobením mastných kyselín.....	73
7.6.3	Vplyv inhibície autofágie umlčaním Atg7 na zmenu aktivity apoptózy indukovanej mastnými kyselinami .....	76
<b>8</b>	<b>DISKUSIA</b> .....	<b>79</b>
8.1	Aktivácia autofágie pôsobením mastných kyselín .....	79
8.2	Zavedenie metód pre štúdium autofágie u pankreatickej línie NES2Y .....	81
8.3	Účinok mastných kyselín na autofagický tok.....	82
8.4	Degradácia proteínu p62 u pankreatickej línie NES2Y .....	85
8.5	Úloha kinázy mTOR1 na regulácii autofágie po pôsobení mastných kyselín..	86
8.6	Úloha autofágie v regulácii apoptózy pôsobením mastných kyselín .....	87
<b>9</b>	<b>ZÁVER</b> .....	<b>90</b>
<b>10</b>	<b>POUŽITÁ LITERATÚRA</b> .....	<b>91</b>

# POUŽITÉ SKRATKY

<b>3MA</b>	3-methyladenine
<b>4E-BP1</b>	eIF4E-binding protein
<b>AMPK</b>	AMP dependent kinase
<b>AO</b>	akridínová oranžová
<b>ATG gény</b>	autophagy-related genes
<b>Atg16L</b>	Atg16 like
<b>AP</b>	autofagozóm
<b>APL</b>	autofagolyzozóm
<b>ATP</b>	adenosine triphosphate
<b>AVOs</b>	acidic vesicular organelles
<b>Bad</b>	Bcl-2-associated death promoter
<b>Bak</b>	Bcl-2 antagonist/killer-1
<b>Bax</b>	Bcl-2-associated X protein
<b>Bcl-2</b>	B-cell CLL/lymphoma-2
<b>Bcl-xL</b>	B-cell leukemia/lymphoma-extra large protein
<b>Bid</b>	BH3 interacting-domain
<b>Bim</b>	Bcl-2-interacting mediator of cell death
<b>CARD</b>	caspase activation and recruitment domain
<b>CMA</b>	chaperon-mediated autophagy
<b>DAPI</b>	4,6-diamino-2-phenylindole
<i>db</i>	<i>diabetic</i>
<b>DD</b>	death domain
<b>DED</b>	death effector domain
<b>DIABLO</b>	direct inhibitor of apoptosis- binding protein with low pI
<b>DISC</b>	death-inducing signalling complex
<b>DM2T</b>	diabetes mellitus 2. typ
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>DP</b>	diplomová práca
<b>E1</b>	ubiquitin-activating enzyme
<b>E2</b>	ubiquitin-carrier of conjugating proteins
<b>E3</b>	ubiquitin protein ligase
<b>E-64d/p</b>	E-64d v kombinácii s pepstatinom A
<b>eIF-2<math>\alpha</math></b>	eukaryotic initiation factor-2 $\alpha$
<b>ER</b>	endoplazmatické retikulum
<b>FA</b>	fatty acid
<b>FADD</b>	Fas associated protein with death domain
<b>FIP200</b>	focal adhesion kinase family-interacting protein of 200Da
<b>FKBP12</b>	FK506-binding protein 12
<b>FRAP</b>	FKBP12-rapamycin-associated protein
<b>GFP</b>	green fluorescent protein

<b>HepG2</b>	hepatocellular carcinoma
<b>InR</b>	insulin receptor
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal kinase
<b>kDa</b>	kilodalton
<b>LAMP-2</b>	lysosomal-associated membrane protein 2
<b>LC3</b>	microtubule-associated protein 1 light chain 3
<b>LIR</b>	LC3-interacting region
<b>LRS</b>	LC3 recognition sequence
<b>mAtg9</b>	mammalian Atg9
<b>mAtg13</b>	mammalian Atg13
<b>MDC</b>	monodansylcadaverin
<b>MOMP</b>	mitochondrial outer membrane permeabilization
<b>MK</b>	mastná kyselina
<b>mTOR</b>	mammalian Target Of Rapamycin
<b>OA</b>	oleic acid, kyselina olejová
<b>ob</b>	<i>obese</i>
<b>p62</b>	protein of 62 kDa
<b>p70 S6K</b>	p70 S6 kinase
<b>p150</b>	protein of 150 kDa
<b>P-p70 S6K</b>	fosforylovaná forma p70 S6 K
<b>PA</b>	palmitic acid, kys. palmitová
<b>PARP</b>	poly(ADP-ribose) polymerase
<b>PB1</b>	Phox and Bem1p
<b>PE</b>	fosfatidylethanolamin
<b>PI3K</b>	fosfatidylinositol-3-kináza
<b>PI3P</b>	fosfatidylinositol-3-fošfát
<b>PKC</b>	protein kinase C
<b>POA</b>	kyselina palmitolejová
<b>RAFT1</b>	rapamycin and FKBP12 target 1
<b>RAPT1</b>	rapamycin target 1
<b>RAS</b>	rat sarcoma
<b>RB1CC1</b>	retinoblastoma 1-inducible coiled-coil 1
<b>RT-PCR</b>	real-time PCR
<b>S6K</b>	40S ribosomal protein S6 kinase
<b>SA</b>	stearic acid, kyselina stearová
<b>SDS-PAGE</b>	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<b>SEP</b>	sirolimus effector protein
<b>siRNA</b>	small interfering RNA
<b>Smac</b>	second mitochondria-derived activator
<b>SQSTM1</b>	sequestosome 1
<b>TAG</b>	triacylglycerol
<b>TNFR</b>	tumour necrosis factor receptor
<b>TRAIL</b>	tumor necrosis factor- $\alpha$ -related apoptosis-inducing ligand
<b>TRADD</b>	tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain

<b>TSC</b>	tuberous sclerosis complex
<b>UB</b>	ubiquitin
<b>UBA</b>	ubiquitin-associated domain
<b>ULK</b>	proteinUnc 51 Ser/Thr kinase 1ubiquitin
<b>UPR</b>	unfolded protein response
<b>UVRAG</b>	ultraviolet irradiation resistant-associated gene
<b>Vps34</b>	vacuolar protein sorting 34
<b>WB</b>	western blot
<b>ZDF</b>	Zucker diabetic fatty

# 1 ABSTRAKT

Diabetes mellitus 2. typu predstavuje metabolickú chorobu, ktorá v 21. storočí dosiahla epidemický charakter. K jej vzniku významne prispieva apoptóza pankreatických  $\beta$  buniek indukovaná mastnými kyselinami (MK). Zatiaľ čo nasýtené MK sú pre  $\beta$  bunky silno cytotoxické, nenasýtené MK sú  $\beta$  bunkami lepšie tolerovateľné, a dokonca pri spoluinkubácii s nasýtenými MK sú schopné inhibovať ich proapoptotický účinok. Štúdie z poslednej doby naznačujú, že na regulácii apoptózy indukovanej MK sa u pankreatických  $\beta$  buniek podieľa aj autofágia, katabolická dráha uplňujúca sa pri degradácii a recyklácii bunkových komponent v lyzozómoch.

Cieľom tejto diplomovej práce bolo prispieť k objasneniu úlohy autofágie v regulácii apoptózy indukovanej MK. Na modeli ľudských pankreatických  $\beta$  buniek línie NES2Y sme indukovali apoptózu pôsobením 1 mM nasýtenej kyseliny stearovej (SA) a inhibovali účinkom 0,2 mM nenasýtenej kyseliny olejovej (OA) pri ich spoločnej inkubácii.

Zistili sme, že nasýtená SA v koncentrácii indukujúcej u  $\beta$  buniek línie NES2Y apoptózu zároveň spôsobuje autofagický blok. Pri spoluinkubácii SA s nenasýtenou OA, v koncentrácii dostatočnej pre inhibíciu proapoptotického účinku SA, je OA tiež schopná inhibovať autofagický blok vyvolaný účinkom SA. Pôsobenie samotnej nenasýtenej OA v takejto koncentrácii nemá vplyv na bazálnu aktivitu autofágie. Výsledky tiež naznačili, že u  $\beta$  buniek línie NES2Y nie je bazálna aktivita autofágie a rovnako ani autofágia vyvolaná pôsobením MK regulovaná signálnou dráhou kinázy mTOR1. Umlčaním expresie esenciálneho autofagického proteínu Atg7 pomocou siRNA sme zistili, že autofágia sa u ľudskej pankreatickej línie NES2Y nezúčastňuje na regulácii apoptózy indukovanej MK.

**Kľúčové slová:** apoptóza, autofágia, bafilomycin A1, kaspázy, mastné kyseliny (MK), pankreatické  $\beta$  bunky, rapamycin



## 2 ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus represents a metabolic disease reaching epidemic dimensions in the 21st century. Fatty acid-induced apoptosis of pancreatic  $\beta$ -cells significantly contributes to its pathogenesis. Saturated fatty acids (FAs) are strongly cytotoxic for  $\beta$ -cells, whereas unsaturated FAs are well tolerable by  $\beta$ -cells, they are even able to inhibit proapoptotic effects of saturated FAs when co-incubated. According to recent studies, FAs-induced apoptosis in pancreatic  $\beta$ -cells is partly regulated by autophagy, a catabolic process involved in the degradation and recycling of cell components in lysosomes.

The aim of this diploma thesis was to contribute to the clarification of the role of autophagy in FAs-induced apoptosis regulation. We induced apoptosis in human pancreatic  $\beta$ -cell line NES2Y by 1 mM stearic acid (SA) and inhibited it with 0.2 mM oleic acid (OA) co-incubated with SA.

We revealed, that the saturated SA used in apoptosis-inducing concentration simultaneously inhibits the autophagic flux in pancreatic NES2Y cell line. When SA is co-incubated with unsaturated OA in concentration sufficient for inhibition of proapoptotic effect of SA, OA is also able to inhibit the block of autophagy induced by the effect of SA. Application of unsaturated OA alone in this concentration did not exhibit any effect on the basal levels of autophagy. The results also suggested that in pancreatic  $\beta$ -cell line NES2Y neither the basal activity, nor the FAs-induced autophagy is regulated by signaling pathway of mTOR1 kinase. Silencing of Atg7, which is an essential autophagy-specific protein, using siRNA showed, that autophagy is not involved in FAs-induced apoptosis regulation in human pancreatic NES2Y cell line.

**Key words:** apoptosis, autophagy, bafilomycin A1, caspases, fatty acids (FAs), pancreatic  $\beta$ -cells, rapamycin

## 3 LITERÁRNY PREHLAD

### 3.1 Úvod

Eliminácia buniek reprezentuje z hľadiska regulácie počtu a kvality buniek v organizme významný fyziologický proces. Najvýznamnejší spôsob kontrolovaného odstraňovania poškodených, prebytočných a infikovaných buniek predstavuje apoptóza, hlavný typ bunkovej smrti. Okrem apoptózy boli charakterizované aj ďalšie mechanizmy kontrolovanej smrti buniek, spomedzi ktorých je najviac preskúmaná autofágia (prehľadne v de Bruin a Medema, 2008). Porucha regulácie apoptózy i autofágie prispieva k patofyziologickým stavom organizmu a bola detegovaná v prípade viacerých ochorení (podrobnejšie vid' kap. 3.2 a 3.4).

Jednou z najrozšírenejších civilizačných chorôb je diabetes mellitus 2. typu (DM2T). Príčinou vzniku tejto choroby je nedostatočná tvorba inzulínu pre pokrytie potrieb tela pacienta zapríčinená inzulínovou rezistenciou a/alebo poruchou tvorby inzulínu. Nedostatočná syntéza inzulínu môže byť spôsobená buď poškodením funkcie pankreatických  $\beta$  buniek, alebo poklesom množstva funkčných  $\beta$  buniek. Ako hlavný mechanizmus prispievajúci k redukcii počtu funkčných  $\beta$  buniek v priebehu DM2T bola preukázaná apoptóza (Butler et al., 2003).

Nezdravý životný štýl, znížená fyzická aktivita a obezita predstavujú hlavné rizikové faktory vzniku DM2T. U pacientov s DM2T je okrem hyperglykémie detegovaná veľmi často aj hyperlipidémia (Listenberger et al., 2003; Kahn et al., 2006). Prítomnosť vysokých koncentrácií lipidov a mastných kyselín (MK) vedie k ich akumulácii nielen v adipocytoch, ale aj v bunkách ďalších tkanív, čím poškodzuje ich funkciu a môže byť príčinou aktivácie bunkovej smrti. Toto pôsobenie je označované ako lipotoxicita (Brookheart et al., 2009). *In vitro* a aj *in vivo* experimenty na živočíšnych modeloch pre výskum DM2T (Cnop et al., 2001; Beeharry et al., 2004; Diakogiannaki et al., 2007), a rovnako aj pokusy na ľudských  $\beta$  bunkách (Eitel et al., 2003; Fürstová et al., 2008; Němcová-Fürstová et al., 2011) potvrdili, že dlhodobé pôsobenie MK indukuje u  $\beta$  buniek apoptózu, a tým významne prispieva k vzniku DM2T.

MK sú u pankreatických  $\beta$  buniek schopné v *in vitro* podmienkach regulovať tiež aktivitu autofágie (Choi et al., 2009; Las et al., 2011; Martino et al., 2012). Nedávno boli morfológické znaky autofágie identifikované aj na ľudských  $\beta$  bunkách pacientov trpiacich na DM2T (Masini et al., 2009), čo naznačilo potencionálne uplatnenie autofágie v patogenéze DM2T a prinieslo so sebou otázku, aký vplyv má autofágia na viabilitu  $\beta$  buniek v súvislosti s lipotoxicitou.

## 3.2 Apoptóza

Apoptóza je charakterizovaná stratou asymetrie plazmatickej membrány, kedy je na jej extracelulárnu stranu exponovaný fosfatidylserín, ďalej kondenzáciou a fragmentáciou chromatinu, zmršťovaním buniek a ich rozpadom do membránou obalených apoptotických teliesok. Tie sú potom fagocytované makrofágmi a odstraňované z organizmu bez vzniku zápalovej reakcie (prehľadne v Fadeel a Orrenius, 2005). Popísané procesy apoptózy sú energeticky závislé a vyžadujú prítomnosť dostatočného množstva ATP (adenosine triphosphate) (Bratton a Cohen, 2001).

Apoptóza zohráva za fyziologických podmienok esenciálnu úlohu v embryonálnom vývoji, v regulácii funkcie imunitného systému a pri udržiavaní bunkovej homeostázy (prehľadne v Kerr et al., 1972). Znížená aktivita apoptózy sa uplatňuje pri vzniku rakoviny, autoimunitných porúch a perzistentnej vírovej infekcie. Zvýšená aktivita apoptózy je naopak spájaná s niektorými formami neurodegeneratívnych porúch ako je napr. Alzheimerova choroba (Rieux-Laucat et al., 2003).

### 3.2.1 Mechanizmus aktivácie apoptózy

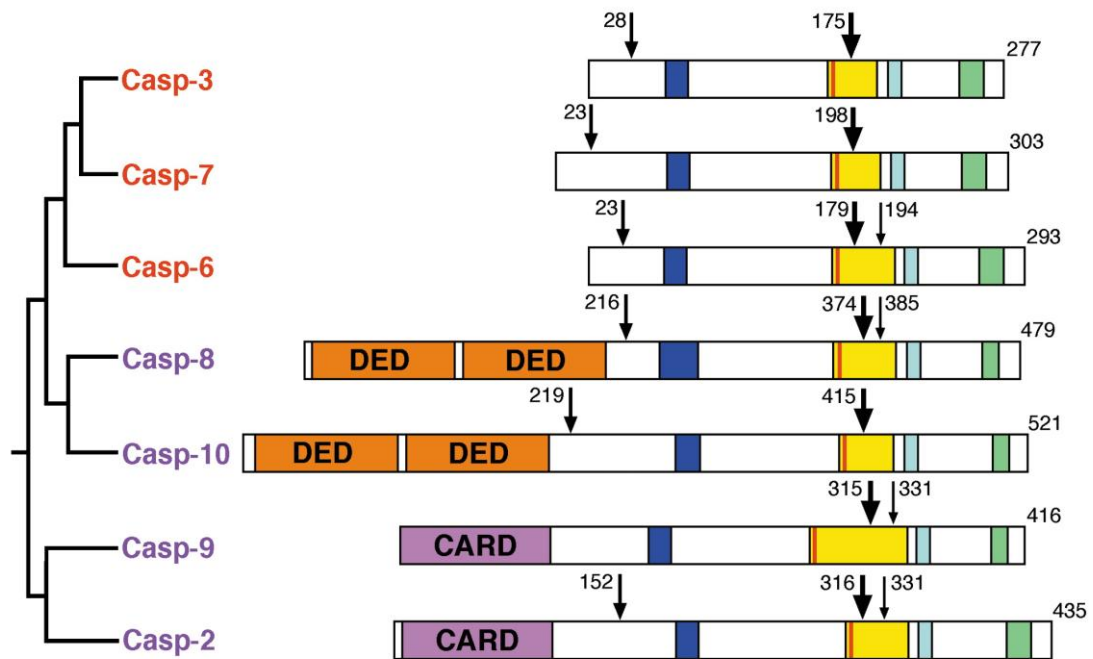
Aktivácia apoptózy môže byť sprostredkovaná dvoma dráhami: (1) vonkajšou (receptorovou) alebo (2) vnútornou (mitochondriálnou) (prehľadne v Park et al., 2007). Molekulárnou podstatou apoptózy je aktivácia proteolytických enzýmov, apoptotických kaspáz (ďalej len kaspáza), ktoré sú zodpovedné za degradáciu bunkových proteínov.

### 3.2.1.1 Aktivácia kaspáz

Kaspázy, cysteínové proteázy, špecificky štiepia proteínové substráty za aspartátom (prehľadne v Salvesen, 2002). V bunke sú trvalo prítomné v podobe neaktívnych zymogénov tvorených malou a veľkou podjednotkou a tzv. prodoménou, ktorá je v prípade iniciačných kaspáz výrazne dlhšia (viď **Obr. 3-1**). K aktivácii kaspáz dochádza až po indukcii apoptózy, kedy fungujú v podobe dimérov tvorených dvomi veľkými a dvomi malými podjednotkami. V závislosti na spôsobe aktivácie sa kaspázy rozdeľujú na iniciačné, kde zaraďujeme kaspázu 2, 8, 9 a 10, a efektorové, medzi ktoré patria kaspázy 3, 6 a 7 (viď **Obr. 3-1**) (prehľadne v Zhivotovsky, 2003).

Po indukcii apoptózy sú ako prvé aktivované iniciačné kaspázy. Vďaka dlhej DED (death effector domain) prodoméne (kaspáza 8 a 10) alebo CARD (caspase activation and recruitment domain) prodoméne (kaspáza 2 a 9) (viď **Obr. 3-1**) sú v bunke rekrútované do špecifických multimérnych signálnych komplexov, kde sú autokatalyticky aktivované proteolytickým štiepením (viď nižšie a **Obr. 3-2**). Substrátmi iniciačných kaspáz sú efektoré kaspázy, ktoré v aktivovanej forme, po štiepení iniciačnými kaspázami, degradujú bunkové proteíny, a tým vykonávajú exekučnú fázu apoptózy (prehľadne v Chowdhury et al., 2008; Bouchier-Hayes a Green, 2012). Hlavnou exekučnou kaspázou zodpovednou za degradáciu väčšiny bunkových komponent je kaspáza 3. Spoločne s aktivovanou kaspázou 7, s podobným substrátovým zameraním ako kaspáza 3, sú vyžadované pre exekúciu apoptózy. Kaspáza 6 je štruktúrne podobná kaspázam 3 a 7, ale aj napriek tomu má iné substrátové preferencie (prehľadne v Kumar, 2007).

Najviac evolučne konzervovanú kaspázu predstavuje iniciačná kaspáza 2 (Lassus et al., 2002). Jej prítomnosť bola zaznamenaná v jadre, Golgiho komplexe a aj v cytosole (Mancini et al., 2000; O'Reilly et al., 2002; Bouchier-Hayes et al., 2009). Kaspáza 2 je aktivovaná prostredníctvom multimérneho komplexu označovaného ako piddozóm. Presná úloha kaspázy 2 v prenose apoptotického signálu nie je ale zatiaľ objasnená (prehľadne v Bouchier a Green, 2012).



**Obr. 3-1. Schematické znázornenie štruktúry cicavčích apoptotických kaspáz.** Exekučné kaspázy sú znázornené červene a iniciačné kaspázy fialovo. Pozícia prvého aktivačného štiepenia (medzi veľkou a malou podjednotkou) je zvýraznená hrubou šípkou, ďalšie prídavné štiepiace miesta sú reprezentované stredne hrubou alebo tenkou šípkou (upravené podľa Shi, 2002).

### 3.2.1.2 Receptorom sprostredkovaná aktivácia apoptózy

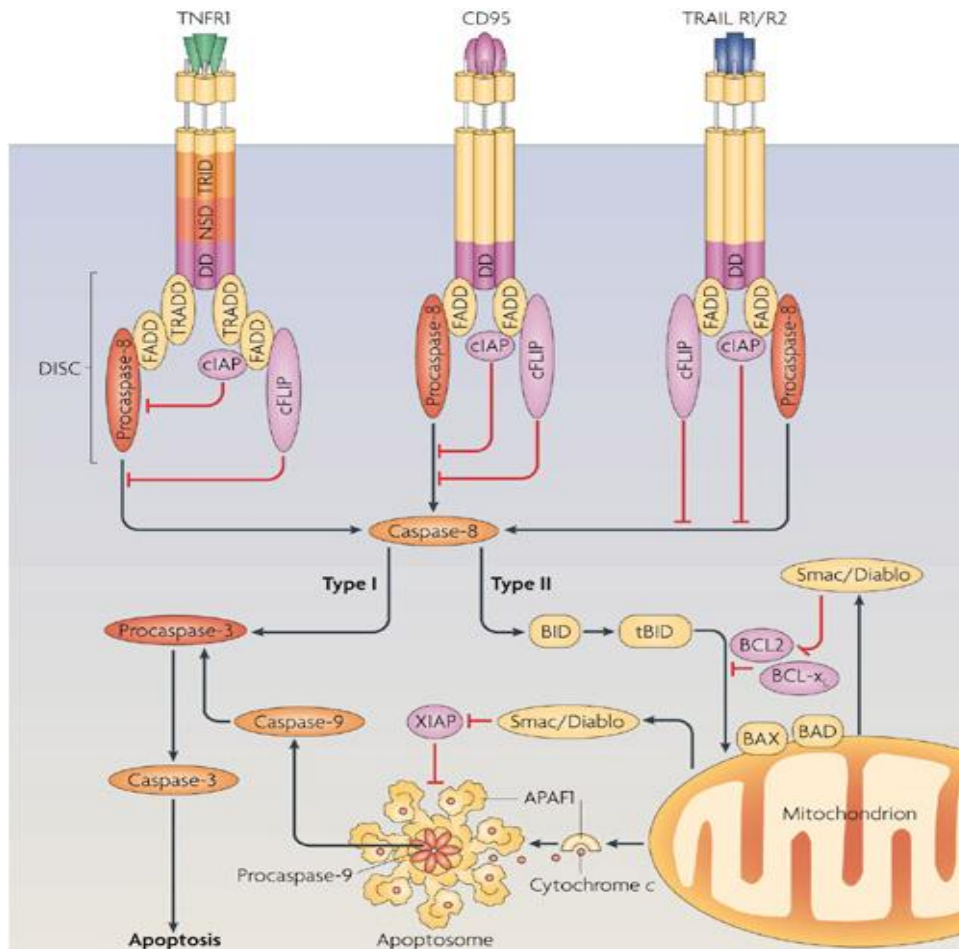
Proapoptotické stimuly z prostredia vedú k multimerizácii tzv. receptorov smrti v plazmatickej membráne, kam radíme napr. CD95/Fas, TNFR (tumour necrosis factor receptor) alebo TRAIL (tumour necrosis factor- $\alpha$ -related apoptosis-inducing ligand) receptor. Tie po ligácii trimerizujú a prostredníctvom ich DD (death domain) domény a adaptorových proteínov TRADD (tumour necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein) a FADD (Fas associated protein with death domain) rekrútujú prokaspázu 8 alebo 10, čím dochádza k vytvoreniu tzv. DISC (death-inducing signaling complex) komplexu, v ktorom sú tieto iniciačné kaspázy na základe autokatalytického štiepenia aktivované (Peter a Krammer, 2003). Aktivovaná kaspáza 8 ďalej štiepi a aktivuje efektorové kaspázy. Apoptotický signál môže okrem toho prenášať aj cestou proteolýzy proteínu Bid. Prostredníctvom jeho translokácie do mitochondrií indukuje MOMP (mitochondrial outer membrane permeabilization), čo vedie k uvoľneniu cytochrómu c do cytoplazmy (viď kap. 3.2.1.3 a Obr. 3-2) (prehľadne v Schütze et al., 2008).

### 3.2.1.3 Aktivácia mitochondriálnej dráhy apoptózy

Vnútoraná apoptotická dráha je typicky indukovaná rôznymi druhmi intracelulárneho stresu, akými sú napr. poškodenie DNA, zvýšenie hladín kyslíkových radikálov a stres endoplazmatického retikula (ER) ako následok akumulácie zle zložených proteínov. Esenciálnu úlohu v tejto dráhe zohrávajú mitochondrie. Ich intramembránové prostredie je rezervoár pre viaceré proapoptotické faktory, akými sú cytochróm c, endonukleáza G a Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator/direct inhibitor of apoptosis- binding protein with low pI). Integrita vonkajšej mitochondriálnej membrány, a rovnako aj jej priepustnosť pre vyššie spomenuté proapoptotické faktory je závislá na rovnováhe medzi účinkom pro- a antiapoptotických proteínov rodiny Bcl-2. Medzi antiapoptotické proteíny tejto rodiny patria napr. Bcl-2 (B-cell CLL/lymphoma-2), Bcl-xL (B-cell leukemia/lymphoma-extra large protein). Ako proapoptotické proteíny tejto rodiny sú označované Bax (Bcl-2-associated X protein), Bak (Bcl-2 antagonist/killer-1), Bad (Bcl-2-associated death promoter), Bim (Bcl-2-interacting mediator of cell death), Bid (BH3-interacting-domain). Indukcia apoptózy vedie k porušeniu tejto rovnováhy v prospech proapoptotických členov a k permeabilizácii mitochondriálnej membrány, tzv. MOMP následkom čoho dochádza k uvoľneniu proapoptotických faktorov z mitochondrií do cytosolu. Uvoľnený cytochróm c sa následne v cytoplazme podieľa na zostavení apoptozómu, multimérneho komplexu aktivujúceho iniciačnú kaspázu 9. Tá po aktivácii aktivuje proteolytickým štiepením efektorové kaspázy (viď **Obr. 3-2**) (Leibowitz a Yu et al., 2010).

### 3.2.1.4 Exekúčná fáza apoptózy

Hlavnými cieľovými substrátmi kaspáz sú cytoskeletárne, cytoplazmatické a jadrové proteíny, napr. lamíny a PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) (Kumar et al., 2007). PARP, enzým uplatňujúci sa pri oprave poškodenej DNA, funguje ako senzor jednoreťazových zlomov DNA (prehľadne v Soldani a Scovassi, 2002). Detekcia štiepenej formy PARP proteínu je v praxi bežne používaná ako dôkaz aktivovanej apoptózy.



**Obr. 3-2. Schéma aktivácie apoptózy vonkajšou (receptorovou) a vnútornou (mitochondriálnou) dráhou.** Aktivácia vonkajšej dráhy je stimulovaná prostredníctvom receptorov TNFR superrodiny, medzi ktoré patria CD95/Fas, TNFR alebo TRAIL, tzv. receptory smrti. Aktivovaná kaspáza 8 aktivuje štiepením efektorové kaspázy a tiež môže cestou proteolýzy proteínu Bid, ktorý translokuje do mitochondrií, indukovať MOMP. Pre aktiváciu vnútornej dráhy je charakteristický MOMP a uvoľnenie mitochondriálneho cytochromu c. Proapoptotické proteíny rodiny Bcl-2 stimulujú MOMP oligomerizáciou Bax a/alebo Bak vo vonkajšej mitochondriálnej membráne a na základe formovania kanálov umožňujú uvoľnenie proapoptotických proteínov (cytochróm c, Smac/DIABLO) z mitochondriálneho membránového priestoru do cytosolu. Cytochróm c je zodpovedný za zostavenie apoptozómu, aktivačného komplexu pre prokaspázu 9, ktorá po aktivácii aktivuje efektorové kaspázy (prevzaté z Schütze et al., 2008). Pre vysvetlenie skratiek vid' „POUŽITÉ SKRATKY“.

## 3.3 Autofágia

Normálny bunkový rast a vývoj je závislý na regulovanej rovnováhe medzi biosyntézou a katabolizmom makromolekúl. U eukaryotických buniek existujú dve hlavné cesty degradácie bunkových komponentov: ubiquitín-proteazómová dráha a autofágia, ktoré sú navzájom prepojené (Ding et al., 2007).

Termín „autofágia“ pochádza z gréckych slov „auto“ = seba a „phagein“ = požírať, konzumovať. Vo fyziologickom kontexte bunky predstavuje označenie pre katabolické procesy degradujúce sekvestrovaný materiál v lyzozóme. Materiál pre degradáciu môže byť do lyzozómu dopravovaný rôznym mechanizmom, na základe čoho sú rozpoznávané tri základné typy autofágie: mikroautofágia, makroautofágia a chaperónmi sprostredkovaná autofágia (chaperon-mediated autophagy, CMA). U väčšiny buniek spolu tieto jednotlivé formy koexistujú a podiel konkrétneho typu na degradácii závisí na danom bunkovom type a podmienkach prostredia (prehľadne v Kaushik et al., 2010).

### 3.3.1 Typy autofágie

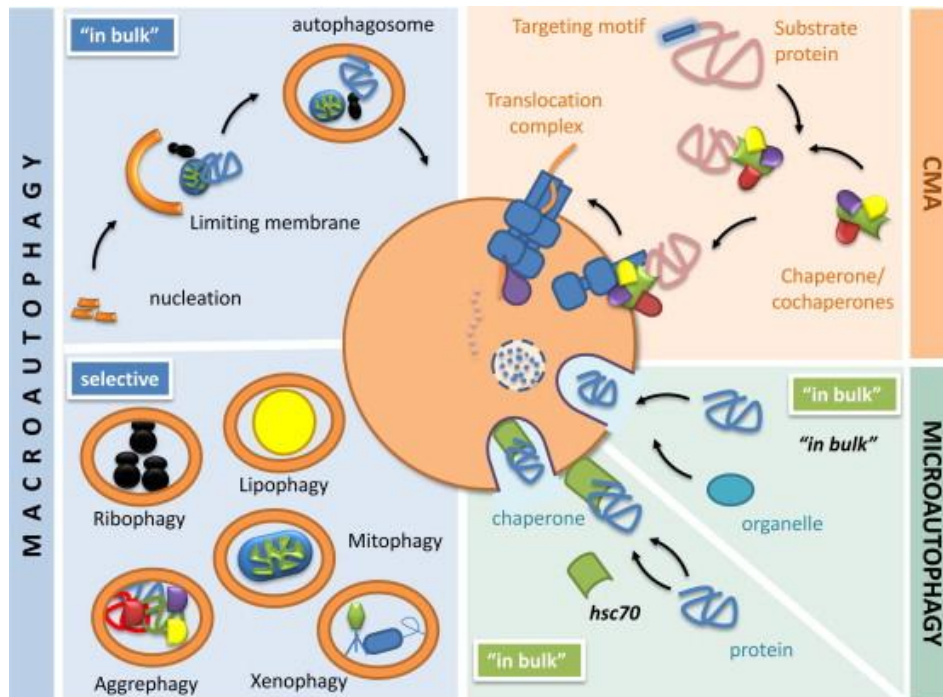
V prípade mikroautofágie sú cieľové komponenty sekvestrované v blízkosti lyzozómového povrchu postupnou invagináciou lyzozómovej membrány a v podobe vakuol s jednoduchou membránou odškrcované do lumen lyzozómu (viď **Obr. 3-3**) (Sahu et al., 2011).

CMA predstavuje formu autofágie selektívnu pre cytosolické solubilné proteíny. Tie sú rozpoznávané na základe pentapeptidovej aminokyselinovej sekvencie Lys-Phe-Glu-Arg-Gln (KFERQ) chaperónmi rodiny Hsp70 a dopravované k lyzozómom. Komplex proteín-chaperón asociuje s lyzozómovým povrchovým receptorom LAMP-2 (lysosomal-associated membrane protein-2) a proteíny sú v nezloženej podobe dopravované jeden za druhým cez lyzozómovú membránu do lumen, kde sú následne degradované (viď **Obr. 3-3**) (prehľadne v Orenstein a Cuervo, 2010).

Dopravenie materiálu pre degradáciu do lyzozómov prostredníctvom *de novo* syntetizovaných vakuol, autofagozómov, reprezentuje posledný typ autofágie, makroautofágiu. Z pohľadu mechanizmu a molekulárneho fungovania ide o najviac preskúmanú formu autofágie a jej prítomnosť bola identifikovaná aj u pankreatických  $\beta$



buniek pacientov s DM2T (Masini et al., 2009). V rámci tejto diplomovej práce (DP) sme sa zamerali na analýzu tohto typu autofágie, a v ďalšej časti tejto kapitoly sa preto venujeme detailnejšej charakterizácii makroautofágie, pre zjednodušenie ďalej označovanej ako autofágia. Tento pojem je pre makroautofágiu používaný aj v ostatných častiach tejto DP.



**Obr. 3-3. Typy autofágie u cicavčích buniek.** U cicavcov koexistujú tri typy autofágie, ktoré sa líšia spôsobom dopravy materiálu pre degradáciu do lyzozómu. (1) makroautofágia sekvestruje cieľový materiál do dvojmembránových vezikúl, autofagozómov, ktoré následne fúzujú s lyzozómami. Neselektívna forma makroautofágie sekvestruje náhodnú časť cytosolu. Selektívna forma špecificky degraduje agregáty (aggrephágia), lipidy (lipofágia), parazity (xenofágia), ribozómy (ribofágia) alebo mitochondrie (mitofágia). (2) mikroautofágia transportuje cytosolické komponenty priamo na povrchu lyzozómu tak, že obalí cieľový materiál lyzozomálnou membránou a v podobe vakuoly invaginuje do lumen lyzozómu. V neskorých endozómoch funguje mikroautofágia v závislosti na interakcii substrátov s chaperónmi ako neselektívny a aj selektívny proces. (3) Pri CMA (chaperon-mediated autophagy) sú cieľové proteíny rozoznávané prostredníctvom chaperónov na základe aminokyselinovej sekvencie, transportované k lyzozomálnemu povrchu, kde sú internalizované cez membránu do lumen lyzozómu spôsobom podobným mechanizmu translokácie proteínov prostredníctvom translokónu (prevzaté z Cuervo a Macian, 2012).

### 3.3.2 Molekulárny mechanizmus autofágie

Morfologické znaky bunkového deja, dnes známeho ako autofágia, boli po prvýkrát pozorované už v 60-tych rokoch, ale fyziologické uplatnenie a molekulárny mechanizmus tohto procesu nebol známy do poslednej dekády minulého storočia. Skúmanie autofágie odštartovalo až odhalenie génov zúčastňujúcich sa tejto degradačnej dráhy u kvasiniek, tzv. ATG génov (autophagy-related genes). Genetickým screeningom bolo na kvasinkovom modeli dodnes identifikovaných viac ako 30 rôznych ATG génov kódujúcich esenciálne Atg proteíny regulujúce prechod jednotlivými krokmi autofagickej dráhy (prehľadne v Klionsky, 2007). Proces autofágie ale nie je dodnes kompletne objasnený.

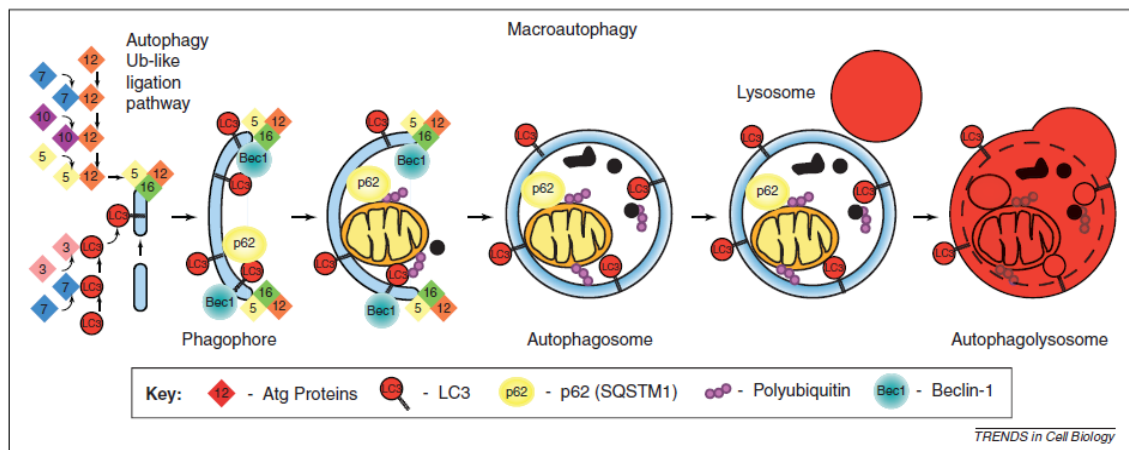
#### 3.3.2.1 Základný priebeh autofagickej dráhy

Autofágia začína formovaním plochej prekurzorovej membránovej štruktúry, tzv. iniciačnej membrány, tiež nazývanej fagofór. Iniciačná membrána postupne elonguje na oboch koncoch a zároveň obaluje časť cytosolu s bunkovými komponentmi (Mizushima et al., 2001). Nakoniec sa uzatvorí a vytvorí dvojmembránovú štruktúru nazývanú autofagozóm. Autofagozómy sú formované náhodne v perinukleárnej oblasti cytoplazmy. Po syntéze sú dopravované prostredníctvom mikrotubulov za účasti molekulárneho motora dyneínu k lyzozómu (Jahreiss, et al., 2008). S tými fúzuju za vzniku štruktúry obalenej jednoduchou membránou nazývanej autofagolyzozóm alebo autolyzozóm (Schworer a Mortimore, 1979). V autofagolyzozóme je sekvestrovaný materiál, spoločne s vnútornou membránou autofagozómu, následne degradovaný (viď **Obr. 3-4**) (prehľadne v Yang a Klionsky, 2010). Okrem lyzozómov môžu autofagozómy fúzovať aj s poďnými endozómami za vzniku štruktúry nazývanej amfizó (Gordon et al., 1992), o ktorej dodnes nie je známe, či sa jedná o pre-autofagolyzozomálnu štruktúru alebo konečné štádium degradácie materiálu.

#### 3.3.2.2 Výber materiálu pre degradáciu

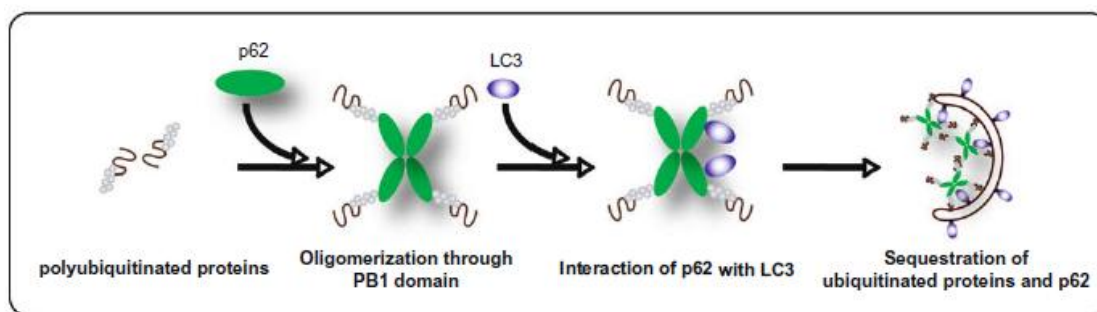
Vzhľadom k tomu, že lyzozóm disponuje rôznymi druhmi hydroláz (lipázy, proteázy, glykozidázy, nukleotidázy), je možné prostredníctvom autofagickej dráhy degradovať všetky druhy makromolekúl a v podobe neselektívneho procesu zabezpečovať „turnover“ týchto základných molekulárnych stavebných kameňov

v bunke (Singh a Cuervo, 2011). Ukazuje sa, že v prípade sekvestrácie materiálu je autofágia viac selektívny proces ako sa pôvodne myslelo. Jej účasť bola preukázaná na odbúravaní a recyklácii rôznych bunkových organel: peroxizómov (pexofágia) (Iwata et al., 2006), mitochondrií (mitofágia) (Schweers et al., 2007), ribozómov (ribofágia) (Kraft et al., 2008) a ER (retikulofágia) (Bernales et al., 2007). Podstata selektivity ale nie je stále kompletne vysvetlená.



**Obr. 3-4. Schéma priebehu autofagickej dráhy.** Konjugačná kaskáda vedúca k syntéze LC3-II a konjugácii Atg5-Atg12, dvoch kľúčových elementov formovania fagofóru. Autofagický proces začína formovaním iniciačnej membrány, čo je nasledované elongáciou a uzatvorením autofagozómu, ktorý po maturácii fúzuje s lyzozómom, za súčasného vytvorenia autofagolyzozómu (prevzaté z Gump a Thorburn, 2011).

Čo sa týka odbúravania proteínov, autofágia zabezpečuje odstránenie proteínov s dlhým polčasom života, ktoré predstavujú majoritnú časť bunkového proteómu, zatiaľ čo ubiquitín-proteazómová dráha sa preferenčne podieľa na degradácii proteínov s krátkym polčasom života, napr. transkripčných faktorov (Hershko a Ciechanover, 1998). Autofágia zároveň predstavuje mechanizmus, prostredníctvom ktorého sú z buniek eliminované ubiquitinylované proteínové agregáty (Ichimura et al., 2008). Ich hromadenie v cytoplazme bolo preukázané ako príčina patologických zmien sprevádzajúcich rôzne ochorenia, napr. Huntingtonovu a Alzheimerovu chorobu (prehľadne v Mizushima et al., 2008). Nesolubilné ubiquitinylované proteíny sú v bunke vyvázané napr. proteínom p62 (protein of 62 kDa)/sequestosome 1 (SQSTM1) a spoločne s p62 degradované prostredníctvom autofagickej dráhy (Komatsu a Ichimura, 2010) (viď Obr. 3-5).



**Obr. 3-5. Schéma fungovania p62 ako receptora pre ubiquitinylované proteíny.** p62 interaguje s poly-ubiquitinylovanými proteínmi prostredníctvom UBA (ubiquitin-associated) domény. Komplex je selektívne sekvestrovaný do autofagozómu na základe interakcie LC3-II (microtubule-associated protein 1 light chain 3) s LIR/LRS (LC3-interacting region/LC3 recognition sequence) oblasťou proteínu p62. Celý mechanizmus je umožnený oligomerizáciou p62 prostredníctvom jeho PB1 (Phox and Bem1p) domény (prevzaté z Komatsu a Ichimura, 2010).

### 3.3.2.3 Iniciácia a formovanie autofagozómu

Pôvod a vznik iniciačnej membrány nie je u cicavcov stále objasnený. Pokusy naznačujú, že základ autofagozomálnej membrány by mohol pochádzať z mitochondrií (Hailey et al., 2010), z plazmatickej membrány (Ravikumar et al., 2010) alebo z ER (Axe et al., 2008, Walker et al., 2008).

Pre zostavenie iniciačnej membrány je esenciálna syntéza fosfatidylinositol-3-fosfátu (PI3P). Predpokladá sa, že po indukcii autofágie sa tento lipid hromadí v oblasti iniciačnej membrány, na základe čoho sú tam následne dopravované ďalšie autofagické proteíny a regulačné faktory zapojené do syntézy autofagozómu (Sou et al. 2008). U cicavcov je syntéza PI3P závislá na fosfatidylinositol-3-kinázovom (PI3K) komplexe III. triedy, ktorý je tvorený proteínmi Vps34 (vacuolar protein sorting 34), p150 (protein 150) a beclinom-1 (Yan et al., 2009).

Kľúčovú úlohu v iniciačných krokoch tvorby autofagozómu u cicavcov zohráva aj Ser/Thr kináza ULK1 (Unc 51 Ser/Thr kinase 1). Mechanizmus jej fungovania bol zatiaľ objasnený len v prípade autofágie indukovanej hladovaním, kde ULK1 funguje v komplexe s mAtg13 (mammalian Atg13), FIP200 (focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa), tiež nazývaným RB1CC1 (retinoblastoma 1-inducible coiled-coil 1) a Atg101 (Hara et al., 2008; Hosokawa et al., 2009a). Za nutrične bohatých podmienok je tento komplex lokalizovaný v cytoplazme a interaguje s komplexom mTOR1 (viď kap. 3.3.2.6), ktorý fosforyláciou ULK1 inhibuje jej kinázovú aktivitu (Hosokawa et al., 2009b; Jung et al., 2009). Disociácia komplexu mTOR1, v

prípade indukcie autofágie hladovaním, vedie k defosforylácii ULK1 a k nárastu jej kinázovej aktivity. ULK1 následne fosforyluje mAtg13, FIP200 a samú seba (Ganley et al., 2009; Jung et al., 2009). Komplex ULK1 je potom rekrútovaný na iniciačnú membránu (Hosokawa et al., 2009b; Ganley et al., 2009), kde sa spoločne s Vsp34 komplexom podieľa na iniciácii syntézy autofagozómu. O vzájomnej regulácii komplexov Vps34, ULK1 a mTOR1 sa vie zatiaľ veľmi málo.

### **3.3.2.4 Elongácia fagofóru**

Syntéza autofagozomálnej membrány je založená na pridávaní nových častí membrán k iniciačnej membráne, ktorých transport je pravdepodobne zabezpečený mAtg9 (mammalian Atg9). Pôvod týchto membrán a ani detailný mechanizmus ich pridávania nie je zatiaľ u cicavcov úplne vysvetlený. Tiež nie je vylúčené, že autofagozóm vzniká z a/alebo je tvorený membránami derivovanými z viacerých ako len z jednej organely (prehľadne v Webber a Tooze, 2010).

Pre elongáciu a expanziu fagofóru sú nevyhnutné dva „ubiquitin-like“ konjugáčny systémy: (1) konjugácia proteínov Atg5 s Atg12 a (2) konjugácia proteínu LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) s fosfatidylethanolaminom (PE), ktoré sú založené na rovnakých princípoch reakcií, akými sú reakcie uplatňujúce sa pri polyubiquitinyllácii proteínov odbúravaných v proteazóme

Typický konjugáčny systém ubiquitínu (UB) je založený na proteolytickej modifikácii UB, následným aktivovaním UB väzbou na enzým E1 (ubiquitin-activating enzyme), z ktorého je ďalej prenesený na enzým E2 (ubiquitin-carrier of conjugating proteins). E3 (ubiquitin protein ligase) nakoniec prenáša aktivovaný UB z E2 na lyzín cieľového proteínu (viď **Obr. 3-6 A**) (Richly et al., 2005).

#### **3.3.2.4.1 Konjugácia Atg5 s Atg12**

Konjugáčna reakcia Atg5 s Atg12 je založená na mechanizme reakcií katalyzovaných enzýmami Atg7 (funkčný analóg E1 enzýmu) a Atg10 (funkčný analóg E2 enzýmu) (viď **Obr. 3-6 B**) (Ohsumi, 2001). Atg5-Atg12 konjugáčny systém je nutný pre elongáciu iniciačnej membrány, pričom ciele Atg5 na túto membránu je podmienené prítomnosti PI3P (viď kap. **3.3.2.3**) (Mizushima et al., 2001). Atg5 ďalej asociuje s Atg16L (Atg16-like) proteínom, ktorý vďaka svojej „coiled-coil“ doméne vytvára homooligoméry a smeruje Atg12-Atg5-Atg16L komplex do membrány, kde

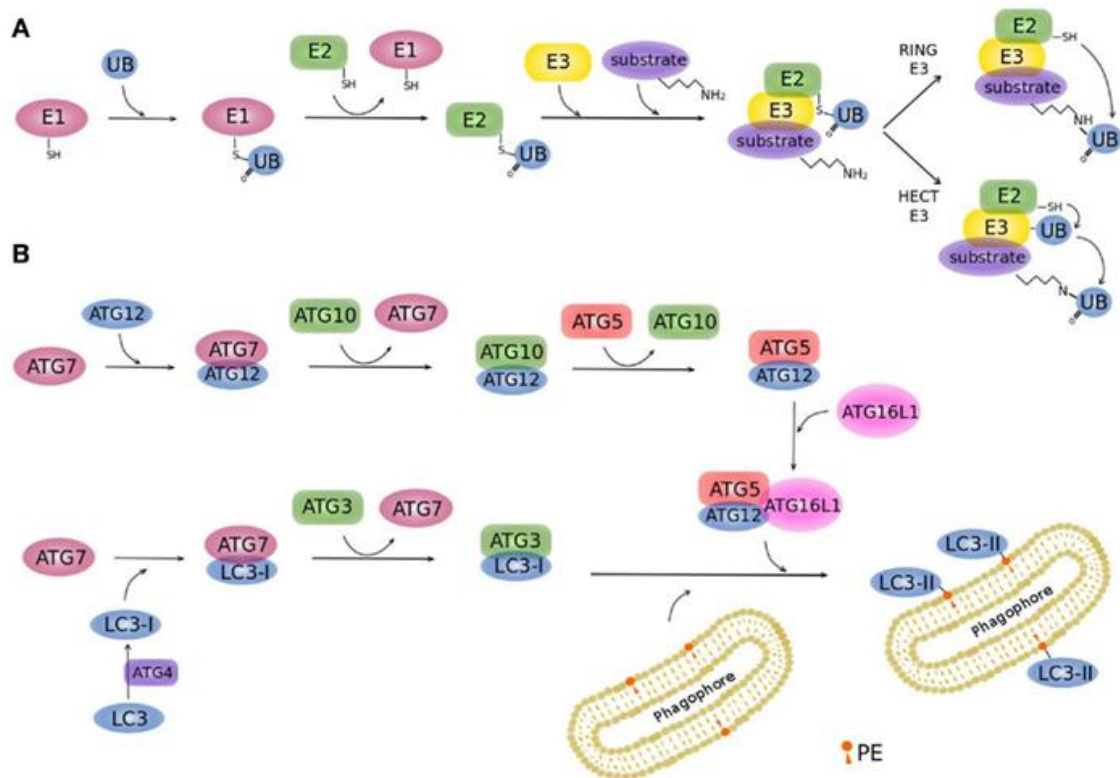
asymetricky pokrýva cytosolickú stranu preautofagozomálnej štruktúry. Tento trimérny komplex funguje pravdepodobne ako funkčný analóg E3, pričom tesne pred alebo po maturovaní autofagozómu disociuje z jeho membrány (Mizushima et al., 2001, Fujita et al., 2008).

#### **3.3.2.4.2 Konjugácia LC3 s PE**

Proteín LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) je v bunkách exprimovaný v podobe pro-LC3 (Kabeya et al., 2000). Bezprostredne po syntéze je štiepený proteázou Atg4 za vzniku cytosolickej formy označovanej ako LC3-I s exponovaným glycinom na C-terminálnom konci (Tanida et al., 2004). V prípade indukcie autofágie je LC3-I ďalej modifikovaný. Najskôr je aktivovaný vytvorením thioesterovej väzby medzi exponovaným glycinom a Atg7 (funkčný analóg E1 enzýmu) (Tanida et al., 2001), prenesený na Atg3 enzým (obdoba E2 enzýmu) (Tanida et al., 2002), ktorým je nakoniec prenášaný na PE prítomný v narastajúcej membráne budúceho autofagozómu za súčasného vytvorenia membránovo-viazanej formy, označovanej ako LC3-II (Tanida et al., 2001) (viď **Obr. 3-6 B**).

Maturovaný autofagozóm obsahuje LC3-II lokalizovaný ako na jej vnútornej, tak na jej vonkajšej strane (Kabeya et al., 2000). Konjugácia LC3 s PE je dej reverzibilný, pričom delipidácia za súčasného vzniku LC3-I je katalyzovaná proteázou Atg4 (Kabeya et al., 2004). Po vytvorení maturovaného autofagozómu alebo v štádiu tesne pred fúziou autofagozómu s lyzozómom, je väčšina LC3-II proteínu asociovaného s vonkajšou membránou delipidovaná a vo forme LC3-I následne uvoľňovaná späť do cytosolu (Kimura et al., 2007).

LC3-II proteín je nutný pre rast a následné uzatvorenie membrány autofagozómu (Fujita et al., 2008), uplatňuje sa na sekvestracii materiálu pri degradácii nesolubilných ubiquitinylovaných proteínov (viď kap. 3.3.2.2) a pravdepodobne aj na doprave autofagozómu k lyzozómu, prostredníctvom jeho interakcie s dyneínom (Jahreiss et al., 2008).



**Obr. 3-6. Konjugačné reakcie uplatňujúce sa v autofágii a porovnanie s ubiquitinovým systémom. (A)** proteíny cieleňé pre degradáciu v 26S proteazómu sú značené ubiquitinom (UB). Na ubiquitinyllácii sa podieľajú tri enzýmy: E1, E2 a E3, vďaka ktorým je UB prenesený na cieľový proteín. **(B)** Pre autofágiu sú nutné dve konjugačné reakcie Atg12 s Atg5 a LC3 s PE. Atg12 je aktivovaný pomocou Atg7, prenesený na Atg10 a nakoniec konjugovaný s Atg5. Atg12-Atg5 konjugát následne vytvára multimerný komplex s Atg16. Pro-LC3 je procesovaný na cytosolickú formu, LC3-I s exponovaným C terminálnym glycínom. LC3-I je tiež aktivovaný Atg7, prenesený na Atg3 a po konjugácii s fosfatidylethanolaminom (PE) modifikovaný na membránovo-viazanú formu, LC3-II (prevzaté z Dumit a Dengjel, 2012). Pre vysvetlenie skratiek vid' „POUŽITÉ SKRATKY“.

### 3.3.2.5 Fúzia autofagozómu s lyzozómom a degradácia materiálu

U cicavcov nebol princíp fúzie autofagozómu s lyzozómom dodnes úplne objasnený. Ukazuje sa však, že je pre tento proces vyžadovaný proteín LAMP-2 a malá GTPáza Rab 7 (Jager et al., 2004). Dôležitú úlohu zohráva aj Beclin-1 a jeho väzbový proteín UVRAG (ultraviolet irradiation resistant-associated gene) (Liang et al., 2008). V autofagolyzozóme je sekvestrovaný materiál degradovaný lyzozomálnymi hydrolázami a výsledné anabolity sú transportované do cytosolu (He a Klionsky et al., 2009).



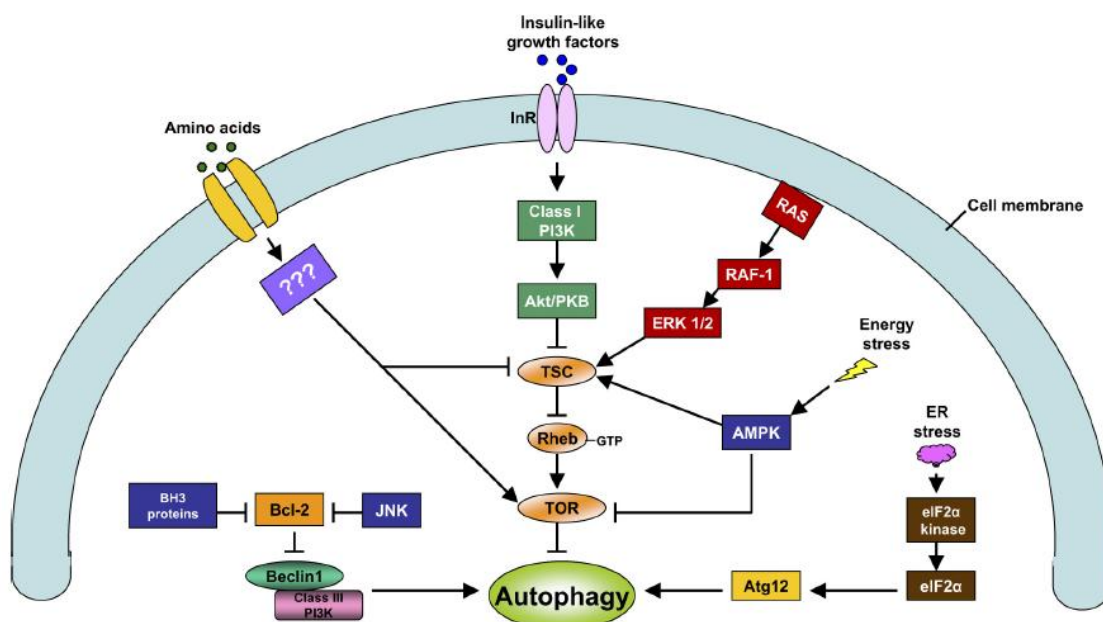
### 3.3.2.6 Regulácia autofágie

Autofágia je na jednotlivých úrovniach dráhy regulovaná viacerými signálnymi dráhami, ktoré môžu navzájom medzi sebou interagovať (prehľadne znázorňuje **Obr. 3-7**). Väčšina dnes dostupných informácií týkajúcich sa regulácie autofágie a jej signalizácie pochádza zo skúmania autofágie aktivovanej za podmienok hladovania.

Hlavný negatívny regulátor autofágie predstavuje kináza mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), tiež známa ako FRAP (FKBP12-rapamycin-associated protein) (Brown et al., 1994), RAFT1 (rapamycin and FKBP12 target 1) (Chen et al., 1994), RAPT 1 (rapamycin target 1) (Chiu et al., 1994) alebo SEP (sirolimus effector protein) (Sabatini et al., 1994). Táto Ser/Thr kináza funguje ako katabolická podjednotka dvoch štruktúrne a funkčne samostatných komplexov, označovaných ako komplex mTOR1 a mTOR2. Tie sa líšia svojou senzitivitou k rapamycinu, inhibítora kinázy mTOR, a aktiváciou rôznych cieľových substrátov.

Komplex mTOR1, rapamycin-senzitívny (viď kap. **3.7.3.1**), sa uplatňuje na regulácii translácie, transkripcie, autofágie a biogenéze ribozómov. Funguje ako environmentálny senzor zaznamenávajúci prítomnosť mitógenov a energetický a nutričný stav bunky (Fingar et al., 2004). Za nutrične bohatého stavu, v prítomnosti rastových faktorov a pri dostatku energie je mTOR1 komplex aktívny, fosforyláciou aktivuje rôzne proteíny zúčastňujúce sa na translácii a ribozomálnej biogenéze, napr. S6K (40S ribosomal protein S6 kinase) a 4E-BP1 (eIF4E-binding protein) (prehľadne v Magnuson et al., 2012) a zároveň prostredníctvom interakcie s komplexom ULK1:mAtg13:FIP200 inhibuje autofágiu (viď kap. **3.3.2.3**). V prípade nutričného hladovania bunky, deficitu rastových hormónov a bunkovej energie dochádza k inaktivácii mTOR1 komplexu, k zastaveniu proteosyntézy a k aktivácii autofágie (podrobnejšie viď kap. **3.3.2.3**) (prehľadne v Magnuson et al., 2012).





**Obr. 3-7. Hlavné signálne dráhy regulujúce autofágiu za podmienok nutričnej deprivácie (nedostatok aminokyselín, rastových faktorov), stresu endoplazmatického retikula (ER) a energetického stresu.** Jednotlivé dráhy sa navzájom ovplyvňujú a spoločne regulujú jednotlivé kroky autofágie. PI3K (fosfatidylinositol-3-kinase), AMPK (AMP dependent kinase), TSC (tuberous sclerosis complex), eIF-2 $\alpha$  (eukaryotic initiation factor-2 $\alpha$ ), InR (insulin receptor), RAS (rat sarcoma) (prevzaté z Periyasamy-Thandavan et al., 2009).

Komplex mTOR2 je považovaný za rapamycin-nesenzitívny (vid' kap. 3.7.3.1) (Sarbasov et al., 2006). Zúčastňuje na modulácii aktínového cytoskeletu a aktivita mTOR2 je nutná pre plnú aktiváciu kinázy Akt. Funkcia mTOR2 komplexu nie je zatiaľ úplne preskúmaná, ale ukazuje sa, že z hľadiska autofágie má tento komplex len doplnkovú funkciu (prehľadne v Polak a Hall, 2009).

### 3.4 Úloha autofágie vo fyziológii a patofyziológii

Za fyziologických podmienok je autofágia konštitutívne aktívna na nízkej bazálnej úrovni u mnohých bunkových typov a prispieva k udržaniu homeostázy ich intracelulárneho prostredia (Komatsu et al., 2005; Raben et al., 2008; Choi et al., 2009). Nárast autofagickej aktivity je snahou buniek adaptovať sa na nové podmienky indukované envirometálnym alebo intracelulárnym stresom, napr. hypoxiou, nutričným hladovaním, oxidačným a organelovým stresom (Galluzzi et al., 2008). Autofágie

zabraňuje vzniku rakoviny, neurogeneratívnych ochorení a mikrobiálnych infekcií, pričom jej aktivita s vekom klesá (prehľadne v Mizushima et al., 2008).

Autofágia je aktivovaná aj za podmienok nedostatku živín, kedy predstavuje alternatívnu cestu zdroja energie pre bunku. Degradácia bunkových organel a makromolekúl prostredníctvom autofágie počas krátkodobého hladovania poskytuje bunke substráty pre proteosyntézu, ale aj pre oxidáciu v mitochondriách za súčasnej tvorby ATP (prehľadne v Mizushima et al., 2004). Autofágia sprostredkováva mobilizáciu energie aj cestou degradácie zásobných látok bunky, akými sú triacylglyceridy (lipomakroautofágia) (Singh et al. 2009) alebo glykogén (glykofágia). Podrobný mechanizmus ale nie je zatiaľ vysvetlený.

### **3.5 Vzájomný vzťah autofágie a apoptózy**

Autofágia môže v biologickom systéme vystupovať ako „pro-survival“ mechanizmus (viď kap. 3.4), alebo môže byť naopak aktivovaná ako forma neapoptotickej bunkovej smrti. Dnes sa vie, že autofágia a apoptóza sú tesne prepojené mechanizmy, ktorých vzájomné spolupôsobenie môže v závislosti na druhu stimulu a bunkovom type nadobudnúť rôzne kontexty, ktoré prehľadne zosumarizoval Eisenberg-Lerner et al. (2009). V akom kontexte bude aktivácia autofágie vo vzťahu k indukovanej apoptóze za daných podmienok vystupovať, je determinované rozsahom a dĺžkou pôsobiaceho stimulu, pričom kľúčovú úlohu zohráva aj kapacita autofagického toku príslušného bunkového typu (prehľadne v Galluzi et al., 2008; Loos a Engelbrecht, 2009).

Zvýšenie aktivity autofágie môže predstavovať obranný mechanizmus aktivovaný bunkou v prípade pôsobenia rôznych stresových stimulov (viď kap. 3.4) so snahou prispôbiť sa zmenám prostredia, a tým zabrániť indukciu apoptózy (Castino et al., 2005; Ogata et al., 2006; Ding et al., 2007). Na druhej strane môže nárast aktivity autofágie fungovať ako proces, ktorý sa paralelne a koordinovane s apoptózou uplatňuje na eliminácii bunky (Yang et al., 2006; Basciani et al., 2007; Qian et al., 2007; Yokoyama et al., 2008), alebo ktorý je zodpovedný za regulovanú elimináciu buniek v prípade blokovanej apoptózy (Shimizu et al., 2004; Yu et al., 2004). Tiež bolo ukázané, že recyklácia bunkových komponent prostredníctvom zvýšenej aktivity

autofágie prispieva k syntéze ATP, ktoré je nevyhnutné pre translokáciu fosfatidylserínu na bunkový povrch (Qu et al., 2007) alebo pri zmršťovaní buniek (Inbal et al., 2002), a tým umožňuje v prípade nedostatku energie vykonanie exekučných fáz apoptózy.

Proteíny rodiny Bcl-2 (viď kap. 3.2.1.3), sa uplatňujú nielen na regulácii apoptózy, ale aj autofágie. Antiapoptotické proteíny rodiny Bcl-2 interagujú s beclinom-1, zabraňujú zostaveniu komplexu Vps34 (viď kap. 3.3.2.3), a tým inhibujú aktiváciu autofágie. Proapoptotickí zástupcovia rodiny Bcl-2 na druhej strane uvoľňujú beclin-1 z väzby s antiapoptotickými členmi (Sinha a Levine, 2008). Beclin-1 tiež predstavuje substrát pre aktivované kaspázy, ktorými je po indukcii apoptózy štiepený, čím dochádza k inaktivácii autofágie (Luo a Rubinsztein, 2010; Wirawan et al., 2010).

## 3.6 Autofágia a apoptóza u pankreatických $\beta$ buniek

Vzhľadom k tomu, že dostupnosť ľudských Langerhansových ostrovčekov vhodných pre výskum je problematická, poznatky o molekulárnom mechanizme patogenézy DM2T pochádzajú predovšetkým z experimentov vykonaných na zvieracích líniiach  $\beta$  buniek a zvieracích pankreatických ostrovčekoch.

Najčastejšími živočíšnymi modelmi pre výskum DM2T sú ZDF potkany (Zucker diabetic fatty rats) (Masiello, 2006), *ob/ob* (Zhang et al., 1994) alebo *db/db* myši (Lee et al., 1996). Mutácie, ktoré sa u týchto zvierat vyskytujú, vedú k spontánnemu vzniku DM2T. Najpoužívanejšími líniami pankreatických  $\beta$  buniek sú krysie línie INS-1 (Chick et al., 1977), RIN (Gazdar et al., 1980), BRIN-BD-11 (McClenaghan a Flatt, 1999) a myšie línie NIT-1 (Hamaguchi et al., 1991) a MIN6 (Miyazaki et al., 1990). Zatiaľ dostupné línie ľudských pankreatických  $\beta$  buniek sú línia NES2Y (Macfarlane et al., 1997) a línia EndoC- $\beta$  H1 (Ravassard et al., 2011).

### 3.6.1 Indukcia apoptózy mastnými kyselinami u pankreatických $\beta$ buniek

Kyselina palmitová (PA), kyselina stearová (SA), kyselina olejová (OA), kyselina palmitolejová (POA) a kyselina linolová predstavujú najviac zastúpené mastné kyseliny (MK) v krvi (Langerstedt et al., 2001), preto aj štúdium lipotoxicity u  $\beta$  buniek je zamerané na skúmanie pôsobenia týchto MK.

Schopnosť MK indukovať u  $\beta$  buniek apoptózu je determinovaná dĺžkou ich uhlíkového reťazca a obsahom dvojitých väzieb. Nasýtené MK (SA a PA) obsahujúce vo svojej štruktúre len jednoduché väzby, predstavujú u  $\beta$  buniek významné induktory apoptózy (Cnop et al., 2001; Eitel et al., 2002; Beeharry et al., 2004; Choi et al., 2007). Naopak pôsobenie nenasýtených MK, OA a POA, vo väčšine prípadov nevedie u  $\beta$  buniek k aktivácii apoptózy (Eitel et al., 2003; Welters et al., 2004; Diakogiannaki et al., 2007). Dokonca bolo preukázané, že nenasýtené MK sú schopné inhibovať apoptózu indukovanú nasýtenými MK pri ich spoluinkubácii. Toto antagonistické pôsobenie nasýtených a nenasýtených MK bolo demonštrované na líniiach  $\beta$  buniek aj na pankreatických ostrovčekov (Maedler et al., 2001; Eitel et al., 2003; Welters et al., 2004; Fürstová et al., 2008; Němcová-Fürstová et al., 2011).

Pôsobenie MK vedie u  $\beta$  buniek predovšetkým k aktivácii vnútornej apoptotickej dráhy (Maedler et al., 2003; Maestre et al., 2003; Choi et al., 2007), ale bola zaznamenaná aj aktivácia vonkajšej apoptickej dráhy. Pankreatické  $\beta$  bunky disponujú nízkym obsahom antioxidantných enzýmov (Tiedge et al., 1997) a v niektorých prípadoch bolo detegované, že indukcia apoptózy pôsobením MK je zapríčinená zvýšenou tvorbou kyslíkových radikálov (Carlsson et al., 1999; Piro et al., 2002). V rozpore s tým ale viaceré práce popierajú uplatnenie kyslíkových radikálov na sprostredkovaní apoptózy indukovanej MK (Cnop et al., 2001; Choi et al., 2007; Fürstová et al., 2008). Tiež bolo pozorované, že MK dokážu stimulovať apoptózu prostredníctvom aktivácie PKC (protein kinase C) (Hennige et al., 2010) alebo naopak inhibíciou PKB/Akt dráhy, ktorá je považovaná za „pro-survival“ signálnu dráhu (Wrede et al., 2002; Choi et al., 2007).

Pôsobenie vysokých koncentrácií MK vedie u buniek k ich akumulácii v podobe tricylglycerolov (TAG). Niektoré štúdie naznačili, že zatiaľ čo TAG syntetizované z nasýtených MK sú pre bunku toxické (Cnop et al., 2001), TAG vytvorené z nenasýtených MK sú bunkami lepšie metabolizovateľné (Moffit et al., 2005). Ďalšou možnou cestou, ktorou MK vedia sprostredkovať u  $\beta$  buniek apoptózu je prostredníctvom aktivácie stresu ER (Karaskov et al., 2006; Diakogiannaki et al., 2008). ER je zodpovedný za syntézu proteínov v bunke. V prípade akumulácie zle zložených proteínov dochádza k indukcii stresu ER a k aktivácii signálnej odpovede, označovanej ako UPR (unfolded protein response), ktorej cieľom je obnoviť homeostázu v ER (Szegezdi et al., 2006; Eizirik et al., 2008).

Dostupné informácie ukazujú, že pri indukcii apoptózy MK dochádza u pankreatických  $\beta$  buniek k aktivácii rôznych signálnych dráh a výsledky získané na rôznych experimentálnych modeloch si mnohokrát odporujú.

### **3.6.2 Indukcia autofágie pôsobením mastných kyselín u pankreatických $\beta$ buniek**

Správna architektúra a funkcia pankreatických  $\beta$  buniek je závislá na funkčnej autofagickej dráhe (Ebato et al., 2008, Jung et al., 2008). Naopak jej porucha pravdepodobne prispieva k vzniku DM2T. Naznačili to experimenty na ZDF potkanoch (Kaniuk et al., 2007). Na modeli obéznych myší s inaktivovanou autofágiou v pankreatických  $\beta$  bunkách Quan et al. (2012) zistili, že obezita prispieva k poruche autofágie. Detekcia zvýšenej vakuolizácie pomocou elektrónovej mikroskopie odhalila poškodenie autofagickej dráhy aj na ľudských pankreatických  $\beta$  bunkách pacientov s DM2T (Masini et al., 2009).

O regulácii autofágie účinkom MK je zatiaľ známe pomerne málo. Doterajšie *in vitro* pokusy na zvieracích modeloch preukázali, že MK regulujú u  $\beta$  buniek autofágiu (Choi et al., 2009; Las et al., 2011; Martino et al., 2012), ale dodnes nie je jasné, aký vplyv majú MK na autofagický tok. Bolo zaznamenané, že pôsobenie MK u  $\beta$  buniek spôsobuje zvýšenie autofagického toku (Choi et al., 2009; Martino et al., 2012), ale naopak môže viesť aj k bloku autofágie (Las et al., 2011). Prekvapujúce je, že na rovnakom bunkovom modeli, konkrétne na potkaních INS1  $\beta$  bunkách boli rôznymi metodickými prístupmi získané protikladné výsledky (Choi et al., 2009; Las et al., 2011). Doterajšie štúdium bolo zamerané predovšetkým na skúmanie účinku nasýtenej PA a nenasýtenej OA, pričom ale nebola upriamená pozornosť na odlišný vplyv pôsobenia nasýtenej a nenasýtenej MK, ktorý bol zaznamenaný pri indukcii apoptózy (viď kap. 3.8). Rovnako neexistujú experimenty, ktoré by systematicky porovnávali účinok rôznych MK na aktiváciu autofágie.

V akom vzťahu vystupuje autofágia ku apoptóze indukovanej MK, tiež nie je zatiaľ úplne preskúmané. Experimenty ale zatiaľ nasvedčujú tomu, že autofágia je aktivovaná ako obranný mechanizmus proti apoptóze indukovanej MK u potkaních  $\beta$  buniek (Choi et al., 2009; Las et al., 2011; Martino et al., 2012), pankreatických

ostrovčekoch (Quan et al., 2012) a aj na  $\beta$  bunkách pacientov s DM2T (Masini et al., 2009).

### 3.7 Metódy pre štúdium autofágie

V prípade vyšších eukaryot, u ktorých molekulárne princípy autofágie nie sú ešte úplne objasnené, existuje pre analýzu autofágie len obmedzené množstvo spoľahlivých prístupov (prehľadne v Klionsky et al., 2008). Dodnes chýba špecifická metóda, ktorá by sama o sebe pri konkrétnych podmienkach jednoznačne preukázala alebo naopak vyvrátila zmenu aktivity autofágie v experimentálnom systéme.

Pri skúmaní autofágie je dôležité si uvedomiť, že ide o analýzu dynamického a cyklického deja. Funkčný prechod autofagickou dráhou je definovaný ako autofagický tok. Zistenie, že určité experimentálne podmienky spôsobujú akumuláciu autofagických vakuol (autofagozóm, autolyzozóm) v systéme môže znamenať buď zvýšenie autofagického toku, alebo naopak inhibíciu degradačných krokov tejto dráhy, tzv. degradačný blok autofágie (Rubinsztein et al., 2009). Keďže sa tieto dva stavy medzi sebou zásadne líšia, štúdium autofágie je založené na detekcii autofagických štruktúr (fagofóru, autofagozómu, autolyzozómu) v kombinácii s monitorovaním autofagického toku (prehľadne v Klionsky et al., 2008).

#### 3.7.1 Detekcia autofagozómov a autofagolyzozómov

Autofagické štruktúry je možno pomerne jednoducho detegovať pomocou acidotropných farbív, z ktorých najpoužívanejšie sú monodansylcadaverin (MDC) a akridínová oranžová (AO) alebo pomocou fluorescenčne značeného proteínu LC3B. Jednoznačná špecificita MDC pre farbenie len autofagických štruktúr bola spochybnená vedeckou skupinou Mizushima et al. (2001). Dnes sa tento typ farbenia používa len pre primárny monitoring prítomnosti autofágie v *in vivo* podmienkach, ale nie pre špecifickejšiu analýzu autofágie (Choi et al., 2009; Martino et al., 2012).

AO je slabo bázičné fluorescenčné farbivo, ktoré môže v bunkách existovať v nenabitom alebo nabitom stave. Ako neutrálna molekula voľne prestupuje bunkovými membránami, pričom farbí DNA a cytoplazmu na svetlozeleno. Po dosiahnutí kyslého prostredia v bunkových organelách, akými sú lyzozómy, endozómy či

autofagolyzozómy (súhrne označované ako AVOs-acidic vesicular organelles), sa AO nabíja kladne, nie je viac schopná prestupovať bunkovými membránami a koncentruje sa v AVOs. Akumulovanú AO je možné následne detegovať pomocou prietokovej cytometrie alebo fluorescenčnej mikroskopie na základe červeného fluorescenčného žiarenia, ktorého intenzita zodpovedá intenzite kyslého prostredia v danej organele (prehľadne v Chen et al., 2010).

Detekcia autofagozómov na základe fluorescečne značeného proteínu LC3B využíva dva metodické prístupy, a to (1) imunodetekciu endogénneho LC3B alebo (2) detekciu transfekovaného LC3B sfúzaného s GFP (green fluorescent protein) (LC3B-GFP) u transfekovaných buniek. Za normálnych podmienok je LC3B distribuovaný v cytoplazme difúzne, v závislosti na bazálnej úrovni autofágie v bunkovom systéme. Po indukcii autofágie je rekrútovaný na preautofagozomálnu membránu, kde sa akumuluje a autofagozómy je možné vizualizovať pomocou fluorescenčnej mikroskopie v podobe tzv. „LC3B dots“ (prehľadne v Klionsky et al., 2008; Barth et al., 2010).

### **3.7.2 Metódy založené na sledovaní proteínových markerov autofágie**

Hladiny proteínov, ktoré sú buď priamo súčasťou membrán autofagických štruktúr alebo ide o proteíny, ktoré sú procesom autofágie degradované, je možné detegovať pomocou metódy western blot (WB). V prípade autofágie sú u cicavcov najčastejšie cestou WB analyzované hladiny proteínov LC3-II a p62, ktorých expresiu sme detegovali aj v rámci tejto DP.

LC3-I a LC3-II formu proteínu LC3 (viď kap. 3.3.2.4.2) je možné od seba jednoducho rozlíšiť metódou WB na základe toho, že LC3-II má vďaka svojej konjugácii s PE vyššiu hydrofobicitu, a teda aj vyššiu elektroforetickú pohyblivosť. Vzhľadom k tomu, že autofagozóm je prechodnou štruktúrou, aj životnosť LC3-II proteínu je relatívne krátka a hladiny LC3-II zodpovedajú autofagickej aktivite v danom momente, pričom neodzrkadľujú prechod autofagickou dráhou (prehľadne Klionsky et al., 2008). U cicavcov sú známe 3 izoformy LC3 proteínu: LC3A, LC3B a LC3C. Bolo preukázané, že jedine hladina expresie proteínu LC3B-II koreluje s mierou autofágie

a preto je hladina tohto proteínu praxi bežne využívaná pre detekciu autofágie (prehľadne v Mizushima et al., 2004 a v Barth et al., 2010).

Proteín p62 je v prípade indukcie autofágie kontinuálne degradovaný, pričom inhibícia autofágie zapríčiňuje hromadenie tohto proteínu v cytosole (Ichimura et al., 2008). Detekcia hladín proteínu p62 pomocou WB preto slúži ako marker pre monitorovanie autofagického toku. Keďže sa jedná o nepriamy marker autofágie, je pri jeho detekcii nutné získané výsledky zároveň overiť aj detekciou iného špecifickejšieho markeru autofágie, napr. LC3B-II (prehľadne v Mizushima et al., 2004; Klionsky et al., 2008).

### 3.7.3 Monitorovanie autofagického toku

Pomocou analýzy autofagického toku je možné v skúmanom systéme odhaliť prípadný degradačný blok autofágie. Ten je charakterizovaný poruchou degradačných fáz autofágie, následkom čoho dochádza k akumulácii autofagozómov. Tento typ analýzy je založený na skúmaní rýchlosti odbúravania rádioaktívne značených proteínov s dlhým polčasom života, ktoré sú degradované predovšetkým cestou autofágie (Hershko a Ciechanover, 1998). Degradácia týchto autofagických substrátov je stanovená po krátkodobej inkubácii buniek s [<sup>14</sup>C]-leucínom alebo [<sup>14</sup>C]-valínom na základe časového priebehu uvoľňovania „acid-soluble“ rádioaktivity z rádioaktívne značených proteínov. Ďalším spôsobom je porovnanie vlastností experimentálneho systému v prítomnosti a v neprítomnosti inhibítorov degradačných fáz autofágie, napr. detekciou hladín proteínov LC3B-II pomocou metódy WB (prehľadne v Mizushima et al., 2004; Klionsky et al., 2008; Rubinsztein et al., 2009).

### 3.7.4 Modulátory autofágie použité v experimentoch tejto diplomovej práce

K účelu analýzy autofágie sú často používané chemické modulátory, ktoré dokážu túto dráhu na rôznych úrovniach regulovať pozitívne alebo negatívne (vid' **Obr. 3-8**). Vzhľadom k tomu, že bafilomycin A1, E-64d, pepstatin A a rapamycin boli použité k modulácii autofágie v experimentálnom systéme v tejto DP, je ich účinok na autofagickú dráhu charakterizovaný podrobnejšie.



## **Bafilomycin A1**

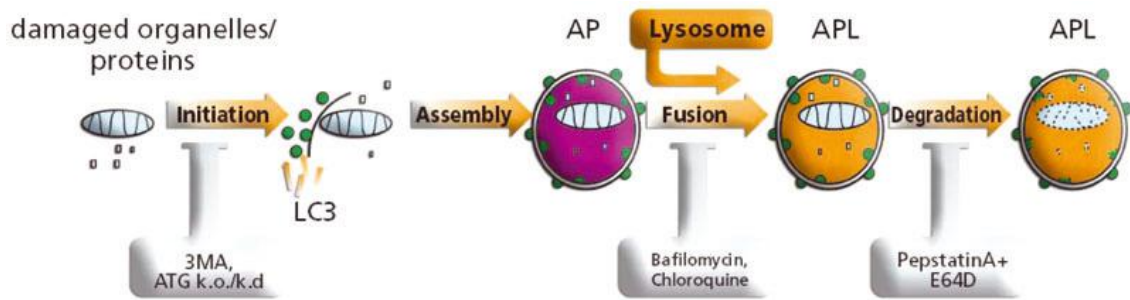
Bafilomycin A1 blokuje funkciu lyzozomálnej  $H^+$  ATPázy, ktorá je zodpovedná za okysľovanie lumen organel, v ktorých sa nachádza. Použitie bafilomycinu A1 inhibuje degradačné kroky autofágie, ale dodnes nie je úplne objasnené či na úrovni fúzie autofagozómu s lyzozómom (Yamamoto et al., 1998) alebo až v štádiu lyzozomálnej degradácie v autofagolyzozóme (Fass et al., 2006). V jeho prítomnosti je možné u buniek na základe expresie LC3B-II detegovať len syntetickú fázu autofagozómov. Porovnaním s vlastnosťami buniek v kontrolných podmienkach alebo vystavených účinku sledovaného stimulu, u ktorých detegujeme ako syntézu, tak aj degradáciu autofagozómov, je možné odhaliť autofagický blok (Rubinsztein et al., 2009).

## **E-64d a pepstatin A**

Ďalšou možnosťou inhibície autofágie je blokovanie funkcie lyzozomálnych proteáz. To zabráňuje degradácii sekvestrovaného materiálu v autofagolyzozómoch, následkom čoho dochádza k akumulácii autolyzozómov v cytoplazme. Na tieto účely sa používa koktail enzýmov E-64d a pepstatínu A. E-64d voľne prechádza plazmatickou membránou a inhibuje cathepsin B, H a L, zatiaľ čo pepstatin A blokuje aktivitu cathepsinu D a E (Tamai et al., 1987).

## **Rapamycin**

Rapamycin, látka produkovaná *Streptomyces hygroscopicus*, predstavuje špecifický alosterický inhibítor mTOR1 komplexu. Rapamycin špecificky interaguje s intracelulárnym receptorom FKBP12 (FK506-binding protein 12). Tento komplex následnej interaguje s doménou mTOR1 komplexu (viď kap. 3.3.2.6), inhibuje jeho aktivitu, a tým spôsobuje aktiváciu autofágie v experimentálnom systéme (prehľadne v Zhou a Huang, 2010). FKBP12/rapamycin komplex sa neviaže na mTOR2 komplex, preto bol pôvodne považovaný za rapamycin-nesenzitívny. Bolo ale zistené, že u niektorých bunkových typov viedlo dlhodobé pôsobenie rapamycinu (24 a viac hod) i k poruche zostavenia mTOR2 komplexu a k inhibícii jeho funkcie (Sarbasov et al., 2006).



**Obr. 3-8. Inhibícia autofágie v jednotlivých krokoch maturácie autofágických vakuol.** Proces autofágie môže byť inhibovaný na viacerých stupňoch. V štádiu tvorby fagofóru pomocou 3-MA; zabránením acidifikácie lyzozómov použitím chloroquinu či bafilomycínu A1; inhibíciou funkcie lyzozomálnych proteáz aplikáciou pepstatínu A a E-64d (AP-autofagozóm, APL-autofagolyzozóm, 3MA-3-methyladenine) (prevzané z Las a Shirihai, 2010).

### 3.7.5 Umlčanie expresie esenciálnych proteínov autofágie pomocou siRNA

Najšpecifickejšou metódou pre štúdium úlohy autofágie v experimentálnom systéme je inhibícia autofágie „umlčaním“ expresie proteínov esenciálnych pre autofágiu za použitia siRNA (small interfering RNA). Napriek tomu, že LC3 predstavuje hlavný marker autofágie, ukázal sa ako nevhodný kandidát pre inhibíciu autofágie cestou siRNA (Klionsky et al., 2008).

## 3.8 Mechanizmus indukcie apoptózy mastnými kyselinami u $\beta$ buniek línie NES2Y

Táto DP je súčasťou väčšieho projektu zameraného na výskum mechanizmu indukcie apoptózy MK u pankreatických  $\beta$  buniek v súvislosti s ochorením DM2T. Výsledky predchádzajúce zadaniu témy tejto práce preukázali, že nasýtená SA o koncentrácii 1 mM indukuje u ľudskej línie pankreatických  $\beta$  buniek NES2Y účinne apoptózu. Analýza ďalej ukázala, že SA signifikantne aktivuje iniciačné kaspázy 2, 8, a 9 a exekučné kaspázy 6 a 7. Naopak aktivácia kaspázy 3 účinkom SA nebola u tejto bunkovej línie preukázaná. Výsledky tiež naznačili, že indukcia apoptózy pôsobením SA je sprevádzaná aktiváciou stresu ER. Pri spoločnej inkubácii nasýtenej SA a aj nenasýtenej OA bol proapoptický účinok 1 mM SA, na úrovni aktivácie kaspáz

a aj indukcie stresu ER úplne inhibovaný účinkom nenasýtenej OA v koncentrácii už 0,2 mM. Pôsobenie samotnej nenasýtenej OA nepreukázalo schopnosť indukovať u  $\beta$  buniek apoptózu, pričom vyššie koncentrácie tejto nenasýtenej MK dokonca viedli k proliferácii buniek (Fürstová et al., 2008; Němcová-Fürstová et al., 2011).

Nedávno sa zistilo, že na modulácii stresu ER indukovaného účinkom SA sa u  $\beta$  buniek línie NES2Y uplatňuje kaspáza 2 a rovnako aj kináza JNK (c-Jun N-terminal kinase). Zároveň bolo ale preukázané, že ani kaspáza 2, ani aktivácia signálnej dráhy JNK sa u tejto pankreatickej línie nepodieľa na sprostredkovaní apoptózy indukovanej pôsobením SA (Němcová-Fürstová et al., 2013). Molekulárne mechanizmy, ktoré vedú k aktivácii kaspáz a stresu ER pôsobením MK, sa zatiaľ nepodarilo u  $\beta$  buniek línie NES2Y (Fürstová et al., 2008; Němcová-Fürstová et al., 2011), ani u iných experimentálnych modelov používaných pre štúdium patogenézy DM2T detailnejšie vysvetliť.

## 4 CIELE PRÁCE

Objavenie markerov autofágie v Langerhansových ostrovčekoch pacientov s DM2T (Masini et al., 2009) prinieslo so sebou otázku, akú úlohu zohráva autofágia vo vzťahu k apoptóze, ktorá je považovaná za hlavný mechanizmus redukcie množstva  $\beta$  buniek v priebehu tohto ochorenia. Či autofágia predstavuje obranný mechanizmus  $\beta$  buniek proti indukcii apoptózy alebo naopak ide o proces, ktorý akceleruje bunkovú smrť, a tým prispieva k poklesu pankreatických  $\beta$  buniek, nie je stále vysvetlené.

Za jeden z hlavných faktorov zodpovedných za indukciu apoptózy pankreatických  $\beta$  buniek u pacientov s DM2T je považovaná zvýšená hladina MK v krvi. Avšak mechanizmus, ktorým MK indukujú apoptózu u pankreatických  $\beta$  buniek, nie je doposiaľ uspokojivo objasnený (viď kap. 3.6.1).

Snahou tejto DP je charakterizovať úlohu autofágie v apoptóze indukovanej MK u ľudských pankreatických  $\beta$  buniek línie NES2Y a prispieť k doterajším poznatkom v rámci tejto problematiky.

Konkrétnymi cieľmi tejto DP bolo zistiť:

- (1) či SA, nasýtená MK, v koncentrácii indukujúcej apoptózu, indukuje u  $\beta$  buniek línie NES2Y autofágiu a či je pozorovaný účinok ovplyvnený pri spoluinkubácii s OA, nenasýtenou MK, ktorá inhibuje apoptózu indukovanú pôsobením SA.
- (2) účinok testovaných MK na autofagický tok
- (3) na základe modulácie aktivity autofágie, akú úlohu zohráva autofágia v regulácii apoptózy indukovanej SA a v inhibičnom efekte OA na proapoptotické pôsobenie SA

Metodika pre analýzu autofágie nebola v našom laboratóriu doposiaľ používaná. Preto riešeniu vyššie stanovených úloh predchádzalo zavedenie metód pre detekciu autofágie pomocou niekoľkých nezávislých metód, konkrétne pomocou prietokovej cytometrie, konfokálnej mikroskopie a metódou western blot.

# 5 MATERIÁL

## 5.1 Použité chemikálie

Pokiaľ nie je uvedené inak, boli použité chemikálie od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

akridínová oranžová

akrylamid/bisakrylamid, 30% roztok

amonium persulfát (Amersham Biosciences, Amersham, Veľká Británia)

apotransferrin

Atg7 siRNA (kat. č. 4392420) (Ambion-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

bafilomycin A1 zo *Streptomyces griseus*

boviný serový albumin (BSA), frakcia V (Serva, Heidelberg, Nemecko)

boviný sérový albumin neobsahujúci mastné kyseliny (BSA, essentially fatty acid-free)

bromfenolová modrá

dimethylsulfoxid (DMSO)

DL-dithiotreitol (DTT), 1 M roztok

E-64d

EDTA

ethanol, p.a. (Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové, ČR)

fetálne bovinne sérum (FBS)

glycerol

glycin

HEPES

hydroxid sodný (Penta, Praha, ČR)

chlorid sodný (Penta, Praha, ČR)

INTERFERin (PolyPlus-transfection, Illkirch, France)

kyselina citrónová

kyselina chlorovodíková (Penta, Praha, ČR)

kyselina listová

kyselina octová (Penta, Praha, ČR)

kyselina olejová

kyselina stearová

L-glutamin, 200 mM roztok (Gibco-Life Technologies, Rockville, MD, USA)

lyzačný pufor RIPA

merkptoethanol, 50 mM roztok (Gibco-Life Technologies, Rockville, MD, USA)

methanol, p.a. (Penta, Praha, ČR)

mix inhibítorov fosfatáz „PhosSTOP“ (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemecko)

mix inhibítorov proteáz „cCOMPLETE“ (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemecko)

N, N, N', N' - tetramethylendiamin (TEMED) (Serva, Heidelberg, Nemecko)

NaHCO<sub>3</sub>  
NaHCO<sub>3</sub>, 7,5% roztok  
NaOH  
nešpecifická siRNA (kat. č. AM4635) (Ambion-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)  
Optimem (Gibco-Life Technologies, Rockville, MD, USA)  
paraformaldehyd  
penicillin G  
pepstatin A  
Ponceau S  
Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard (Bio-Rad, Hercules, USA)  
pyruvát sodný, 100 mM roztok  
rapamycin (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA)  
10x RPMI 1640  
sodium dodecylsulfát (SDS) (Bio-Rad, Hercules, USA)  
streptomycin  
Tris  
trypsin  
Tween-20 (Serva, Heidelberg, Nemecko)  
Vectashield s DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole ) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)

## 5.2 Použité kity a súpavy

NEFA C kit (Wako, Neuss, Nemecko)  
BCA Protein Assay Reagent kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)  
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)

## 5.3 Použité prístroje

pipety Biohit (Helsinki, Finsko), Eppendorf (Hamburg, Nemecko)  
vortex MS2 Minishaker (IKA, Staufen, Nemecko)  
spektrofotometer Sunrise (Tecan, Männedorf, Švajčiarsko)  
inkubačný box IGO 150 (Jouan, Saint-Herblain, Francúzko)  
chladená centrifuga BR4i (Jouan, Saint-Herblain, Francúzko)  
centrifuga B4i (Jouan, Saint-Herblain, Francúzko)  
suchý termoblok (Major Science, Taiwan)  
zdroje elektrického prúdu (Bio-Rad, Hercules, USA)  
systém na SDS-PAGE Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System (Bio-Rad, Hercules, USA)  
systém na western blot Mini-Trans Blot Cell (Bio-Rad, Hercules, USA)

pH meter InoLab (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)  
elektroda Orion ROSS Ultra (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)  
kývačka MiniRocker MR-1 (Biosan, Riga, Lotyšsko)  
analytické váhy 770 ALJ 120-4 (KERN, Balingen-Frommern, Nemecko)  
chladená kamera Gel Logic 4000Pro (CareStream, Rochester, NY, USA)  
svetelný mikroskop Leica DMIL (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemecko)  
laminárny box Holten LaminAir (Jouan Nordic, Allerød, Dánsko)  
stolná minicentrifuga Minicentrifuge C-1200 (Labnet, Edison, NJ, USA)  
hlbokomraziaci box (Sanyo, Japonsko)  
vodný kúpeľ (Mettler, Nemecko)  
spektrofotometer Helios (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)  
FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)  
konfokálny mikroskop Leica TCS SP5 (Bannockburn, IL, USA)

## 5.4 Základné roztoky používané pri kultivácii buniek a aplikácii mastných kyselín

### **základné médium „R0“**

411,5 ml H<sub>2</sub>O (kvalita pre tkanivové kultúry)  
50 ml 10x RPMI 1640  
10 ml 200 mM L-glutamin  
5 ml 100 mM pyruvát sodný  
5 ml roztok antibiotík (10<sup>4</sup> U/ml penicillin, 1,0 g/ml streptomycin)  
0,5 ml 2,3 mM kyselina listová  
13 ml NaHCO<sub>3</sub> (7,5%)  
5 ml 1,5 M HEPES, pH 7,2  
0,5 ml 50 mM merkaptoethanol  
100,0 ml celkový objem  
-skladovať pri 4 °C

### **kultivačné médium** (Musílková a Kovář, 2001)

90 ml základného média R0 zmiešať s 10 ml FBS (inaktivované zahriatím na 56°C 30 min)

### **železom saturovaný transferrin (5 mg/ml)** (Kovář a Franěk, 1989)

40 mg apotransferrinu rozpustiť v 5,4 ml H<sub>2</sub>O (kvalita pre tkanivové kultúry), pridať 2 ml 250 μM FeCl<sub>3</sub>.6 H<sub>2</sub>O v 4 mM kyseline citrónovej a premiešať. Pre úpravu pH na hodnotu 7 pridať 0,3 ml 10% NaHCO<sub>3</sub> rozpusteného v H<sub>2</sub>O (kvalita pre tkanivové kultúry), premiešať a pH overiť pomocou pH papierika. V prípade potreby pH ďalej upraviť pomocou 10% NaHCO<sub>3</sub>. Vzniknutý roztok doplniť H<sub>2</sub>O (kvalita pre tkanivové kultúry) do celkového objemu 8 ml, dobre premiešať a nechať stáť pri izbovej teplote minimálne 15 minút. Takto pripravený roztok transferrinu preniesť do dialyzačného čreva Spectra/Por 3 Membrane (Spectrum Laboratories, USA) a dialyzovať v PBS za

stáleho miešania v chladničke cez noc. Po dialýze, pri ktorej došlo k odstráneniu železa nenaviazaného na transferrin, roztok transferrinu sterilizovať filtráciou cez striekačkový filter (póry 0,22 µm).

#### **koncentrát pre transferrinové médium (10x Tf)**

8,0 ml	5 mg/ml železom saturovaný transferrin (vid' vyššie)
8,0 ml	20 mM ethanolamin
8,0 ml	5 µM hydrokortizon
8,0 ml	20 mM kyselina askorbová
0,8 ml	$5 \times 10^{-4}$ M $\text{CdSO}_4 \cdot 8/3 \text{H}_2\text{O}$
0,8 ml	$1 \times 10^{-4}$ M $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
0,8 ml	$1 \times 10^{-4}$ M $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
0,8 ml	$5 \times 10^{-6}$ M $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
0,8 ml	$5 \times 10^{-6}$ M $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
0,8 ml	$2,5 \times 10^{-6}$ M $\text{NiSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
0,8 ml	$5 \times 10^{-4}$ M $\text{Na}_2\text{SeO}_3$
0,8 ml	$2 \times 10^{-3}$ M $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
0,8 ml	$2,5 \times 10^{-6}$ M $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
0,8 ml	$2,5 \times 10^{-5}$ M $\text{NH}_4\text{VO}_3$
0,8 ml	$1 \times 10^{-2}$ M $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
759,2 ml	základné médium R0
800,0 ml	celkový objem

-aliquóty skladovať pri  $-20^\circ\text{C}$

#### **transferrinové médium**

90 ml základného média R0 zmiešať s 10 ml koncentrátu pre transferrinové médium (10x Tf)

#### **trypsín**

0,4 g	trypsín
0,04 g	EDTA

-rozpustiť v 200 ml PBS (vid' nižšie), pridaním NaOH upraviť pH na 7,4, sterilizovať filtráciou cez striekačkový filter (póry 0,22 µm)

-aliquóty skladovať pri  $-20^\circ\text{C}$

#### **10% BSA (w/v) v transferrinovom médiu**

12 g	BSA
120 ml	transferrinové médium

-pridávaním  $\text{NaHCO}_3$  upraviť pH na 7,4, sterilizovať filtráciou cez striekačkový filter (póry 0,22 µm)

-aliquóty skladovať pri  $-80^\circ\text{C}$

#### **PBS**

8 g	NaCl
0,20 g	KCl
2,89 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$



0,20 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
-doplniť do 1 l vodou (kvalita pre tkanivové kultúry)  
-upraviť pH na 7,4, sterilizovať v autokláve, skladovať pri izbovej teplote

## 5.5 Roztoky mastných kyselín

### 5.5.1 Príprava zásobných roztokov mastných kyselín viazaných na BSA

Vzhľadom k tomu, že MK sú vo vode nerozpustné, pre experimenty sme používali MK viazané na BSA. Pripravili sme 0,3 M roztoky kyseliny stearovej (SA) a kyseliny olejovej (OA) v 100% ethanole (p.a. kvalita). Aby sa roztok SA úplne rozpustil, bolo nutné zahriatie cca 10 min pri 45°C. Ethanolové roztoky MK sme za stáleho vortexovania pridali do roztoku 10% BSA v transferrinovom médiu tak, aby výsledná koncentrácia MK v tomto roztoku bola 10 mM a nechali za stáleho trepania inkubovať 6 hod vo vodnom kúpeli pri 37°C. Z roztoku MK v transferrinovom médiu s 10% BSA sme potom odstránili nerozpustené súčasti a zároveň roztok sterilizovali filtráciou cez striekačkový filter (póry 0,22  $\mu\text{m}$ ). Odobrali sme cca 200  $\mu\text{l}$  roztoku pre stanovenie aktuálnej koncentrácie MK v pripravených roztokoch a alikvóty uskladnili pri -80°C. Tento postup prípravy roztokov MK bol zavedený Mgr. Němcovou, PhD. (Fürstova et al., 2008).

### 5.5.2 Stanovenie koncentrácie mastných kyselín

Koncentrácie MK v pripravených roztokoch sme stanovili pomocou kitu NEFA C. Z roztoku štandardu z kitu (kyselina olejová o známej koncentrácii) sme vytvorili riediacu radu vzoriek o koncentrácii 0 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM a 1 mM. Roztoky SA a OA pripravené postupom uvedeným v kap. 5.5.1 sme v tripletoch nariedili 10x v destilovanej vode. 20  $\mu\text{l}$  štandardov a nariedených vzoriek sme preniesli do skúmaviek pre FACS analýzu (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), pridali 900  $\mu\text{l}$  roztoku A z kitu a inkubovali 10 min pri 37°C. Následne sme pridali 450  $\mu\text{l}$  roztoku B z kitu a opäť inkubovali 10 min pri 37°C. Intenzitu ružového zafarbenia vzniknutého po pridaní roztoku B, ktoré odpovedá v priamej úmere koncentrácii MK vo vzorke, sme kvantifikovali zmeraním absorbancie vzoriek pri 550 nm na spektrofotometre Helios (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Z nameraných

hodnôt absorbaníí štandardov sme stanovili rovnicu regresie, na základe ktorej sme vypočítali aktuálnu koncentráciu pripravených roztokov SA a OA.

## 5.6 Zásobné roztoky autofagických modulátorov

Autofagické modulátory sme rozpustili v takom objeme DMSO, aby sme vytvorili ich zásobné roztoky o koncentrácii 50 µg/ml bafilomycin A1, 10 mg/ml E-64d, 10 mg/ml pepstatin A, 20 mM rapamycin. Alikvóty sme uskladnili pri -20°C.

## 5.7 Ďalšie použité roztoky

### 10% amonium persulfát (APS)

1 g APS  
10 ml destilovaná voda  
-aliquóty skladovať pri -20°C

### 0,5 M Tris-HCl; pH 6,8

6 g Tris  
60 ml destilovaná voda  
-pridaním HCl upraviť pH na 6,8 a objem doplniť destilovanou vodou do 100 ml  
- skladovať pri 4°C

### 1,5 M Tris-HCl; pH 8,8

27,23 g Tris  
80 ml destilovaná voda  
-pridaním HCl upraviť pH na 8,8 a objem doplniť do 150 ml destilovanou vodou  
-skladovať pri 4°C

### 10% SDS

10 g SDS  
100 ml destilovaná voda  
-skladovať pri izbovej teplote

### vzorkový pufoer

3,55 ml destilovaná voda  
1,25 ml 0,5 M Tris-HCl (pH=6,8)  
2,5 ml glycerol  
2 ml 10% SDS  
0,2 ml 0,5% brómfenolová modrá  
0,5 ml 2-merkaptóethanol  
-skladovať pri 4°C

**„Running buffer“ (10x koncentrát)**

30 g Tris  
144 g glycín  
10 g SDS

-doplniť na objem 1 l destilovanou vodou; skladovať pri 4°C

-použitie v experimentoch: 10x riediť v destilovanej vode, skladovať pri 4°C

**TOWBIN (10x koncentrát)**

30 g Tris  
144 g glycín  
1 l destilovaná voda

-skladovať pri 4°C

- použitie v experimentoch: 10x riediť v destilovanej vode, skladovať pri 4°C

**roztok Ponceau S**

95 ml destilovaná voda  
5 ml kys. octová  
zrnká Ponceau S

- skladovať pri izbovej teplote

**TBS (10x koncentrát)**

12,4 g Tris  
75,97 g NaCl  
1000 ml destilovaná voda

-skladovať pri 4°C

-použitie v experimentoch: 10x riediť v destilovanej vode, pomocou HCl upraviť pH na 7,5

**TBST**

11 1x TBS (viď vyššie) zmiešať s 1 ml Tween-20

# 6 METÓDY

## 6.1 Kultivácia buniek

### 6.1.1 Bunkový model

Pre experimenty bola použitá línia ľudských pankreatických  $\beta$  buniek NES2Y (poskytnutá nášmu laboratóriu Dr. Rogerom Jamesom, Leicester University, Veľká Británia). Táto línia bola derivovaná z pacienta s perzistentnou hyperinzulíniou (Macfarlane et al., 1997). Jedná sa o inzulín sekretujúce bunky s inzulínovým promótorom nesenzitívnym pre glukózu, u ktorých bolo preukázané, že pôsobenie MK nemá vplyv na sekréciu inzulínu (Němcová-Fürstová et al., 2011).

Bunkovú líniu NES2Y sme kultivovali v termostate pri 37°C v humidnej atmosfére s 5% CO<sub>2</sub> na Petriho miskách pre tkanivové kultúry o priemere 60 mm (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgicko) v 5 ml kultivačného média. Stav buniek sme pravidelne kontrolovali mikroskopom. Bunky sme pasážovali v závislosti na ich konfluencii, minimálne dvakrát za týždeň. Pre dlhodobé uchovávanie boli bunky zamrazené v tekutom dusíku v kultivačnom médiu doplneným 10% DMSO. Zamrazovanie a rozmrazovanie bunkovej línie vykonávala v prípade potreby laborantka.

### 6.1.2 Pasážovanie

Pred pasážovaním sme skontrolovali, či u kultivovaných buniek nedošlo ku kontaminácii, a v akom konfluenčnom štádiu sa bunky na jednotlivých Petriho miskách nachádzajú. Pasážovali sme v laminárnom boxe a celý čas sme dbali na sterilitu práce. Najskôr sme bunkám odsali staré médium, bunky opláchli 500  $\mu$ l trypsínu (37°C) a hneď odsali. K bunkám sme znova pridali 500  $\mu$ l trypsínu (37°C) a nechali ho pôsobiť pri 37°C, kým sa bunky neoddelili od plastového podkladu misky. Pustené bunky sme resuspendovali v čerstvom kultivačnom médiu a objem zodpovedajúci požadovanému riedeniu (obvykle 0,5 a 1 ml) sme preniesli do novej Petriho misky a doplnili čerstvým kultivačným médiom na celkový objem 5 ml.

## 6.2 Experimenty

### 6.2.1 Experimentálne podmienky

V pokusoch sme porovnávali chovanie  $\beta$  buniek línie NES2Y v štyroch experimentálnych podmienkach:

1. **Kontrola:** kontrolné bunky bez aplikácie MK; bunky boli vystavené pôsobeniu transferrinového média s 2% BSA bez MK
2. **SA:** indukcia apoptózy nasýtenou MK; bunky boli vystavené pôsobeniu 1 mM SA v transferrinovom médiu s 2% BSA
3. **SA+OA:** proapoptotické pôsobenie nasýtenej MK tlmené účinkom nenasýtenej MK; bunky boli vystavené 1 mM SA v kombinácii s 0,2 mM OA v transferrinovom médiu s 2% BSA
4. **OA:** účinok samotnej nenasýtenej MK v koncentrácii inhibujúcej apoptózu indukovanú nasýtenou MK; bunky boli vystavené pôsobeniu 0,2 mM OA v transferrinovom médiu s 2% BSA

Úlohu autofágie v regulácii apoptózy indukovanej MK sme sledovali na základe miery aktivácie apoptózy po pôsobení MK (1) u buniek s inhibovanou/aktivovanou autofágiou po aplikácii autofagických modulátorov (vid' kap. 6.2.4) a (2) u buniek s inhibovanou autofágiou umlčaní expresie esenciálneho autofagického proteínu Atg7 prostredníctvom siRNA (vid' kap. 6.2.5).

### 6.2.2 Nasadenie buniek pre experimenty

Pre experimenty boli používané bunky v exponenciálnej fáze rastu. Pri ich nasadzovaní sme pracovali sterilne v laminárnom boxe. Bunky boli nasadzované do 6-jamkových (pre analýzu metódou western blot) alebo 12-jamkových doštičiek (pre analýzu metódou prietokovej cytometrie) (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgicko). Pre analýzu metódou konfokálnej mikroskopie boli bunky nasadené na sterilné sklíčka o priemere 12 mm do 24-jamkových doštičiek (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgicko). Počet buniek a celkový objem média pri nasadzovaní do jednotlivých typov kultivačného plastiku je uvedený v **Tab. 6-1**.

Kultivovaným bunkám sme odsali staré kultivačné médium, pomocou trypsínu ich oddelili od plastového podkladu postupom uvedeným v **6.1.2** a pustené bunky resuspendovali v čerstvom kultivačnom médiu (37°C). Na základe koncentrácie buniek, ktorú sme stanovili počítaním buniek v Bürkerovej komôrke, sme bunky nariedili v čerstvom kultivačnom médiu na požadovanú koncentráciu v závislosti na potrebách jednotlivých pokusov ako je uvedené v **Tab. 6-1**.

	<b>Počet buniek (x 10<sup>6</sup>)</b>	<b>Objem kultivačného média (ml)</b>
Jamka 6-jamkovej doštičky	1,2	3 ml
Jamka 12-jamkovej doštičky	0,5	1,5 ml
Jamka 24-jamkovej doštičky	0,15	750 µl

**Tab. 6-1.** Objem média a počet buniek pri nasadzovaní experimentov na jednotlivé typy kultivačného plastiku.

### **6.2.3 Aplikácia mastných kyselín**

MK sme v experimentoch aplikovali v transferrinovom médiu (vid' kap. **6.2.1**). Toto médium bolo vyvinuté v laboratóriu prof. Kováře (Kovář a Franěk, 1989). Predstavuje chemicky definované médium, vďaka čomu sme schopní v médiu sledovať celkovú koncentráciu MK, čo v prípade média obsahujúceho sérum nie je možné.

Pred aplikáciou MK sme zmiešali transferrinové médium s príslušným objemom zásobného roztoku SA a/alebo OA v 10% roztoku BSA v transferinovom médiu (vid' kap. **5.5.1**) s príslušným objemom 10% BSA v transferrinovom médiu (vid' kap. **5.4**) tak, aby sme dosiahli požadované koncentrácie MK a BSA popísané v kap. **6.2.1**. Bunkám sme opatrne odobrali kultivačné médium, dvakrát opláchli PBS (37°C) a pridali k nim médium s/bez MK a vrátili do termostatu. V niektorých pokusoch sme k bunkám pridávali aj autofagické modulátory postupom uvedeným v kap. **6.2.4**. Po uplynutí požadovanej doby pôsobenia MK sme bunky zozbierali a analyzovali príslušnou metódou.

## 6.2.4 Aplikácia autofagických modulátorov

### 6.2.4.1 Inhibícia autofágie

Autofágiu sme inhibovali 100 nM bafilomycinom A1 alebo 20 µg/ml E-64d v kombinácii s 20 µg/ml pepstatinom A (E-64d/p). Účinky jednotlivých autofagických modulátorov neboli dodnes úplne definované a bolo preukázané, že dlhodobé pôsobenie niektorých z nich má okrem samotného vplyvu na proces autofágie účinok aj na iné fyziologické pochody v bunke (Korolchuk et al., 2009). Preto boli inhibítory k bunkám pridávané 6 hod pred koncom požadovanej doby pôsobenia MK. Používané koncentrácie a dĺžka pôsobenia autofagických inhibítorov bola vybratá na základe optimalizačných pokusov školiteľky (nepublikované dáta).

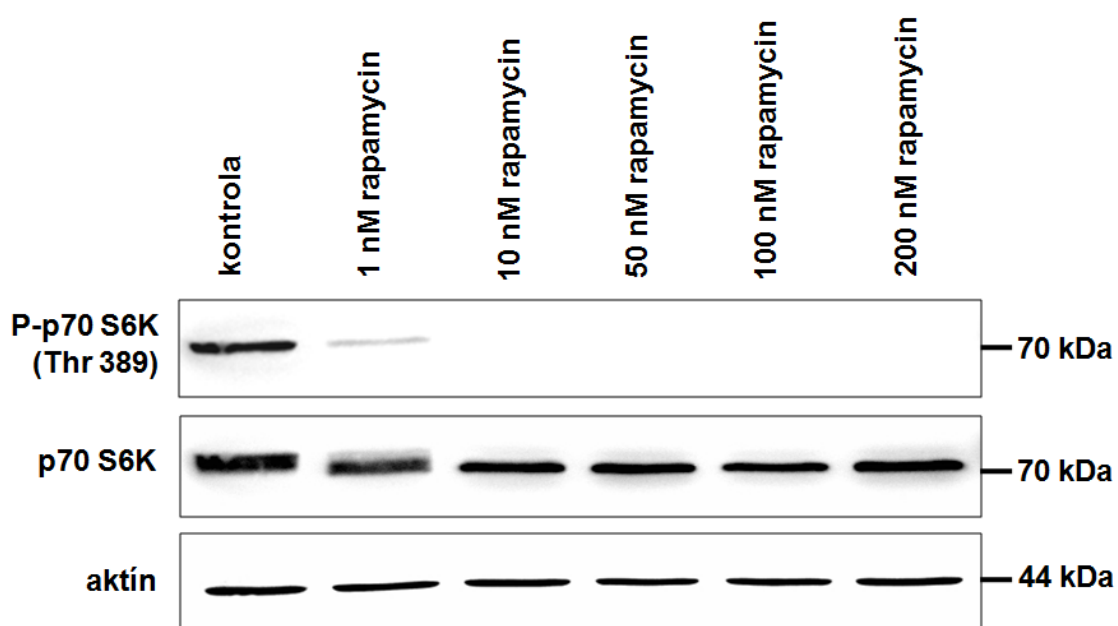
Bunkám kultivovaným v kontrolnom médiu alebo v médiu obsahujúcom MK sme sterilne odobrali médium do skúmavky, pridali k nemu potrebný objem zásobného roztoku inhibítora, zvortexovali a sterilne vrátili do jamky. Pracovali sme opatrne a rýchlo, aby bunky nevyschli. V prípade sledovania účinku MK po dobu 6 hod boli autofagické inhibítory pridávané k bunkám súčasne s MK. Aby sme predišli prípadnému nešpecifickému pôsobeniu rozpúšťadla autofagických modulátorov-DMSO, bol účinok samotných MK na bunky sledovaný v prítomnosti DMSO, pričom kontrolné bunky boli inkubované v médiu bez MK, ale v prítomnosti DMSO. DMSO bolo k bunkám pridávané obdobným postupom a v rovnakej koncentrácii ako bol aplikovaný bafilomycin A1.

### 6.2.4.2 Aktivácia autofágie

Pre indukciu autofágie sme používali 10 nM rapamycin. K bunkám sme ho aplikovali súčasne s médiom obsahujúcim MK alebo kontrolným médiom. Pre overenie prípadného nešpecifického efektu DMSO bol účinok samotných MK na bunky sledovaný v prítomnosti DMSO obdobne ako aj v prípade bafilomycinu A1 (viď kap 6.2.4.1). V prípade detekcie zmien aktivity apoptózy a porovnávania účinku rapamycinu bafilomycinu A1 navzájom, sme používali DMSO v koncentrácii zodpovedajúcej riedeniu aplikovaného bafilomycinu A1.

Rapamycin aktivuje autofágiu tým, že blokuje jej hlavný inhibítor, mTOR1 kinázu (viď kap. 3.7.3.4), následkom čoho dochádza k poklesu fosforylácie jej substrátov, mimo iných aj fosforylácie p70 S6 kinázy (p70 S6K) na Thr 389 (prehľadne v Magnuson et al., 2012). Pri stanovení účinnej koncentrácie rapamycinu pre inhibíciu

kinázy mTOR1 sme vychádzali z koncentrácií používaných pri indukcii autofágie u iných bunkových typov (Boland et al., 2008; Martino et al., 2012).  $\beta$  bunky línie NES2Y sme vystavili účinku rapamycinu o koncentracii 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM a 200 nM a pomocou metódy WB sme stanovili hladinu fosforylovanej formy p70 S6K. Túto formu p70 S6K sme po pôsobení rapamycinu v koncentracii 10 nM a viac neboli schopní pomocou WB zdetegovať, pričom hladina celkovej formy p70 S6K sa v prípade pôsobenia rôznych koncentracii rapamycinu významne nelíšila (vid' **Obr.6-1**). Na základe týchto výsledkov sme v ďalších pokusoch pre indukcii autofágie používali rapamycin o koncentracii 10 nM.



**Obr. 6-1. Stanovenie účinnej koncentrácie rapamycinu pre inhibíciu mTOR1 kinázy.** Pankreatické  $\beta$  bunky línie NES2Y boli vystavené 12 hod pôsobeniu autofagického aktivátora-rapamycinu o koncentraciách: 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM alebo 200 nM. Kontrolné bunky boli kultivované bez prítomnosti rapamycinu, ale s rovnakou koncentraciou DMSO, aká bola prítomná u najvyššej z testovaných koncentracii rapamycinu. Hladina expresie celkovej (p70 S6K) a fosforylovanej (P-p70 S6K) formy p70 S6 kinázy (Thr 389) bola detegovaná metódou WB. Hladina aktínu bola stanovená pre potvrdenie rovnakej nanášky proteínov.



## 6.2.5 Aplikácia siRNA

Pomocou siRNA sme u  $\beta$  buniek línie NES2Y inhibovali autofágiu umlčaním expresie esenciálneho autofagického proteínu Atg7. Pre kontrolu, že sa jedná o špecifický účinok použitej siRNA, boli bunky transfekované aj nešpecifickou siRNA, ktorej sekvencia nie je komplementárna so žiadnou sekvenciou ľudského genómu. Transfekciu sme vykonávali postupom, ktorý bol v našom laboratóriu vytvorený a optimalizovaný RNDr. Balušíkovou.

Bunky boli nasadené do požadovaného počtu Petriho misiek (priemer 60 mm) v kultivačnom médiu v množstve 180 000 buniek na jednu Petriho misku. Po 24 hod kultivácii pri 37°C sme bunkám vymenili kultivačné médium za 4 ml čerstvého kultivačného média bez obsahu antibiotík (37°C) a pridali k nemu transfekčný roztok, ktorý sme pripravili tesne pred transfekciou. Transfekčný roztok pre jednu Petriho misku vznikol zmiešaním 400  $\mu$ l OptiMem média s 22  $\mu$ l Interferinu a 1,1  $\mu$ l Atg7 siRNA (20  $\mu$ M) alebo nešpecifickej siRNA (20  $\mu$ M). Transfekčné roztoky s Atg7 siRNA i nešpecifickou siRNA sme dôkladne zvortexovali a nechali 10 min stáť pri izbovej teplote. Potom sme ich opatrne prikvapkali do jednotlivých Petriho misiek (finálna koncentrácia siRNA 5 nM) a Petriho misky vrátili do termostatu. Po 72 hod sme z jednotlivých Petriho misiek odsali médium s transfekčným roztokom, bunky oddelili od plastového podkladu pomocou trypsínu (viď kap. 6.1.2) a nasadili do 6-jamkových doštičiek postupom uvedeným v kap. 6.2.2. Po 24 hod kultivácii pri 37°C, kedy si bunky znova prisadli na plastový podklad, sme k nim aplikovali MK postupom uvedeným v kap 6.2.3.

## **6.3 Detekcia expresie proteínov metódou western blot**

Expresiu proteínov sme analyzovali metódou western blot (WB) po ich separácii na základe veľkosti pomocou SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). Používali sme modifikovaný postup uvedený v Ehrlichova et al. (2005).

### **6.3.1 Príprava proteínových lyzátov**

Bunky sme nasadili do 6-jamkových doštičiek postupom uvedeným v kap 6.2.2. Po 24 hod kultivácii v termostate, kedy sa bunky znova prichytili o plastový podklad, sme aplikovali MK (vid' kap. 6.2.3), prípadne aj autofagické modulátory (vid' kap. 6.2.4) alebo siRNA (vid' kap. 6.2.5). Po uplynutí požadovanej doby pôsobenia MK sme vytvorili bunkové lyzáty. Pre ich prípravu sme v závislosti na dobe pôsobenia MK používali jeden z nasledujúcich postupov.

#### **6.3.1.1 Lyzovanie buniek v kultivačnom plastiku**

Pre získanie proteínových lyzátov z buniek vystavených kratším dobám pôsobenia MK (max 18 hod pôsobenie) sme používali lyzovanie buniek v kultivačnom plastiku. Doštičku s indukovanými bunkami sme preniesli na ľad. Bunkám sme odobrali indukčné médium a dvakrát ich opatrne opláchli ľadovým PBS. Do jamky sme pridali 180  $\mu$ l ľadového lyzačného pufu RIPA obsahujúceho inhibitory proteáz a fosfatáz (riedenie podľa odporúčania výrobcu). Roztok sme nechali pôsobiť na bunky cca 5-10 min, pričom sme priebeh lýzie kontrolovali pomocou svetelného mikroskopu. Bunkové lyzáty sme potom odobrali do vopred označenej skúmavky. Získané bunkové lyzáty sme uskladnili pre ďalšie spracovanie pri  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Pri pokračovaní prípravy proteínových lyzátov sme postupovali rovnako ako v prípade trypsínovej metódy (vid' kap. 6.3.1.2).

#### **6.3.1.2 Lyzovanie buniek pomocou trypsínu**

Túto metódu sme používali pri získavaní proteínových lyzátov z buniek vystavených pôsobeniu MK viac ako 18 hod, kedy z dôvodu prebiehajúcej apoptózy dochádza u  $\beta$  buniek línie NES2Y k oddeľovaniu buniek od podkladu a k ich uvoľňovaniu do média.

Bunkám sme do vopred označenej skúmavky umiestnenej na ľade odobrali médium obsahujúce aj uvoľnené bunky. Ostatné bunky sme pomocou trypsínu (37°C) oddelili od plastového podkladu (viď kap. 6.1.2), resuspendovali v ľadovom PBS a pridali do skúmavky k indukčnému médiu. Jamku sme ešte raz opláchli ľadovým PBS a roztok tiež pridali do skúmavky. Bunky sme centrifugovali 10 min 2000 rpm pri 4°C a peletu následne dvakrát premyli v ľadovom PBS. Finálnu peletu sme resuspendovali v lyzačnom pufre RIPA obsahujúcom inhibítory proteáz a fosfatáz (riedenie podľa odporúčania výrobcu) v objeme, ktorý sme odhadli v závislosti na veľkosti získanej pelety (v rozsahu 30-50 µl). Skúmavky s lyzátmi sme pred ďalším spracovaním uskladnili pri -80°C (minimálne na 1 hod).

Po vybratí z -80°C sme skúmavky s lyzátmi umiestnili na ľad a za použitia sterilnej inzulínovej striekačky s ihlou o priemere 0,3 mm (Insumed, Mainz, Nemecko) mechanicky lyzovali. Bunkové lyzáty sme centrifugovali 25 min 14000 rpm pri 4°C, supernatanty následne preniesli do nových skúmaviek a uskladnili pre ďalšiu analýzu pri -80°C.

### 6.3.1.3 Stanovenie koncentrácie proteínov v lyzátoch

Pre stanovenie koncentrácie proteínov v pripravených lyzátoch sme používali BCA Protein Assay Kit (Pierce). Podľa **Tab. 6-2.** sme si pripravili riediacu radu štandardov. Proteínové lyzáty získané postupom uvedeným v kap. 6.3.1.1 alebo v kap. 6.3.1.2 sme zriedili 10-krát v destilovanej vode (celkový objem 15 µl). Zmiešaním 50 dielov reagens A a 1 dielu reagens B z kitu sme pripravili reakčný roztok, pridali 300 µl ku každej vzorke nariadeného lyzátu a štandardov a nechali inkubovať 30 min pri 37°C. Následne sme vzorky naniesli v tripletoch po 95 µl do 96-jamkovej doštičky a zmerali ich absorbanciu pri 570 nm na spektrofotometre Tecan (pomocou softwaru XRead Plus). Na základe hodnôt koncentrácií štandardov a im zodpovedajúcich nameraných hodnôt absorbancií sme vypočítali koncentráciu proteínov v získaných lyzátoch.

destilovaná voda (v µl)	BSA (c = 2 µg/µl) (v µl)
15,0	0
12,5	2,5
10,0	5,0
5,0	10,0
0	15,0

**Tab. 6-2.** Zloženie zmesi pre prípravu riediacej rady štandardov.

### 6.3.2 Elektroforéza SDS-PAGE

Pre separáciu proteínov pomocou SDS-PAGE sme používali 12% polyakrylamidový separačný gel a 4% zaostrovací gel. Podľa **Tab. 6-3.** sme namiešali separačný gel a naliali ho medzi sklá v aparátúre cca 1,5 cm pod hornú hranu skiel, prevrstvili etanolom a nechali spolymerezovať. Potom sme podľa **Tab. 6-3.** namiešali zaostrovací gel, po odstránení etanolu sme ním prevrstvili zatuhnutý separačný gel a medzi sklá vložili 10 alebo 15 jamkové hrebenčeky, čím sme vytvorili jamky na nanášanie vzoriek. Gel sme nechali stuhnúť.

Proteínové vzorky pre separáciu pomocou SDS-PAGE sme pripravovali zmiešaním proteínového lyzátu (15 µg v nanášanvej vzorke) získaného postupom popísaným v kap. **6.3.1.1** alebo v kap. **6.3.1.2** s 10 µl vzorkového pufru a pridaním lyzačného pufru RIPA vyrovnali objemy. Vzorky sme po denaturácii varením 10 min pri 98 °C naniesli do jednotlivých jamiek v gele ponoreného v „running buffre“. Do prvej jamky bol vždy nanesený marker (Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard). Proteíny boli následne separované pri konštantnom prúde 0,03 a tak dlho, kým čelo elektroforézy nedosiahlo dolný okraj gelu.

	12% separačný gel	4% zaostrovací gel
destilovaná voda	3,35 ml	3,05 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,50 ml	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	1,25 ml
10% SDS	100,00 µl	100,0 µl
30% akrylamid/bisakrylamid	4,00 ml	665 µl
10% amomiumpersulfát	50,00 µl	25,0 µl
TEMED	5,00 µl	5,0 µl

**Tab. 6-3.** Zloženie zmesi pre 12% separačný gel a 4% zaostrovací gel. Uvedené množstvá chemikálií sú dostatočné pre prípravu 2 gelov.

### 6.3.3 Western blot

Gely s rozseparovanými proteínmi sme ekvilibrovali 25 min v roztoku TOWBIN. Rovnako boli ekvilibrované aj blotovacie hubky, membrány a papiere. Následne sme zložili blotovací „sandwich“ v poradí: hubka, 2 filtračné papiere, membrána, gel, 2 filtračné papiere, hubka, vložili ich do aparatury Mini-Trans Blot Cell a zaliali TOWBIN pufrom. Blotovanie prebiehalo pri konštantnom prúde 0,25 A po dobu 3 hod v chladničke. Po ukončení WB sme úspešnosť prenesenia proteínov overili farbením membrány v roztoku Ponceau S. Po odmytí Ponceau S z membrány pomocou TBST sme zablokovali nešpecifické väzbové miesta na membráne jej 13 min inkubáciou v 5% BSA v TBS. Potom sme membránu premyli trikrát po 5 min v TBST.

Membrány sme vysušili pomocou buničiny a inkubovali s primárnou protilátkou cez noc vo vlhkej komôrke (4°C). Primárne protilátky boli riedené v roztoku 1% BSA v TBST v pomere uvádzanom v **Tab. 6-4**. Po inkubácii boli membrány premyté v TBST (trikrát po 5 min). Potom sme ich nechali inkubovať s príslušnou sekundárnou protilátkou konjugovanou s chrenovou peroxidázou po dobu 2 hod na kývačke (izbová teplota). Sekundárne protilátky boli tiež riedené v 1% BSA v TBST v pomere uvádzanom v **Tab. 6-4**. Membrány po inkubácii so sekundárnou protilátkou boli znova premývané v TBST (trikrát po 5 min). Pri riedení primárnych aj sekundárnych protilátok sme vychádzali z doporučenia výrobcu alebo z predchádzajúcich skúseností s danou protilátkou v laboratóriu.

Vlastná detekcia hladín proteínov bola umožnená luminiscenčnou reakciou chrenovej peroxidázy naviazanej na sekundárnu protilátku. Vyvíjajúci roztok sme pripravili zmiešaním peroxidu a luminolu v pomere 1:1 (West Pico Chemiluminiscent Detection Kit). Membrány označené primárnou a sekundárnou protilátkou boli osušené, umiestnené do kamery Gel Logic 4000 Pro vychladenej na -30°C a rovnomerne pokryté vrstvou vyvíjajúceho roztoku. Dĺžka expozície závisela na intenzite signálu konkrétneho proteínu (v rozmedzí 1-15 min).

<b>Primárna protilátka</b>	<b>Výrobca</b>	<b>Katalogové číslo</b>	<b>Hostiteľ</b>	<b>Riedenie</b>
<b>Aktin</b>	Sigma-Aldrich	A3853	myš	1:1 000
<b>Beclin-1</b>	Cell Signaling Technology	#3495	králik	1:700
<b>Atg7</b>	Cell Signaling Technology	#2631	králik	1:700
<b>Atg5</b>	Cell Signaling Technology	#8540	králik	1:700
<b>Atg12</b>	Cell Signaling Technology	#4180	králik	1:700
<b>Caspase-2</b>	Abcam	ab 32021	králik	1:1 000
<b>Cleaved caspase-7</b>	Cell Signaling Technology	#9491	králik	1:700
<b>Cleaved caspase-8</b>	Cell Signaling Technology	#9496	králik	1:700
<b>Cleaved caspase-9</b>	Cell Signaling Technology	#9501	králik	1:700
<b>p62</b>	Sigma-Aldrich	P0068	králik	1:1 000
<b>LC3B</b>	Cell Signaling Technology	#3868	králik	1:500
<b>PARP</b>	Cell Signaling Technology	#9542	králik	1:1 000
<b>phospho-p70 S6 kinase (Thr 389)</b>	Cell Signaling Technology	#4858	králik	1:700
<b>phospho-p70 S6 kinase</b>	Cell Signaling Technology	#2708	králik	1:700
<b>Sekundárna protilátka</b>				
<b>anti-králičia, HRP-konjugovaná</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-2004	koza	1: 6 700
<b>anti-myšia, HRP-konjugovaná</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-2005	koza	1: 6 700

**Tab. 6-4.** Zoznam používaných primárnych a sekundárnych protilátok a ich riedenie pre WB analýzu. Protilátky boli zakúpené od firiem Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) a Abcam (Cambridge, UK).

## 6.4 Analýza kyslých vezikulárných organel

Zastúpenie kyslých vezikulárných organel (AVOs) (viď kap. 3.7.1) sme analyzovali na základe modifikovaného postupu uvedeného v Chen et al. (2007) u buniek farbených akridínovou oranžovou (AO) pomocou prietokovej cytometrie.

### 6.4.1 Analýza pomocou prietokovej cytometrie

Zásobný roztok AO o koncentrácii 1 mg/ml sme pripravili rozpustením v DMSO a alikvóty sme uskladnili v tmavej krabicike pri 4°C.

Bunky boli nasadené do 12-jamkových doštičiek postupom uvedeným v kap. 6.2.2 a po 24 hod sme aplikovali MK postupom uvedeným v kap. 6.2.3. V prítomnosti MK boli bunky inkubované 6 hod, 18 hod alebo 24 hod. Po uplynutí požadovanej doby boli bunky zozbierané a analyzované nasledujúcim postupom.

Bunky sme zbierali do nesterilnej a vopred označenej skúmavky určenej pre analýzu prietokovým cytometrom, ďalej len skúmavka (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Kontrolné médium alebo médium s MK sme odobrali do konkrétnej skúmavky. Pôsobením 200  $\mu$ l trypsínu (37°C) (viď kap. 6.1.2) sme bunky oddelili od dna kultivačnej jamky, resuspendovali v PBS (37°C) a pridali do skúmavky. Jamku sme ešte raz opláchli PBS a roztok rovnako pridali do skúmavky.

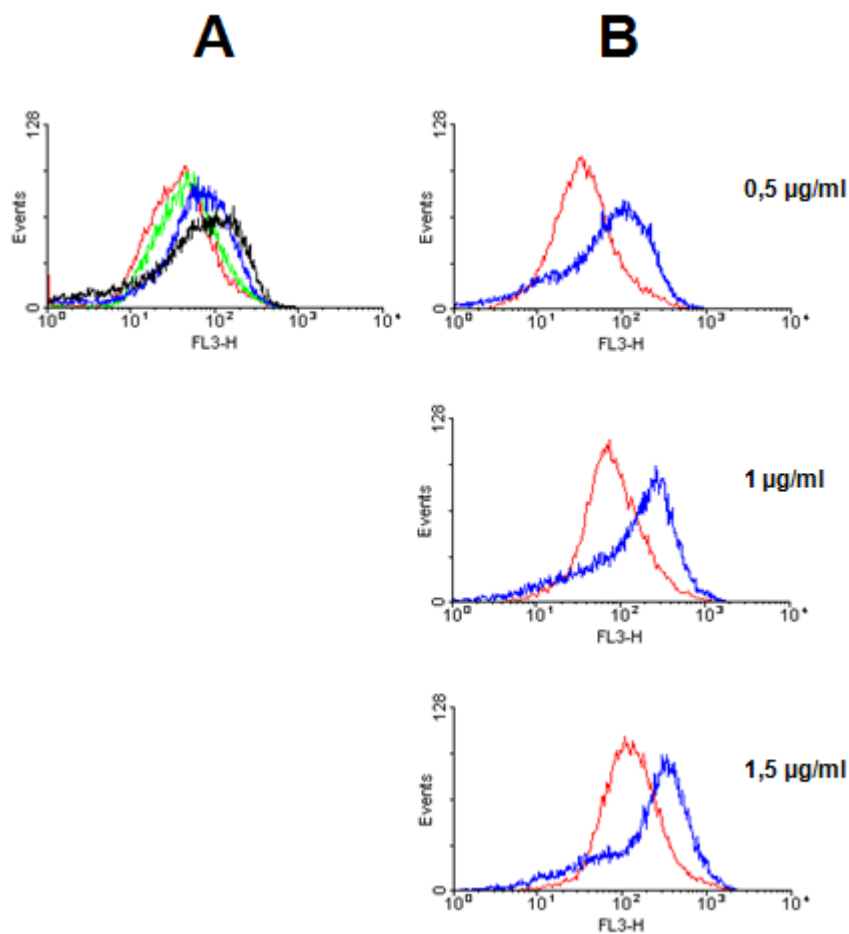
Bunky sme centrifugovali 5 min 2000 rpm pri 25°C a peletu resuspendovali v 500  $\mu$ l roztoku AO nariadeného v PBS (25°C) (finálna koncentrácia 1  $\mu$ g/ml) a nechali inkubovať 15 min v tme (37°C). Potom sme bunky zvortexovali, zriedili pridaním 900  $\mu$ l PBS (izbová teplota) a centrifugovali 5 min 2000 rpm pri 25°C. Peletu buniek sme premyli v PBS (izbová teplota). Finálnu peletu buniek sme resuspendovali v 400  $\mu$ l ľadového PBS, skúmavky umiestnili na ľad do tmy a bunky bezodkladne analyzovali na prietokovom cytometri FACS Calibur meraním intenzity signálu AO na kanáli FL3-H. Pre kvantifikáciu signálu bol použitý software CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Pre každú z experimentálnych podmienok sme vypočítali priemernú hodnotu intenzity signálu AO štandardizovanú na kontrolu. Dáta sme štatisticky analyzovali v programe Excel MS Office pomocou Studentovho t-testu.

## 6.4.2 Optimalizácia metódy

Vzhľadom k tomu, že výsledky získané pomocou metódy WB naznačili vplyv SA na množstvo autofagozómov (viď kap. 7.2), pre overenie fungovania a optimalizáciu metódy prietokovej cytometrie sme použili aplikáciu 1 mM SA. Rozdiel meraného signálu sme sledovali u kontrolných buniek a buniek vystavených 24 hod pôsobeniu SA a SA spoločne s E-64d v kombinácii s pepstatinom A (E-64d/p). Bunky boli farbené (viď kap. 6.4.1) 15 min v prítomnosti AO (1 µg/ml), najčastejšie používanej koncentrácií AO pre analýzu AVOs u iných bunkových typov (Paglin et al., 2001; Takeuchi et al., 2005). Vzhľadom k tomu, že koktail enzýmov E-64d/p blokuje aktivitu lyzozomálnych proteáz (Tanida et al., 2005), očakávali sme, že u buniek kultivovaných v jeho prítomnosti budeme na kanáli FLH-3 sledovať vyšší signál v porovnaní s bunkami kultivovanými bez jeho prítomnosti. Posun intenzity signálu sme zaznamenali, ale zároveň sme zistili, že 24 hod pôsobenie nasýtenej SA u β buniek línie NES2Y je zodpovedné za väčší nárast meraného signálu ako pôsobenie SA v prítomnosti E-64d/p (viď Obr. 6-2 A). Na základe toho sme v ďalších krokoch optimalizácie používali len nasýtenú SA.

Pri stanovení najvhodnejšej koncentrácie AO pre detekciu AVOs v našom experimentálnom modeli sme vychádzali z literatúry a z koncentrácií používaných u iných bunkových typov. Bunky sme inkubovali v kontrolnom médiu alebo v prítomnosti 1 mM SA po dobu 24 hod a následne farbili AO o koncentrácií 0,5; 1 alebo 1,5 µg/ml. Najvýraznejší rozdiel detegovaného signálu po pôsobení SA v porovnaní s kontrolnými bunkami sme zaznamenali po farbení buniek v 1 µg/ml AO, (Obr. 6-2 B), preto sme pre ďalšiu analýzu AVOs u bunkovej línie NES2Y vybrali túto koncentráciu AO.





**Obr. 6-2. Optimalizácia kvantifikácie kyslých vezikulárných organel (AVOs) pomocou prietokovej cytometrie po farbení buniek akridínovou oranžovou (AO).** (A) Bunky línie NES2Y boli vystavené účinku kontrolného média alebo 1 mM SA v prítomnosti alebo bez prítomnosti E-64d/p. Po 24 hod inkubácie boli bunky zozbierané a farbené AO (1 µg/ml). Intenzita signálu bola zmeraná prietokovým cytometrom na kanáli FL3-H. Výsledný histogram meranej intenzity fluorescence AO buniek za daných experimentálnych podmienok - červená: kontrolné bunky, zelená: kontrolné bunky v prítomnosti E-64d/p, modrá: bunky len v prítomnosti SA, čierna: bunky vystavené účinku SA v prítomnosti E-64d/p. (B) Bunky línie NES2Y boli kultivované v kontrolnom médiu alebo v prítomnosti 1 mM SA. Po 24 hod boli bunky zozbierané a farbené AO v koncentrácii 0,5 µg/ml, 1 µg/ml alebo 1,5 µg/ml. Intenzita farbenia bola analyzovaná prietokovým cytometrom na kanáli FL3-H. Výsledný histogram intenzity fluorescence AO buniek za daných experimentálnych podmienok – červená: kontrolné bunky, modrá: bunky v prítomnosti SA.

## **6.5 Vizualizácia autofagozómov konfokálnou mikroskopiou**

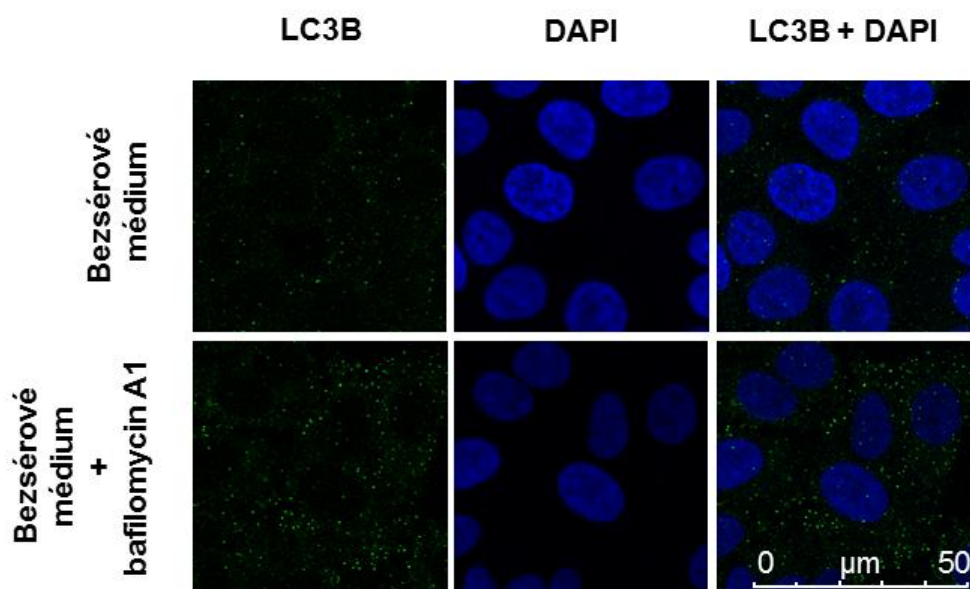
Na základe nepriamej imunofluorescencie proteínu LC3B sme u buniek vystavených pôsobeniu MK v prítomnosti a v neprítomnosti autofagických modulátorov pomocou konfokálnej mikroskopie vizualizovali tvorbu autofagozómov. Detekciu sme vykonávali modifikovaným postupom uvedeným v Němcová-Fürstová et al. (2013).

### **6.5.1 Použitie konfokálnej mikroskopie**

Bunky boli nasadené na sklíčka postupom uvedeným v kap. 6.2.2 a MK boli aplikované spôsobom popísaným v kap. 6.2.3. Po 18 hod pôsobení MK sme bunkám odsali kontrolné médium alebo médium s MK a bunky fixovali pridaním 400  $\mu$ l 4% paraformaldehydu po dobu 15 min pri 37°C. Fixačné činidlo sme omyli pomocou cca 1 ml PBS (trikrát po 5 min). Bunky boli následne permeabilizované pomocou 0,1 % roztoku Tritonu X-100 po dobu 15 min pri izbovej teplote a znova premývané v PBS (trikrát po 5 min). Potom boli sklíčka s bunkami inkubované s primárnou protilátkou anti-LC3B (#3868, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) cez noc vo vlhkej komôrke pri 4°C (riedenie v PBS v pomere 1:250) a po inkubácii premyté v PBS (trikrát po 5 min). Bunky boli následne inkubované s anti-králičou sekundárnou protilátkou značenou fluorofórom AlexaFluor 488 (A31628, Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR, USA) v tme pri izbovej teplote (riedenie v PBS v pomere 1:125). Po 1,5 hod inkubácii bola nenaviazaná sekundárna protilátka odstránená premytím buniek v PBS (trikrát po 5 min). Potom boli sklíčka prenesené na podložné sklo do kvapky zalievacieho média Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) a okraje skiel zalakované lakom na nechty. Autofagozómy sme u buniek vizualizovali pomocou konfokálneho mikroskopu Leica TCS SP5 a olejového objektívu s 63-násobným zväčšením. Pre excitáciu oboch fluorofórov sme použili príslušné lasery. Pre každú z experimentálnych podmienok bolo nasnímaných niekoľko zorných polí, aby mohli byť vybrané reprezentatívne obrázky.

## 6.5.2 Optimalizácia metódy

Pri optimalizácii postupu detekcie autofagozómov sme vychádzali z protokolu odporúčaného výrobcom protilátky. Autofágiu sme indukovali hladovaním pomocou inkubácie buniek v bezsérovom médiu. Pre potenciovanie akumulácie syntetizovaných autofagozómov boli bunky inkubované aj v prítomnosti bafilomycínu A1 (vid' kap. 3.7.4), ktorý zabraňuje degradácii autofagozómov a spôsobuje ich hromadenie v cytoplazme (Yamamoto et al., 1998; Fass et al., 2006). V pokusoch sme porovnali účinok rôznych permeabilizačných činidiel: Tritonu X-100, Tweenu-20 a Saponinu o koncentrácii 0,1 %, rôzne riedenia anti-LC3B primárnej protilátky a fluorescenčne značenej sekundárnej protilátky. Najlepší signál sme získali pri použití Tritonu X-100, a koncentrácii protilátok 1:250 v prípade anti-LC3B a 1:125 pre Alexa Fluor 488-konjugovanú sekundárnu protilátku, ktoré sme ďalej používali pre detekciu (vid' Obr. 6-3).



**Obr. 6-3. Optimalizácia detekcie autofagozómov pomocou konfokálnej mikroskopie po farbení LC3B.** Pankreatické  $\beta$  bunky línie NES2Y boli inkubované 24 hod v bezsérovom médiu v prítomnosti a neprítomnosti bafilomycínu A1, ktorý bol k bunkám pridávaný na posledných 6 hod kultivácie. Bunky boli fixované 4% paraformaldehydom a permeabilizované 0,1 % Tritonom X-100. Pre vizualizáciu autofagozómov bola použitá primárna protilátka anti-LC3B v koncentrácii 1:250 a Alexa Fluor 488-konjugovaná sekundárna protilátka v koncentrácii 1:125. Autofagozómy sú reprezentované zelenými bodkami. Jadrá buniek sú farbené DAPI a znázornené modro.

## 7 VÝSLEDKY

Experimenty vykonané autorkou v rámci tejto diplomovej práce (DP) nadväzujú na poznatky o indukcii a regulácii apoptózy u ľudských pankreatických  $\beta$  buniek línie NES2Y mastnými kyselinami (MK) získaných Mgr. Němcovou, PhD. Tieto poznatky sú zhrnuté v kap. 3.8. Jeden z pokusov Mgr. Němcovej, PhD tiež naznačil, že pôsobenie kyseliny stearovej (SA) v koncentrácii indukujúcej apoptózu je u pankreatických  $\beta$  buniek línie NES2Y sprevádzané zvýšenou expresiou autofagického markeru LC3B-II, čo viedlo k zadaniu témy tejto DP. V experimentoch sme porovnávali účinok 1mM kyseliny stearovej (SA), ktorej pôsobenie vedie k indukcii apoptózy, s účinkom kombinácie 1 mM kyseliny stearovej a 0,2 mM kyseliny olejovej (OA), kde je vďaka efektu kyseliny olejovej apoptóza indukovaná SA signifikantne inhibovaná.

### 7.1 Zavedenie metodiky pre detekciu autofágie

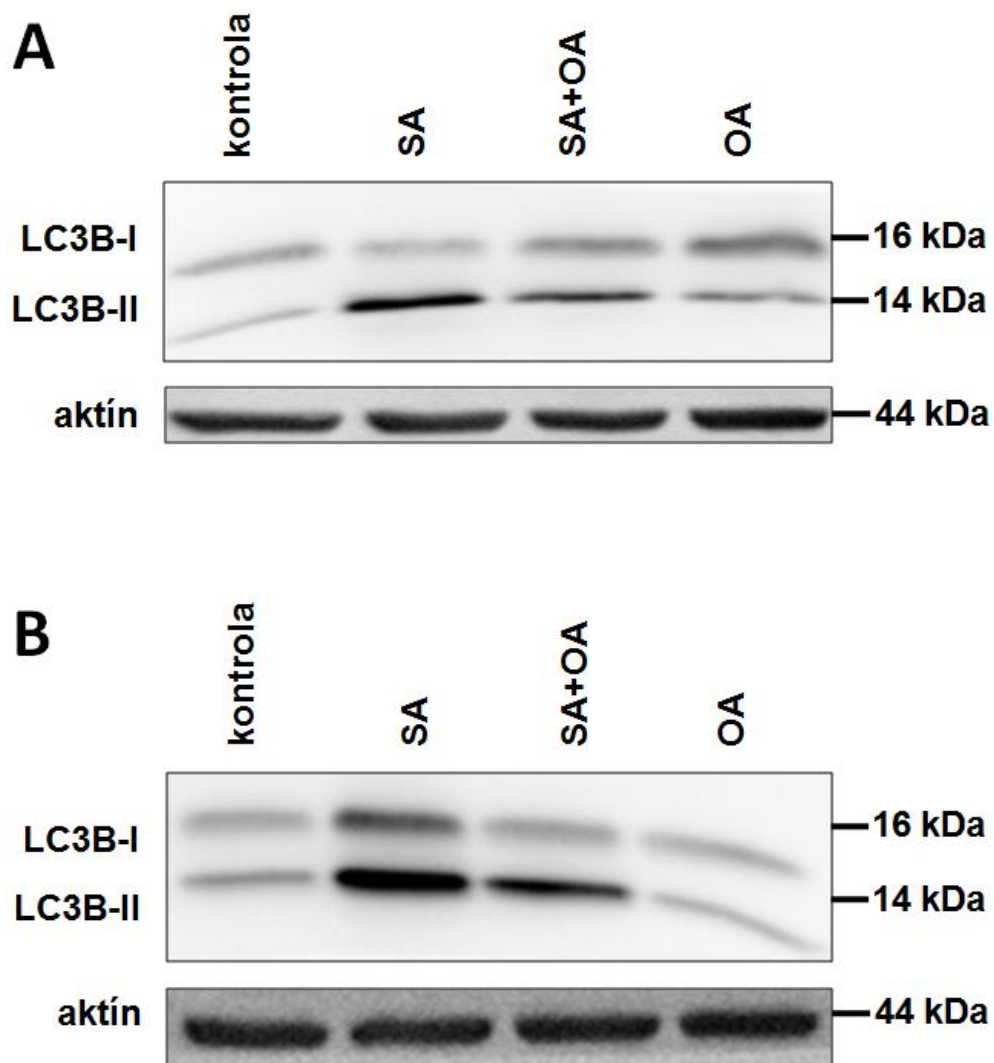
Riešeniu cieľov tejto DP predchádzalo zavedenie metodiky umožňujúcej analýzu autofágie na modeli ľudských pankreatických  $\beta$  buniek línie NES2Y. Vychádzajúc z technického vybavenia v našom laboratóriu sme zaviedli postupy pre analýzu autofágie pomocou troch nezávislých metód: (1) detekciu hladín proteínov zúčastňujúcich sa na autofágii pomocou WB (viď kap. 6.3) (2) kvantifikáciu AVOs u buniek farbených AO pomocou prietokovej cytometrie (viď kap. 6.4) (3) vizualizáciu autofagozómov pomocou konfokálnej mikroskopie (viď kap. 6.5).

## 7.2 Vplyv mastných kyselín na expresiu esenciálnych autofagických proteínov

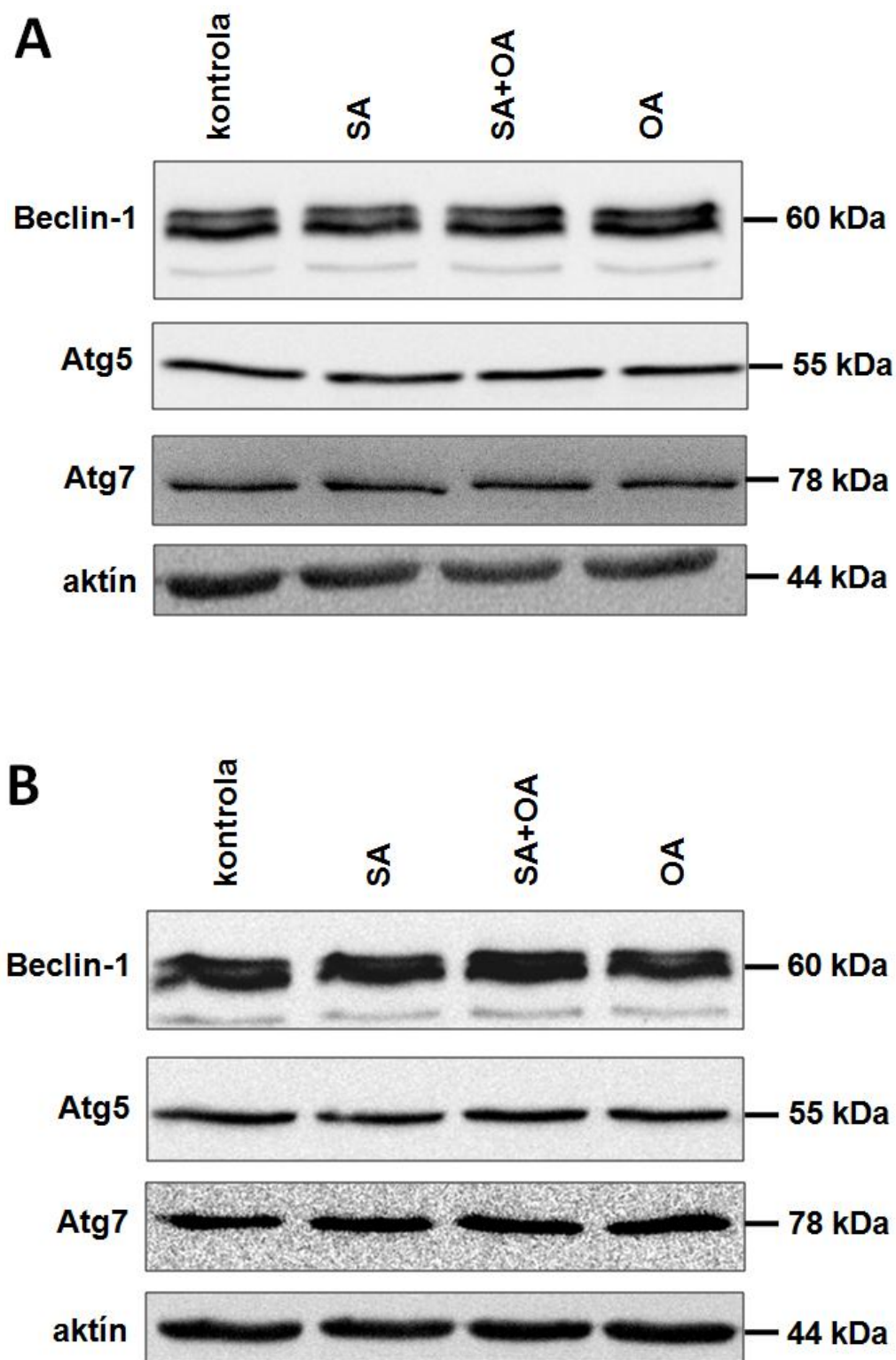
Pre primárne monitorovanie vplyvu MK na reguláciu autofágie u  $\beta$  buniek línie NES2Y sme využili metódu WB. Postupom uvedeným v kap. 6.3 sme za použitia protilátok z kitu „Autophagy Sampler Kit“ (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) sledovali expresiu niekoľkých proteínov esenciálnych pre autofágiu, konkrétne Atg5, Atg7, beclinu-1 a LC3B-II. Miera expresie týchto proteínov bola sledovaná u buniek vystavených 6 a 24 hod pôsobeniu MK (1 mM SA, 1 mM SA+0,2 mM OA, 0,2 mM OA) (viď kap. 6.2.1). 24 hod časový interval bol zvolený na základe predchádzajúcich výsledkov, ktoré preukázali, že 24 hod pôsobenie SA spôsobuje u bunkovej línie NES2Y aktiváciu apoptózy, čo bolo demonštrované na základe plnej aktivácie kaspáz (Fürstová et al. 2008; Němcova-Fürstová et al. 2011). Aby sme mohli zaznameniť vplyv MK na aktiváciu autofágie aj v kratšom časovom intervale, rozhodli sme sa sledovať efekt MK aj čase 6 hod.

Výsledky WB analýzy ukázali, že pôsobenie MK v detegovaných časoch vedie k zmene hladiny hlavného markeru autofágie, proteínu LC3B-II (viď kap. 3.7.2). V prípade pôsobenia nasýtenej SA sme v porovnaní s kontrolnými bunkami zaznamenali výrazný nárast hladín tohto proteínu v čase 6 hod aj 24 hod. Zvýšenie expresie LC3B-II účinkom SA bolo na druhej strane signifikantne inhibované nenasýtenou OA pri spoluinkubácii SA s OA v oboch sledovaných časoch. 6 a 24 hod pôsobenie samotnej nenasýtenej OA v porovnaní s kontrolnými bunkami nespôsobilo významné zmeny hladín LC3B-II (viď **Obr. 7-1 A** (6 hod) a **7-1 B** (24 hod)). Tiež sme zistili, že 6 hod a ani 24 hod pôsobenie MK neovplyvňuje expresiu ďalších esenciálnych proteínov autofágie Atg5, Atg7 a Beclinu-1 (viď **Obr. 7-2 A** (6 hod) a **7-2 B** (24 hod)).

Na základe expresie proteínu LC3B-II, hlavného markeru autofágie, tieto experimenty naznačili, že MK ovplyvňujú u  $\beta$  buniek línie NES2Y aktivitu autofágie. Vzhľadom k tomu, že hladiny proteínu LC3B-II korelujú s tvorbou autofagozómov, z našich výsledkov vyplýva, že nasýtená SA zvyšuje u  $\beta$  buniek línie NES2Y syntézu autofagozómov, ktorá je na druhej strane inhibovaná pôsobením nenasýtenej OA pri ich spoločnej inkubácii. Účinok samotnej nenasýtenej OA nemá v našom experimentálnom modeli efekt na bazálnu hladinu autofágie.



**Obr. 7-1. Efekt pôsobenia MK na expresiu proteín LC3B-II.** Pankreatické  $\beta$  bunky línie NES2Y boli vystavené (A) 6 hod a (B) 24 hod pôsobeniu 1 mM SA, 1 mM SA v kombinácii s 0,2 mM OA (SA+OA) a 0,2 mM OA. Kontrolné bunky boli kultivované bez MK (kontrola). Expresia proteínu LC3B-II bola detegovaná metódou WB. Hladina aktínu bola stanovená pre potvrdenie rovnakej nanášky proteínov. Uvedený je reprezentatívny výsledok jedného z troch nezávislých pokusov.



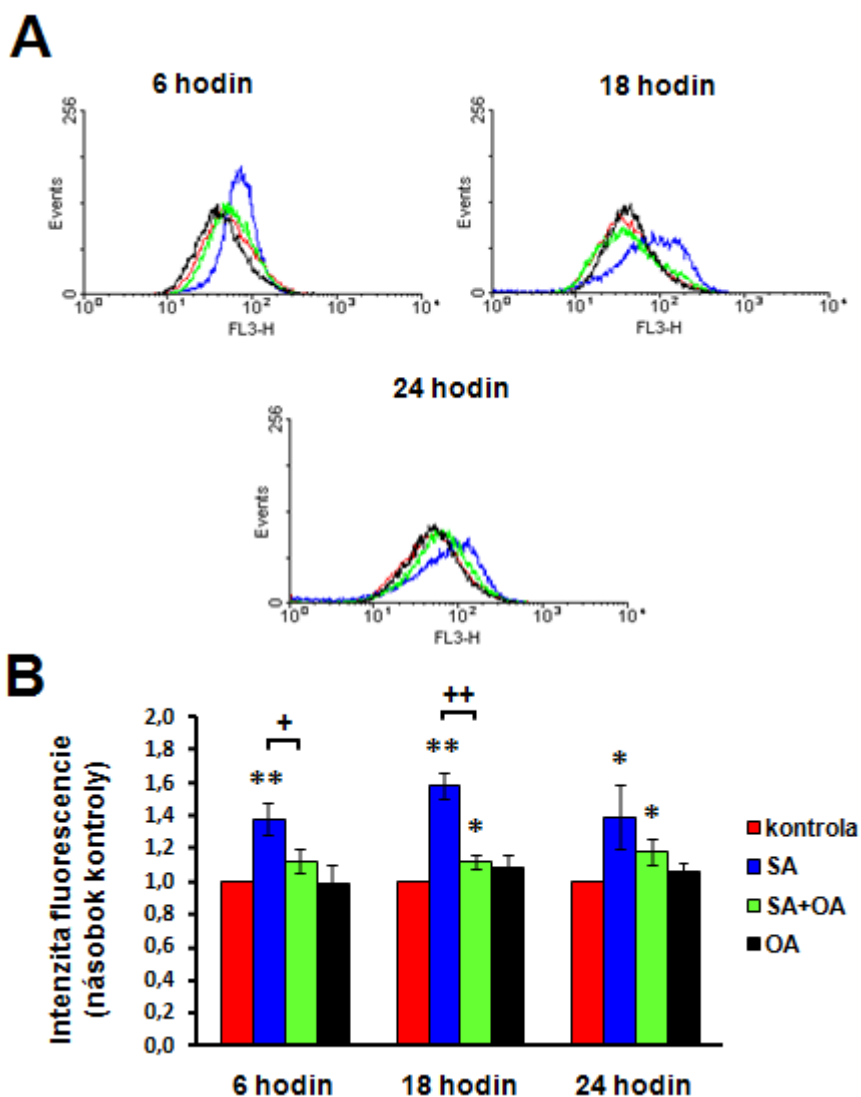
**Obr. 7-2. Efekt pôsobenia MK na expresiu proteínov beclinu-1, Atg5 a Atg7.** Pankreatické  $\beta$  bunky línie NES2Y boli vystavené (A) 6 hod a (B) 24 hod pôsobeniu 1 mM SA, 1 mM SA v kombinácii s 0,2 mM OA (SA+OA) a 0,2 mM OA. Kontrolné bunky boli kultivované bez MK (kontrola). Expresia proteínov beclinu-1, Atg5 a Atg7 bola detegovaná metódou WB. Hladina aktínu bola stanovená pre potvrdenie rovnakej nanášky proteínov. Uvedený je reprezentatívny výsledok jedného z troch nezávislých pokusov.

## 7.3 Vplyv mastných kyselín na tvorbu kyslých vezikulárných organel

Pre potvrdenie efektu MK na aktiváciu autofágie zaznamenaného na úrovni expresie LC3B-II pomocou WB, sme u  $\beta$  buniek línie NES2Y ďalej analyzovali množstvo AVOs (viď kap. 3.7.1). Pre detekciu sme použili farbenie buniek pomocou akridínovej oranžovej (AO) a metódu prietokovej cytometrie postupom popísaným v kap. 6.4. Bunky boli vystavené pôsobeniu MK (1 mM SA, 1 mM SA+0,2 mM OA, 0,2 mM OA) (viď kap. 6.2.1) po dobu 6 hod, 18 hod a 24 hod. Vzhľadom k tomu, že predchádzajúce experimenty ukázali, že 6 hod a 24 hod pôsobenie MK vedie u  $\beta$  buniek línie NES2Y k zmene aktivity autofágie (viď kap. 7.2), v prípade detekcie AVOs sme sa rozhodli pre analýzu účinku MK aj v čase 18 hod.

Pomocou prietokovej cytometrie sme zistili, že nasýtená SA v porovnaní s kontrolnými bunkami spôsobuje významný nárast množstva AVOs vo všetkých sledovaných časoch. Účinok nenasýtenej OA pri spoluinkubácii s SA ukázal signifikantný pokles tvorby AVOs po ich 6 hod a 18 hod pôsobení. Tento inhibičný efekt nebol ale signifikantný po 24 hod pôsobení MK, kedy sme tiež pozorovali významný nárast AVOs v prípade pôsobenia SA v kombinácii s OA, ktorý bol ale menší v porovnaní s účinkom samotnej SA. Účinok samotnej nenasýtenej OA v použitej koncentrácii nepreukázal vplyv na tvorbu AVOs v žiadnom z meraných časov (viď Obr. 7-3 A a B).





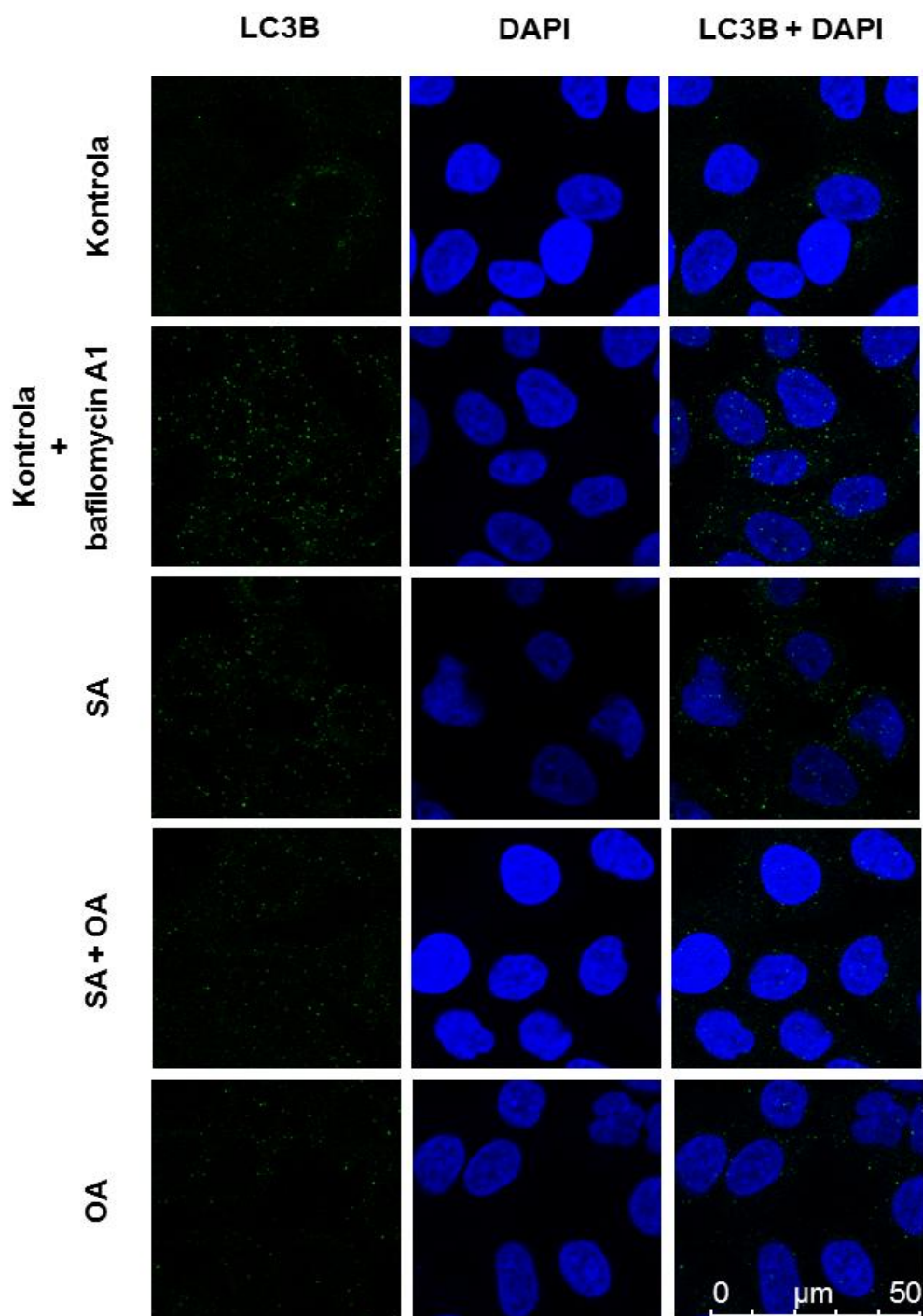
**Obr. 7-3. Efekt pôsobenia MK na tvorbu AVOs.** Pankreatické  $\beta$  bunky línie NES2Y boli vystavené účinku 1 mM SA, 1 mM SA v kombinácii s 0,2 mM OA (SA+OA) a 0,2 mM OA po dobu 6, 18 alebo 24 hod. Kontrolné bunky boli kultivované bez MK (kontrola). Zastúpenie AVOs bolo analyzované po farbení pomocou AO (1  $\mu\text{g/ml}$ ) na prietokovom cytometri meraním intenzity fluorescencie na kanáli FL-3. **(A)** Histogram intenzity fluorescencie AO po 6, 18 alebo 24 hod pôsobení MK- červená: kontrola, modrá: účinok SA, zelená: účinok SA+OA, čierna: účinok OA. Uvedený je reprezentatívny výsledok jedného zo štyroch nezávislých pokusov. **(B)** Miera tvorby AVOs bola porovnaná na základe priemernej intenzity fluorescencie nameranej za jednotlivých experimentálnych podmienok. Každý stĺpec predstavuje priemernú hodnotu štyroch experimentálnych hodnôt štandardizovaných na kontrolu  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  v porovnaní s kontrolnými bunkami, +  $p < 0,05$ , ++ $p < 0,01$  pri porovnaní SA a SA+OA.

## 7.4 Vplyv mastých kyselín na tvorbu autofagozómov

Pre ďalšie overenie indukcie autofágie pôsobením MK u  $\beta$  buniek línie NES2Y sme využili vizualizáciu autofagozómov na základe farbenia protilátkou anti-LC3B (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) pomocou konfokálnej mikroskopie. Autofagozómy boli vizualizované postupom uvedeným v kap. 6.5 u buniek vystavených pôsobeniu MK (1mM SA, 1mM SA+0,2 mM OA, 0,2 mOA) (viď kap. 6.2.1) po dobu 18 hod. Bunky kultivované v kontrolnom médiu v prítomnosti bafilomycínu A1 boli použité ako pozitívna kontrola. Bafilomycín A1 bol k bunkám aplikovaný na posledných 6 hod inkubácie (viď kap. 6.2.4.1).

Vizualizácia autofagozómov preukázala, že pôsobenie nasýtenej SA v porovnaní s kontrolnými bunkami vedie k zvýšeniu syntézy autofagozómov. Účinok nenasýtenej OA pri spoluinkubácii s SA inhiboval syntézu autofagozómov indukovanú pôsobením SA. Bazálna hladina autofágie nepreukázala zmeny v pôsobenia samotnej OA, pretože sme nepozorovali zmeny v množstve autofagozómov u kontrolných buniek a buniek vystavených účinku OA (viď **Obr. 7-4**).

Detekciou autofagozómov pomocou konfokálnej mikroskopie sme potvrdili dáta získané metódou WB a detekciou expresie proteínu LC3B-II. Pomocou konfokálnej mikroskopie sme ale nepozorovali tak výrazné zmeny v tvorbe autofagozómov v rámci jednotlivých experimentálnych podmienok, ako boli zmeny zaznamenané na úrovni expresie proteínu LC3B-II metódou WB.



**Obr. 7-4. Efekt aplikácie MK na tvorbu autofagozómov.** Pankreatické  $\beta$  bunky línie NES2Y boli vystavené účinku 1 mM SA, 1 mM SA v kombinácii s 0,2 mM OA (SA+OA) a 0,2 mM OA po dobu 18 hod. Kontrolné bunky boli kultivované bez MK (kontrola). Ako pozitívna kontrola boli použité bunky kultivované v prítomnosti bafilomycinu A1, ktorý bol k bunkám pridávaný na posledných 6 hod kultivácie. Autofagozómy boli detegované pomocou anti-LC3B protilátky a sú reprezentované zelenými bodkami. Jadrá buniek boli farbené pomocou DAPI a sú znázornené modro. Uvedený je výsledok jedného z troch nezávislých pokusov.

## 7.5 Vplyv mastných kyselín na autofagický tok

Pomocou troch nezávislých metód (WB analýza, prietoková cytometria a konfokálna mikroskopia), detegujúcich autofágiu na základe rôznych prístupov a v rozdielnych štádiách autofagickej dráhy sme ukázali, že MK ovplyvňujú u  $\beta$  buniek línie NES2Y aktiváciu autofágie.

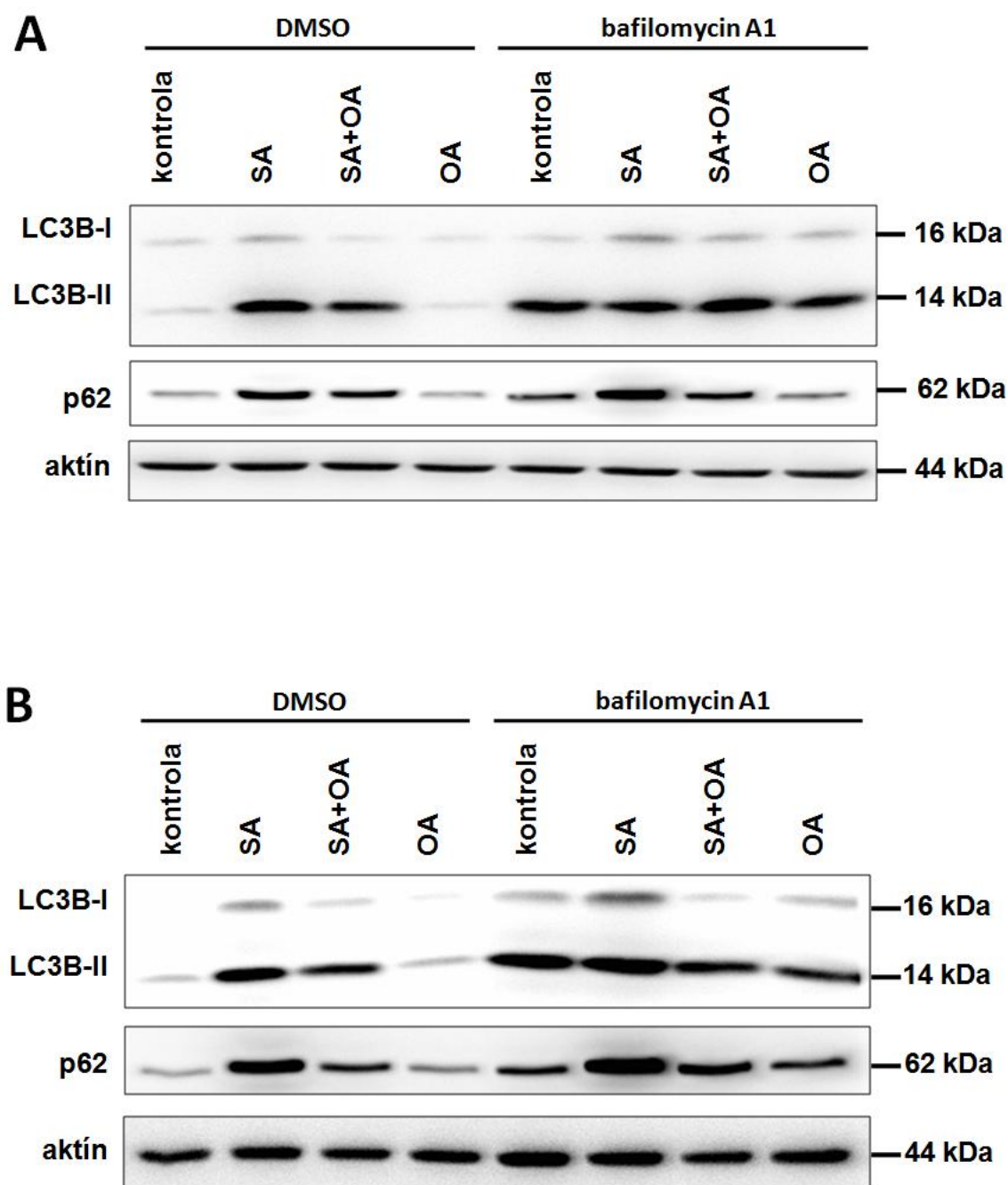
Nárast hladín proteínu LC3B-II pozorovaný u  $\beta$  buniek línie NES2Y účinkom nasýtenej SA pomocou metódy WB (viď kap. 7.2) môže zodpovedať nárastu autofagického toku v bunke, alebo naopak prítomnosti autofagického bloku (Rubinsztein et al., 2009). Aby sme stanovili konkrétny účinok SA na autofagický tok v našom experimentálnom modeli, detegovali sme pomocou metódy WB hladiny proteínov LC3B-II a p62 v prítomnosti inhibítora degradačných krokov autofágie, bafilomycinu A1 (viď kap. 3.7.4). Bunky boli vystavené pôsobeniu MK (1 mM SA, 1 mM SA+0,2 mM OA, 0,2 mM OA) (viď kap. 6.2.1) alebo pôsobeniu MK v prítomnosti bafilomycinu A1 po dobu 12 alebo 18 hod. Bafilomycin A1 bol k bunkám pridávaný na posledných 6 hod pôsobenia MK (viď kap. 6.2.4.1).

Efektívnu inhibíciu autofagického toku po aplikácii bafilomycinu A1 u  $\beta$  buniek línie NES2Y v čase 12 hod aj 18 hod potvrdil výrazný nárast hladín proteínu LC3B-II zaznamenaný u kontrolných buniek kultivovaných v jeho prítomnosti. Napriek tomu pôsobenie SA v prítomnosti bafilomycinu A1 spôsobilo v porovnaní s účinkom samotnej SA len zanedbateľné zmeny hladiny proteínu LC3B-II v oboch sledovaných časoch. V prípade 12 hod a aj 18 hod spolupôsobenia SA a OA v prítomnosti bafilomycinu A1 sme oproti bunkám kultivovaných len s SA a OA sledovali mierny nárast expresie LC3B-II, ale v porovnaní s účinkom SA v prítomnosti bafilomycinu A1 sme rozdiel v expresii nezaznamenali. Pôsobenie nenasýtenej OA v prítomnosti bafilomycinu A1 v porovnaní s účinkom samotnej OA viedlo k nárastu hladín LC3B-II v oboch detegovaných časoch (viď **Obr. 7-5 A** (12hod) a **Obr. 7-5 B** (18 hod)).

V prípade proteínu p62 viedlo 12 hod aj 18 hod pôsobenie SA v porovnaní s kontrolnými bunkami k výraznému nárastu jeho expresie. Tento účinok nasýtenej SA bol však inhibovaný účinkom OA pri ich spoločnej inkubácii v oboch sledovaných časoch, ale inhibičné pôsobenie OA bolo výraznejšie v čase 18 hod. Účinok samotnej OA nemal vplyv na zmenu hladiny p62 ani v jednom zo sledovaných časov (viď **Obr. 7-5 A** (12hod) a **Obr. 7-5 B** (18 hod)).

Efektívnu inhibíciu autofagického toku účinkom bafilomycinu A1 sme detegovali aj na úrovni proteínu p62 v čase 18 hod. U kontrolných buniek spôsobila prítomnosť bafilomycinu A1 nárast hladín p62, ktorý však nebol tak výrazný ako v prípade proteínu LC3B-II. Pôsobenie SA s bafilomycinom A1 viedlo v porovnaní s účinkom samotnej SA k miernemu nárastu hladín p62. V prípade spolupôsobenia SA a OA spoločne s bafilomycinom A1 sme oproti samotnému účinku kombinácie SA s OA nezaznamenali zmeny hladín p62, ale v porovnaní s účinkom SA v prítomnosti bafilomycinu A1 sme pozorovali pokles expresie p62. Pôsobenie nenasýtenej OA ukázalo v prítomnosti bafilomycinu A1 oproti účinku samotnej OA veľmi malý nárast hladiny p62 (vid' Obr. **7-5 B**). Efekt bafilomycinu A1 na expresiu proteínu p62 mal po 12 hod pôsobení MK v jednotlivých experimentálnych podmienkach rovnaký trend ako 18 hod pôsobenie MK, ale menej s výraznou expresiou (vid' Obr. **7-5 A**).

Pôsobenie nasýtenej SA nemalo v prítomnosti bafilomycinu A1 prídavný efekt na expresiu LC3B-II, čo znamená, že SA v našom experimentálnom modeli spôsobuje autofagický blok. Vzhľadom k tomu, že sa hladiny LC3B-II u kontrolných buniek a buniek vystavených účinku OA navzájom významne nelíšila ani po pridaní bafilomycinu A1, vyvodili sme, že nenasýtená OA neovplyňuje u  $\beta$  buniek línie NES2Y bazálnu aktivitu autofágie. V prípade spolupôsobenia SA s OA sme detegovali na úrovni hladín proteínu LC3B-II prídavný efekt bafilomycinu A1, čo zodpovedá nárastu autofagického toku. Tým naše výsledky naznačili, že nenasýtená OA pri spoluinkubácii s SA inhibuje autofagický blok vyvolaný účinkom nasýtenej SA.



**Obr. 7-5. Vplyv aplikácie MK na expresiu proteínov LC3B-II a p62 v prítomnosti bafilomycinu A1.** Pankreatické  $\beta$  bunky línie NES2Y boli vystavené pôsobeniu 1 mM SA, 1 mM SA v kombinácii s 0,2 mM OA (SA+OA) a 0,2 mM OA. Kontrolné bunky boli kultivované bez MK (kontrola). Inhibítora autofagického toku bafilomycin A1 (100 nM) alebo DMSO (vehikulum pre bafilomycin A1) boli pridané k bunkám 6 hod pred ukončením požadovanej inkubácie. Expresia proteínov LC3B-II a p62 bola detegovaná metódou WB (**A**) po 12 hod a (**B**) po 18 hod pôsobení MK. Hladina aktínu bola stanovená pre potvrdenie rovnakej nanášky proteínov. Uvedený je reprezentatívny výsledok jedného z troch nezávislých pokusov.

## 7.6 Úloha autofágie v regulácii apoptózy po pôsobení mastných kyselín

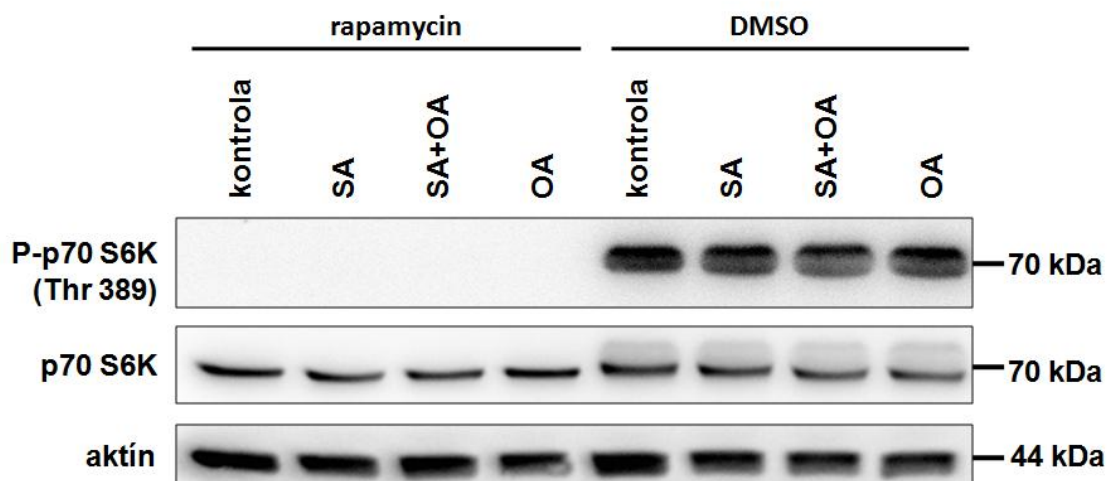
Úlohu autofágie v regulácii apoptózy indukovanej MK sme analyzovali na základe modulácie aktivity autofágie: (1) aplikáciou autofagických modulátorov (bafilomycínu A1 a rapamycínu) a (2) umlčaním expresie esenciálneho proteínu autofágie použitím špecifickej siRNA.

### 7.6.1 Vplyv rapamycínu na indukciu autofágie po pôsobení mastných kyselín

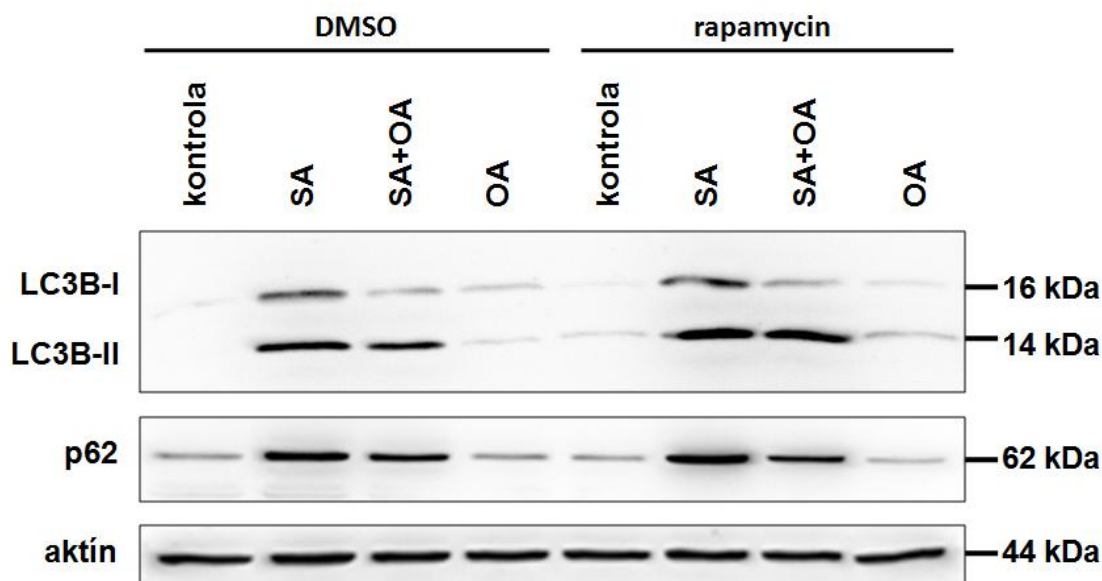
Efekt rapamycínu na indukciu autofágie po pôsobení MK sme sledovali na základe detekcie hladín proteínov LC3B-II a p62 metódou WB po 12 hod pôsobení MK (1 mM SA, 1 mM SA+0,2 mM OA, 0,2 mM OA) (vid' kap. 6.2.1).

Účinnú inhibíciu kinázy mTOR1 po aplikácii rapamycínu sme u  $\beta$  buniek línie NES2Y potvrdili poklesom fosforylovanej formy p70 S6 kinázy (p70 S6K), jedného z hlavných substrátov kinázy mTOR1 (prehľadne v Magnuson et al., 2012). Tá v prípade pôsobenia MK v prítomnosti rapamycínu nebola detegovateľná u žiadnej zo sledovaných experimentálnych podmienok, zatiaľ čo celková expresia p70 S6K sa účinkom MK bez ohľadu na prítomnosť rapamycínu výrazne nemenila (vid' **Obr. 7-6**).

Od aplikácie rapamycínu sme v našom experimentálnom modeli očakávali, že v jeho prítomnosti dôjde u kontrolných buniek k aktivácii autofágie, zatiaľ čo u buniek kultivovaných s MK sme predpokladali zmenu v miere aktivity autofágie. U  $\beta$  buniek línie NES2Y prítomnosť rapamycínu však nemala efekt na zmenu expresie proteínu LC3B-II a p62 ani u kontrolných buniek, ani u buniek kultivovaných s MK (vid' **Obr. 7-7**). To naznačilo, že kináza mTOR1 sa v našom experimentálnom modeli nezúčastňuje na regulácii bazálnej autofágie a rovnako ani autofágie regulovanej pôsobením MK.



**Obr. 7-6. Overenie inhibičného efektu rapamycinu na kinázu mTOR1.** Pankreatické  $\beta$  bunky línie NES2Y boli vystavené 12 hod pôsobeniu 1 mM SA, 1 mM SA v kombinácii s 0,2 mM OA (SA+OA) a 0,2 mM OA. Kontrolné bunky boli kultivované bez MK (kontrola). Aktivátor autofágie rapamycin (10 nM) alebo DMSO (vehikulum pre rapamycin) boli v médiu prítomné po celú dobu inkubácie. Hladina expresie celkovej (p70 S6K) a fosforylovanej (P-p70 S6K) formy p70 S6 kinázy (Thr 389) bola detegovaná metódou WB. Hladina aktínu bola stanovená pre potvrdenie rovnakej nanášky proteínov. Uvedený je reprezentatívny výsledok jedného z troch nezávislých pokusov.



**Obr. 7-7. Vplyv MK na expresiu proteínov LC3B-II a p62 v prítomnosti rapamycinu.** Pankreatické  $\beta$  bunky línie NES2Y boli vystavené 12 hod pôsobeniu 1 mM SA, 1 mM SA v kombinácii s 0,2 mM OA (SA+OA) a 0,2 mM OA. Kontrolné bunky boli kultivované bez MK (kontrola). Aktivátor autofágie rapamycin (10 nM) alebo DMSO (vehikulum pre rapamycin) boli v médiu prítomné celú dobu inkubácie buniek s MK. Expresia proteínov LC3B-II a p62 bola detegovaná metódou WB. Hladina aktínu bola stanovená pre potvrdenie rovnakej nanášky proteínov. Uvedený reprezentatívny výsledok jedného z troch nezávislých pokusov.



## 7.6.2 Vplyv bafilomycinu A1 a rapamycinu na reguláciu apoptózy indukovanej pôsobením mastných kyselín

Predchádzajúce experimenty (viď kap. 7.5 a 7.6.1) preukázali, že aplikácia autofagických modulátorov nepredstavuje v našom experimentálnom modeli úplne špecifický prístup pre štúdium úlohy autofágie v regulácii apoptózy indukovanej MK. Nasýtená SA, obdobne ako bafilomycin A1, prejavila u  $\beta$  buniek línie NES2Y inhibičný efekt na autofagický tok (viď kap. 7.5), zatiaľ čo rapamycin nedokázal v našom experimentálnom modeli aktivovať autofágiu (viď kap. 7.6.1). Napriek tomu sme sa rozhodli tieto modulátory použiť pre pôvodne plánované pokusy týkajúce sa indukcie apoptózy pôsobením MK. Viedli nás k tomu nasledujúce dôvody: (1) mTOR1 signálna dráha sa v bunkách uplatňuje na regulácii translácie, energetického metabolizmu, a tiež interaguje s Akt signálnou dráhou (Ma a BleNis, 2009). Čo sa týka úlohy mTOR1 dráhy v indukcii apoptózy pôsobením MK u  $\beta$  buniek je dnes k dispozícii len málo poznatkov a nie je vylúčené, že sa táto signálna dráha zúčastňuje aj na regulácii apoptózy indukovanej MK. (2) aplikáciou bafilomycinu A1 sme u  $\beta$  buniek línie NES2Y zistili, že nenasýtená OA pri spoločnej inkubácii s nasýtenou SA inhibuje autofagický blok vyvolaný účinkom SA (viď kap 7.5) a výsledky týchto pokusov by mohli naznačiť, či sa táto inhibícia autofagického bloku podieľa aj na inhibícii apoptózy indukovanej pôsobením SA.

Vplyv bafilomycinu A1 a rapamycinu na indukciu apoptózy po pôsobení MK (1 mM SA, 1 mM SA+0,2 mM OA, 0,2 mM OA) (viď kap.6.2.1) sme u  $\beta$  buniek línie NES2Y sledovali v časových intervaloch 12 hod alebo 18 hod pomocou metódy WB. Tieto časy boli vybrané na základe toho, že u  $\beta$  buniek línie NES2Y je aktivácia kaspáz pri indukcii apoptózy detekovateľná už po 18 hod pôsobenia MK (Němcová-Furstová et al., odoslané k publikácii). Pre postihnutie prípadného vplyvu autofágie na aktiváciu apoptózy indukovanej MK v čo najskoršej fáze sme sa v experimentoch zamerali na detekciu aj po kratšej dobe pôsobenia MK, a to 12 hod.

Pre analýzu potencionálnych zmien v aktivácii apoptózy sme sledovali štiepenie proteínu PARP, expresiu štiepenej (aktivovanej) formy kaspázy 7 (p20 kDa), kaspázy 8 (p41/p44 kDa) a kaspázy 9 (p35 kDa) a celej (neaktivovanej) formy kaspázy 2 (p50 kDa). Aktivácia kaspázy 2 na základe detekcie jej aktívnych štepov metódou WB za použitia protilátky proti celej forme, ktorú sme mali k dispozícii, je problematická a vyžaduje vysoké nanášky proteínov pre SDS-PAGE. Preto sme uprednostnili detekciu

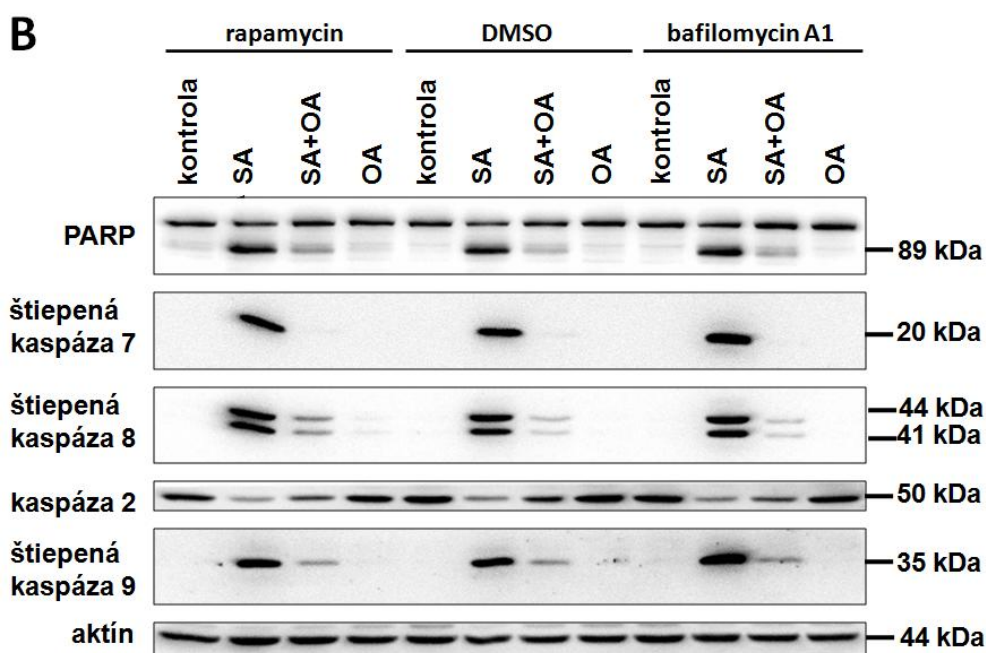
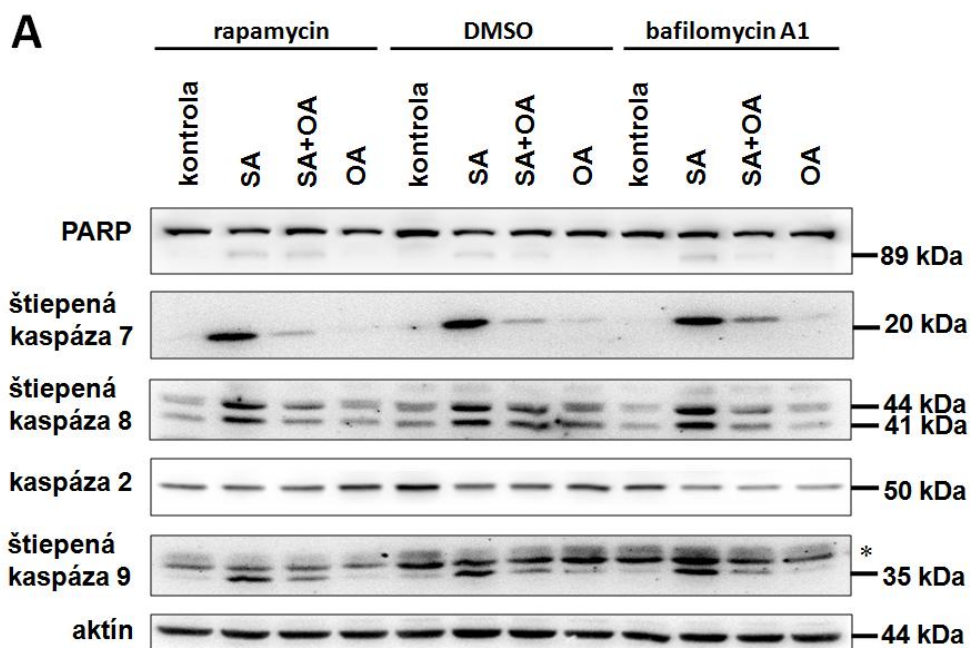
hladiny celej formy kaspázy 2, u ktorej bolo pokusmi v našom laboratóriu overené, že pokles hladín jej expresie zodpovedá nárastu aktivácie kaspázy 2 (skúsenosť kolektívu Oddělení buněčné a molekulární biologie).

Už 12 hod pôsobenie nasýtenej SA spôsobilo u  $\beta$  buniek línie NES2Y aktiváciu apoptózy. Zodpovedal tomu nárast hladín štiepenej formy proteínu PARP, nárast hladín aktívnych štepov kaspázy 7, 8 a 9 a pokles hladiny celej formy kaspázy 2. Tento nárast signifikantne tlmil účinok nenasýtenej OA pri ich spoločnej inkubácii (vid' **Obr. 7-8 A**). Rovnaký trend, to znamená štiepenie proteínu PARP a nárast aktivácie kaspáz v prípade účinku SA a inhibičné pôsobenie OA na aktiváciu apoptózy vyvolanej pôsobením SA sme zaznamenali aj po 18 hod pôsobenia MK (vid' **Obr. 7-8 B**), kedy sledované prejavy prebiehajúcej apoptózy boli výraznejšie ako pri 12 hod pôsobení MK.

Expresia aktívnych štepov kaspáz bola po 12 hod pôsobení SA veľmi slabá, ale bola detekovateľná. Nízka hladina expresie aktívneho štepu kaspázy 9 ale mala pri detekcii použitou protilátkou za následok objavenie nešpecificity (vid' **Obr. 7-8 A** označenie \*). Táto nešpecificita bola v našom laboratóriu detegovaná opakovane v prípadoch nízkej miery aktivácie kaspázy 9 aj na iných bunkových modeloch (skúsenosť Oddělení buněčné a molekulární biologie).

Pôsobenie SA v prítomnosti bafilomycinu A1 alebo rapamycinu v porovnaní s pôsobením samotnej SA nespôsobilo signifikantnejšie rozdiely v expresii štiepených foriem proteínu PARP a kaspáz 7, 8 a 9 a rovnako neviedlo ani k poklesu hladín celej formy kaspázy 2 v žiadnom z detegovaných časov (vid' **Obr. 7-8 A** (12 hod) a **Obr. 7-8 B** (18 hod)). Prítomnosť bafilomycinu A1 alebo rapamycinu neovplyvnila ani inhibičné pôsobenie OA, ktorá v rovnakej miere inhibovala proapoptotické pôsobenie SA pri ich spoločnej inkubácii.

Z týchto výsledkov môžeme usudzovať, že mTOR1 dráha sa u  $\beta$  buniek línie NES2Y po pôsobení MK neuplatňuje na regulácii apoptózy. Dáta tiež naznačili, že v našom experimentálnom systéme sa inhibičný efekt OA na autofagický blok vyvolaný účinkom SA pri ich spoločnej inkubácii nepodieľa na regulácii apoptózy indukovanej nasýtenou SA.



**Obr. 7-8. Efekt autofagických modulátorov na indukciu apoptózy pôsobením MK.** Pankreatické  $\beta$  bunky línie NES2Y boli vystavené pôsobeniu 1 mM SA, 1 mM SA v kombinácii s 0,2 mM OA (SA+OA) a 0,2 mM OA (**A**) po dobu 12 hod a (**B**) po dobu 18 hod. Kontrolné bunky boli kultivované bez MK (kontrola). Aktivátor autofágie rapamycin (10 nM) bol prítomný v médiu počas celej doby pôsobenia MK. Inhibitor autofagického toku bafilomycin A1 (100 nM) alebo DMSO (vehikulum pre bafilomycin A1 a rapamycin) boli pridané k bunkám 6 hod pred ukončením ich inkubácie s MK. Expresia celkovej a štiepanej formy proteínu PARP, aktívnych štepov kaspázy 7, kaspázy 8, kaspázy 9 a celej formy kaspázy 2 bola detegovaná metódou WB. \* označuje nešpecifitu detegovanú pri použití protilátky proti aktívnemu štepu kaspázy 9. Hladina aktínu bola stanovená pre potvrdenie rovnakej nanášky proteínov. Uvedený je reprezentatívny výsledok jedného z troch nezávislých pokusov.

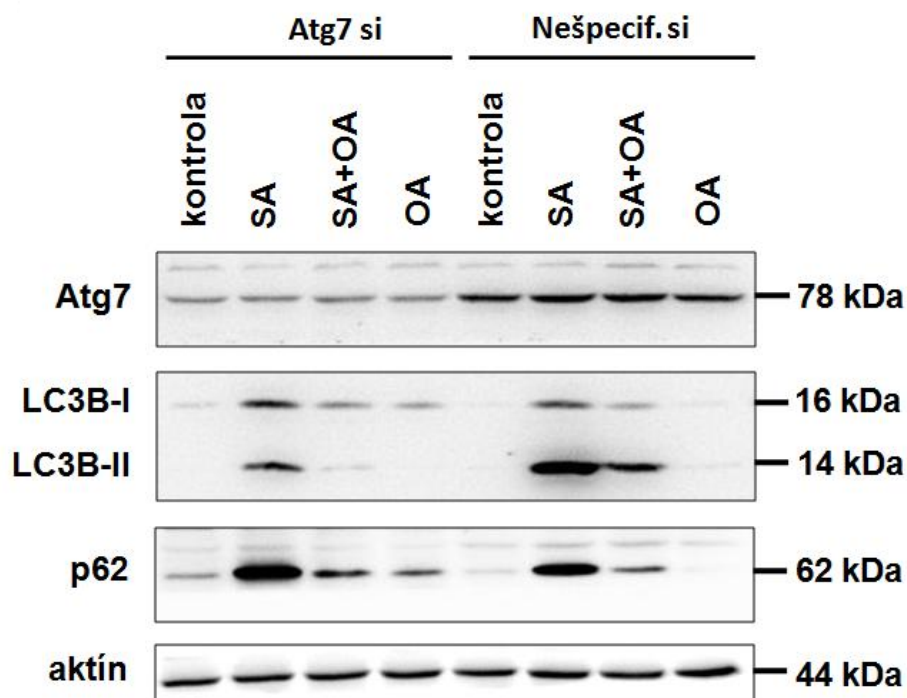
### 7.6.3 Vplyv inhibície autofágie umlčaním Atg7 na zmenu aktivity apoptózy indukovanej mastnými kyselinami

Pomocou inhibície autofágie účinkom bafilomycínu A1 alebo naopak aktivácie autofágie po aplikácii rapamycínu sme u  $\beta$  buniek línie NES2Y neboli schopní vyriešiť úlohu autofágie v regulácii apoptózy po pôsobení MK. Preto sme sa rozhodli pre inhibíciu autofágie využiť aplikáciu siRNA.

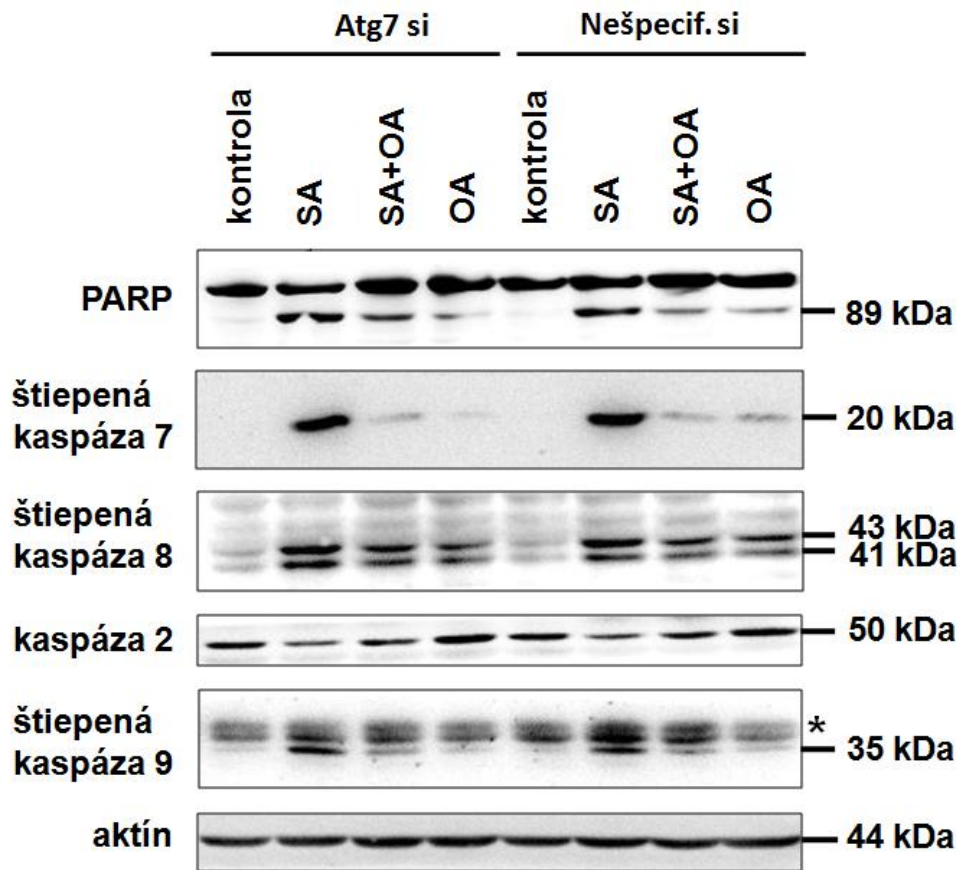
Pomocou siRNA sme u  $\beta$  buniek línie NES2Y inhibovali autofágiu umlčaním expresie autofagického proteínu Atg7. Bunky boli po aplikácii Atg7 siRNA (viď kap. 6.2.5.) vystavené 12 hod pôsobeniu MK (1 mM SA, 1 mM SA+0,2 mM OA, 0,2 mM OA) (viď kap. 6.2.1). Metódou WB sme u buniek sledovali vplyv umlčania expresie proteínu Atg7 (1) na aktiváciu autofágie detekciou expresie proteínov LC3B-II a p62 a (2) na aktiváciu apoptózy na základe detekcie štiepenia proteínu PARP, hladín aktívnych štepov kaspázy 7 (p20 kDa), 8 (p41/p44 kDa) a 9 (p35 kDa) a celej formy kaspázy 2 (p50 kDa).

Aplikácia Atg7 siRNA viedla u  $\beta$  buniek línie NES2Y k účinnému umlčaniu expresie proteínu Atg7. Odpovedal tomu významný pokles expresie proteínu Atg7 u buniek transfekovaných Atg7 siRNA v porovnaní s bunkami transfekovanými len nešpecifickou siRNA. Pokles expresie proteínu LC3B-II a mierny nárast hladín proteínu p62 pozorovaný po aplikácii Atg7 siRNA v porovnaní s účinkom nešpecifickej siRNA potvrdil u buniek efektívnu inhibíciu autofágie vo všetkých experimentálnych podmienkach pôsobenia MK (viď **Obr. 7-9**). Napriek tomu sme u buniek s aplikovanou Atg7 siRNA v porovnaní s účinkom nešpecifickej siRNA nezaznamenali po pôsobení MK významné zmeny v aktivácii apoptózy (viď **Obr. 7-10**). Pôsobenie SA viedlo k významnému štiepeniu proteínu PARP, nárastu hladín aktívnych štepov kaspázy 7, 8 a 9 a k poklesu expresie celej formy kaspázy 2 s rovnakou mierou u buniek transfekovaných Atg7 siRNA, tak aj nešpecifickou siRNA. Tento účinok SA bol ale signifikantne inhibovaný nenasýtenou OA pri spoluinkubácii s SA u oboch pôsobiacich siRNA. Nenasýtená OA neaktivovala u buniek apoptózu ani v prípade Atg7 siRNA, ani nešpecifickej siRNA (viď **Obr. 7-10**). 12 hod pôsobenie MK, obdobne ako v prípade pôsobenia autofagických modulátorov (viď **Obr. 7-8 A**), viedlo aj po aplikácii siRNA v prípade detekcie aktívneho štepu kaspázy 9 k objaveniu nešpecificity (označená \*) (viď **Obr. 7-10**).

Týmito výsledkami sme ukázali, že inhibícia autofágie nemá u  $\beta$  buniek línie NES2Y vplyv na aktiváciu apoptózy indukovanej MK, čo naznačuje, že autofágia sa u ľudských  $\beta$  buniek línie NES2Y nezúčastňuje na regulácii apoptózy indukovanej MK.



**Obr. 7-9. Efekt umlčania expresie autofagického génu Atg7 na aktiváciu autofágie pôsobením MK.** Pankreatické  $\beta$  bunky línie NES2Y boli transfekované Atg7 siRNA (Atg7 si) alebo nešpecifickou siRNA (Nešpecif. si). Bunky boli následne vystavené 12 hod pôsobeniu 1 mM SA, 1 mM SA v kombinácii s 0,2 mM OA (SA+OA) a 0,2 mM OA. Kontrolné bunky boli kultivované bez MK (kontrola). Expresia proteínov Atg7, LC3B-II a p62 bola detegovaná pomocou metódy WB. Hladina aktínu bola stanovená pre potvrdenie rovnakej nanášky proteínov. Reprezentovaný jeden z troch nezávislých pokusov.



**Obr. 7-10. Efekt umlčania exprese autofagického génu Atg7 na indukciu apoptózy pôsobením MK.** Pankreatické  $\beta$  bunky línie NES2Y boli transfekované Atg7 siRNA (Atg7 si) alebo nešpecifickou siRNA (Nešpecif. si). Bunky boli následne vystavené 12 hod pôsobeniu 1 mM SA, 1 mM SA v kombinácii s 0,2 mM OA (SA+OA) a 0,2 mM OA. Kontrolné bunky boli kultivované bez MK (kontrola). Expresia štiepených foriem proteínu PARP, aktívnych štepov kaspázy 7, kaspázy 8, kaspázy 9 a celej formy kaspázy 2 bola detegovaná pomocou metódy WB. Hladina aktínu bola stanovená pre potvrdenie rovnakej nanášky proteínov. Reprezentovaný jeden z troch nezávislých pokusov.

## 8 DISKUSIA

Ochorením diabetes mellitus je dnes na svete postihnutých 346 miliónov ľudí, z čoho až 90% trpí na diabetes mellitus 2 typu (DM2T) (WHO, 2011). Prevalencia DM2T neustále stúpa a v niektorých častiach sveta nadobúda charakter epidémie, ale ani napriek intenzívnemu výskumu nie je dnes k dispozícii účinná liečba tejto choroby (Olokoba et al., 2012).

K patogenéze DM2T významne prispieva apoptóza  $\beta$  buniek indukovaná masnými kyselinami (MK) (Eitel et al., 2002; Diakogiannaki et al., 2007; Choi et al., 2007; Dhayal et al., 2008), pričom mechanizmus ich účinku nie je zatiaľ dostatočne vysvetlený. Za fyziologických podmienok je správna funkcia  $\beta$  buniek podmienená neporušenou aktivitou autofágie (Ebato et al., 2008; Jung et al., 2008), ktorá je u pankreatických  $\beta$  buniek regulovaná aj pôsobením MK (Choi et al., 2009; Las et al., 2011; Martino et al., 2012). Signálne dráhy apoptózy a autofágie interagujú na viacerých úrovniach a vyriešenie otázky, akú úlohu zohráva u  $\beta$  buniek autofágia vo vzťahu k apoptóze indukovanej MK, by mohlo priniesť nové možnosti v terapii DM2T.

Tematika úlohy autofágie vo vzťahu k apoptóze indukovanej MK u  $\beta$  buniek je vo výskume zatiaľ pomerne nová. V literatúre je dodnes k dispozícii len malý počet publikácií a dostupné dáta pochádzajú prevažne z *in vitro* experimentov na živočíšnych modeloch. Cieľom tejto diplomovej práce (DP) bolo prispieť k rozšíreniu znalostí o vzťahu autofágie k apoptóze indukovanej pôsobením MK u ľudských pankreatických  $\beta$  buniek. Úlohu autofágie sme sledovali u buniek s indukovanou apoptózou po pôsobení nasýtenej SA a s inhibovanou apoptózou u buniek vystavených kombinácii SA s OA, kde OA inhibuje proapoptotický účinok SA (Fürstová et al., 2008; Němcová-Fürstová et al., 2011).

### 8.1 Aktivácia autofágie pôsobením masných kyselín

Na základe nárastu hladín proteínu LC3B-II sme ukázali, že pôsobenie 1 mM nasýtenej SA u  $\beta$  buniek línie NES2Y signifikantne indukuje tvorbu autofagozómov, ktorá je na druhej strane účinne inhibovaná pri spoluinkubácii SA s nenasýtenou OA v koncentrácii 5-krát nižšej. Samotná nenasýtená OA pri nami použitej koncentrácii nemala u  $\beta$  buniek línie NES2Y vplyv na bazálnu hladinu autofágie. Toto antagonistické pôsobenie MK v prípade autofágie sme potvrdili aj pomocou

vizualizácie autofagozómov konfokálnou mikroskopiou a detekciou autofagolyzozómov pomocou prietokovej cytometrie. Naše primárne výsledky naznačili, že obdobne ako v prípade indukcie apoptózy (Fürstová et al., 2008; Fürstová et al., 2011), aj v prípade regulácie autofágie sa nasýtené a nenasýtené MK správajú u  $\beta$  buniek línie NES2Y protichodne. Podľa nám dostupných informácií sa jedná o prvé porovnanie vplyvu nasýtenej SA a nenasýtenej OA (jednotlivo alebo v spoluinkubácii) na reguláciu autofágie u ľudských pankreatických  $\beta$  buniek.

Účinok nasýtených a nenasýtených MK na aktiváciu autofágie bol skúmaný u iných bunkových typov. V súlade s našimi dátami získanými u pankreatických  $\beta$  buniek ukázali Tan et al. (2012), že nasýtená PA reguluje u myších embryonálnych fibroblastov a HepG2 buniek autofágiu. Rovnako ako my tiež zaznamenali, že pôsobenie nenasýtenej OA v koncentrácii 0,25 mM, to znamená v koncentrácii blízkej koncentrácii, v akej bola OA aplikovaná v tejto DP, nemá vplyv na bazálnu aktivitu autofágie. Naopak Mei et al. (2011) u myších primárnych hepatocytov a HepG2 buniek v rozpore s našimi výsledkami u pankreatických  $\beta$  buniek zistili, že pôsobenie nenasýtenej OA spôsobuje aktiváciu autofágie, zatiaľ čo nasýtená PA na jej aktiváciu nemá vplyv. Táto vedecká skupina použila pre analýzu autofágie rovnaké metodické prístupy ako my v tejto DP, a to vizualizáciu autofagozómov pomocou fluorescenčnej mikroskopie a detekciu expresie LC3B-II pomocou WB (Mei et al., 2011). Na rozdiel od nás ale Mei et al. sledovali pôsobenie OA vo vyššej koncentrácii, ako bola koncentrácia OA testovaná v tejto DP. Obdobne aj u potkaních  $\beta$  buniek línie INS1 preukázala vyššia koncentrácia OA, ako bola použitá v tejto DP, schopnosť aktivovať autofágiu (Ebato et al., 2008; Komiya et al., 2010).

V rámci experimentov tejto DP bola nenasýtená OA aplikovaná v koncentrácii 0,2 mM, ktorá je dostatočná pre úplnú inhibíciu proapoptotického účinku nasýtenej SA pri ich spoločnej inkubácii (Fürstová et al., 2008) a naším cieľom nebolo sledovať účinok rôznych koncentrácií OA. Na základe spomenutých štúdií sa však zdá, že účinok nenasýtenej OA na aktiváciu autofágie je závislý na jej použitej koncentrácii, a preto je dôležité v budúcnosti podrobnejšie preskúmať vplyv OA na aktivitu autofágie v rôznych koncentráciách.

Napriek tomu, že sme u  $\beta$  buniek línie NES2Y preukázali zmenu v aktivácii autofágie po pôsobení MK tromi nezávislými metódami, na úrovni expresie proteínov sme pozorovali zmenu len u proteínu LC3B-II, pričom hladiny ďalších nami detegovaných esenciálnych proteínov autofágie, Atg5, Atg7 a beclinu-1 zostali po



pôsobení MK nezmenené. V prípade beclinu-1 bolo na transkripčnej úrovni preukázané, že u  $\beta$  buniek pacientov s DM2T, u ktorých bola zároveň demonštrovaná aj autofágia, nedochádza k zmene jeho expresie (Masini et al., 2009). Našimi výsledkami v *in vitro* podmienkach sme preukázali, že proteínové hladiny beclinu-1 nie sú ovplyvnené ani v prípade autofágie regulovanej pôsobením MK. To naznačuje, že detekcia expresie beclinu-1 nie je vhodná pre monitorovanie autofágie v súvislosti DM2T u  $\beta$  buniek. Čo sa týka proteínu Atg7, existuje typ autofágie, ktorý je nezávislý na proteíne Atg7 (Nishida et al., 2009). To sme v našom systéme ale vylúčili, pretože transfekcia  $\beta$  buniek línie NES2Y siRNA špecifickou proti Atg7 viedla k účinnej inhibícii autofágie. Proteín Atg5 je z membrány maturovaného autofagozómu disociovaný v podobe Atg5-Atg12 konjugátu, ktorého hladina sa v prítomnosti autofagického stimulu pravdepodobne nemení (Fujita et al., 2008). Expresia Atg5 a Atg7 po pôsobení MK nebola podľa nám dostupnej literatúry zatiaľ sledovaná, a preto nemáme k dispozícii dáta, s ktorými by sme porovnali výsledky získané v tejto DP. Naše dáta ukázali, že detekcia hladín proteínov Atg5, Atg7 a beclinu-1 nepredstavuje u  $\beta$  buniek línie NES2Y vhodné markery pre analýzu miery autofágie po pôsobení MK.

Vzájomnú interakciu autofagickej a apoptotickej signálnej dráhy je možné sledovať aj na základe štiepenia autofagických proteínov Atg5 a beclinu-1 aktivovanými kaspázami (viď kap. 3.5). V prípade beclinu-1 bolo preukázané, že sa jedná o substrát kaspázy 3 (Zhu et al., 2010), ktorá sa ale neuplatňuje v našom experimentálnom modeli na sprostredkovaní apoptózy indukovanej MK (Fürstová et al., 2008; Němcová-Fürstová et al., 2011). U HepG2 buniek pôsobenie nasýtenej PA viedlo k nárastu aktivity kaspázy 3, pričom bolo zároveň detegované aj štiepenie beclinu-1 (Mei et al., 2011). U  $\beta$  buniek línie NES2Y sme nedetegovali štiepené formy ani proteínu Atg5, ani beclinu-1. Vysvetlenie priniesli experimenty v tejto DP, ktoré sú diskutované v kap. 8.6.

## **8.2 Zavedenie metód pre štúdium autofágie u pankreatickej línie NES2Y**

V rámci primárnych experimentov sme u  $\beta$  buniek línie NES2Y zaviedli metodológiu pre analýzu tvorby autofagozómov pomocou detekcie hladín LC3B-II metódou WB, detekciu AVOs pomocou prietokovej cytometrie u buniek farbených akridínovou oranžovou a vizualizáciu autofagozómov na základe nepriamej

imunofluorescencie LC3B pomocou konfokálnej mikroskopie. Z použitých metód sa ako najvhodnejšia a súčasne najpraktickejšia ukázala metóda WB.

Prietoková cytometria umožňuje zaznamenať zmenu v tvorbe AVOs, za ktoré sú považované autofagolyzozómy, lyzozómy, pozdné endozómy a amfizómy (viď kap. 3.7.1). Nejedná sa však o úplne špecifickú metódu, pretože neumožňuje kvantifikovať početné zastúpenie jednotlivých foriem AVOs a odlíšiť autofagolyzozómy od ostatných AVOs. Našimi experimentami sme ale ukázali, že použitie prietokovej cytometrie je dostatočné pre prvočné monitorovanie prítomnosti autofágie u  $\beta$  buniek línie NES2Y po pôsobení MK a v rámci analýzy autofagického toku je vhodná pre doplnenie informácií k dátam získaných metódou WB.

Pomocou konfokálnej mikroskopie a farbeniu LC3B sme v našom experimentálnom systéme po pôsobení MK boli schopní vizualizovať tvorbu autofagozómov. Napriek tomu, že sa jedná o najčastejšie používanú metódu pri monitorovaní autofágie u rôznych bunkových typov a aj u pankreatických  $\beta$  buniek (Choi et al., 2009; Martino et al., 2012; Quan et al., 2012; Tan et al., 2012), spomedzi použitých metód u  $\beta$  buniek línie NES2Y vykázala najnižšiu citlivosť. Za jej použitia sme nezaznamenali tak významné zmeny v tvorbe autofagozómov, ako boli zmeny detegované na úrovni hladiny proteínu LC3B-II pomocou WB.

Na základe týchto skúseností sme rozhodli pre analýzu autofágie v ďalších experimentoch používať metódu WB. Zavedené protokoly pre prietokovú cytometriu a konfokálnu mikroskopiu budú využité pre ďalšie projekty prebiehajúce na oddelení, kde bola táto DP vypracovaná.

## 8.3 Účinok mastných kyselín na autofagický tok

Experimentami v tejto DP sme zistili, že zatiaľ čo pôsobenie nasýtenej SA spôsobuje u  $\beta$  buniek línie NES2Y autofagický blok a je zároveň sprevádzané nárastom množstva autofagozómov aj autofagolyzozómov, nenasýtená OA nemá vplyv na bazálnu aktivitu autofágie a neovplyvňuje ani tvorbu týchto autofagických štruktúr. V prípade spoluinkubácie SA s OA je nenasýtená OA schopná inhibovať autofagický blok vyvolaný účinkom SA a vedie k poklesu množstva ako autofagozómov, tak aj autofagolyzozómov.

Autofagický blok vyvolaný účinkom SA sme u  $\beta$  buniek línie NES2Y preukázali na základe inhibície degradačných fáz autofágie použitím bafilomycinu A1. Rovnaký

účinnok nasýtenej MK bol zaznamenaný aj u potkaních  $\beta$  buniek línie INS1 po pôsobení PA (Las et al., 2011). Táto vedecká skupina využila pre detekciu autofagického toku poznatok, že fluorescencia GFP je inhibovaná kyslým prostredím, ktoré je prítomné aj v lumen lyzozómov. Funkčný prechod autofagickou dráhou je sprevádzaný poklesom fluorescenčného signálu GFP-LC3 a naopak hromadenie GFP-LC3 signálu zodpovedá poruchám v tvorbe autofagolyzozómov a prítomnosti autofagického bloku (Shvets et al., 2008). Pozdnú fázu autofágie sme po pôsobení MK sledovali pomocou prietokovej cytometrie u  $\beta$  buniek línie NES2Y po farbení AO. Aj keď sa jedná o menej špecifický postup detekcie ako bol použitý v štúdií Las et al. (2011), rovnako ako táto vedecká skupina v prípade pôsobenia nasýtenej PA, sme aj my zaznamenali nárast tvorby autofagolyzozómom účinkom nasýtenej SA.

U buniek exprimujúcich GFP-LC3 je možné autofagický tok analyzovať aj pomocou WB sledovaním štiepenia GFP, ktoré reflektuje autofagickú degradáciu a štiepenie substrátov v lyzozóme. Na tomto princípe ale Quan et al. (2012) u pankreatických ostrovčiekov naopak preukázali, že obezita spôsobuje v *in vivo* podmienkach nárast autofagického toku. Na modeli obéznych myší exprimujúcich GFP-LC3 (ob/ob myši GFP-LC3<sup>+</sup>) v porovnaní s kontrolami detegovali nielen nárast tvorby GFP-LC3 „dots“ reprezentujúcich autofagozomy, ale zároveň aj zvýšenú hladinu štiepenia GFP. V súlade s touto prácou sú aj výsledky Komyia et al. (2010), ktorí monitorovaním degradácie „long-lived“ proteínov, odburávaných preferenčne cestou autofágie, u potkaních  $\beta$  buniek línie INS1 zistili, že PA zvyšuje autofagický tok. Pomocou aplikácie inhibítorov degradačných fáz autofágie, metodického prístupu, ktorým sme v tejto DP odhalili autofagický blok účinkom SA, v súlade s výsledkami Quan et al. (2012) a Komyia et al. (2010) zistili aj ďalšie vedecké skupiny, že účinnok nasýtenej MK spôsobuje nárast autofagického toku. Pôsobenie nasýtenej PA viedlo k nárastu autofagického toku ako u potkaních INS1  $\beta$  buniek (Choi et al., 2009), tak aj u myších embryonálnych fibroblastov a HepG2 buniek (Tan et al., 2012).

Zdá sa, že skúmanie vplyvu MK na aktivitu autofágie prináša v závislosti od bunkového typu a použitej detekčnej metódy protikladné výsledky nielen u rôznych, ale aj u toho istého bunkového typu (Choi et al., 2009; Komyia et al., 2010; Las et al., 2011). Hlavným problémom v tejto oblasti sa javí nejednotnosť použitých metodických prístupov. Molekulárny mechanizmus autofágie u cicavcov nie je zatiaľ kompletne popísaný a jeho detailnejšia charakterizácia v budúcnosti by mohla viesť k vytvoreniu

univerzálnej metódy pre analýzu autofágie. To by umožnilo špecificky porovnávať výsledky získané aj u rôznych bunkových typov.

Z hľadiska inhibičného účinku nenasýtenej OA na pôsobenie SA v rámci regulácie autofágie, ktoré sme pozorovali u  $\beta$  buniek línie NES2Y pri spoločnej inkubácii SA s OA, by bolo zaujímavé poznať potencionálne miesto autofagickej dráhy, s ktorým nasýtená SA interaguje. Vedecká skupina Las et al. (2011) na základe detekcie aktivity lyzozomálnych hydroláz ukázala, že MK spôsobujú u potkaních INS1  $\beta$  buniek alkalizáciu lyzozomálneho prostredia. Tým znefunkčujú aktivitu lyzozomálnych enzýmov a zabraňujú degradácii materiálu po fúzii autofagozómu s lyzozómom, čo v konečnom dôsledku vedie k autofagickému bloku. U  $\beta$  buniek pacientov s DM2T bol napriek doloženej autofágii pomocou kvantitatívnej RT-PCR zaznamenaný signifikantný pokles transkripcie génov pre lyzozomálne proteázy cathepsinu B a D, uplatňujúcich sa na degradácii materiálu v autofagolyzozóme (Masini et al., 2009). To naznačilo, že nedostatočná tvorba lyzozomálnych enzýmov môže byť príčinou poruchy autofagickej dráhy, čo sa pravdepodobne uplatňuje v patogenéze DM2T.

V rozpore s Las et al. (2011) zistili Martino et al. (2012), že nasýtená PA nemá u potkaních pankreatických  $\beta$  buniek INS1 efekt na aktivitu lyzozomálnych enzýmov. Aj keď priamo nedetegovali aktivitu lyzozomálnych proteáz, na základe imunofluorescenie kathepsinu D zodpovedajúcemu aktivite tohto lyzozomálneho enzýmu, ktorá sa nemenila ani po 24 hod pôsobení PA odvodili, že jeho aktivita nie je účinkom MK ovplyvnená (Martino et al., 2012).

Akumuláciu autofagolyzozómov po pôsobení SA, ktorú sme zaznamenali pomocou prietokovej cytometrie u  $\beta$  buniek línie NES2Y farbených AO, môže byť dôsledkom toho, že SA blokuje krok nasledujúci po fúzii autofagozómu s lyzozómom tým, že poškodzuje funkciu lyzozomálnych proteáz a inhibuje degradáciu materiálu. Pre potvrdenie alebo vyvrátenie tejto hypotézy je nutné túto problematiku detailnejšie preskúmať.

U hepatocytov bolo v protiklade s pankreatickými  $\beta$  bunkami na základe špecifického farbenia membrán autofagozómov pomocou anti-LC3B a lyzozómov pomocou anti-LAMP2 zistené, že chronické pôsobenie lipidov vedie k poklesu fúzie autofagozómu s lyzozómom (Koga et al., 2010). To naznačilo, že MK môžu spôsobovať v závislosti na bunkovom type autofagický blok na úrovni fúzie autofagozómu s lyzozómom alebo až v štádiu degradácie materiálu v autofagolyzozóme.

Štúdium akým MK zapríčiňujú autofagický blok je dnes pomerne limitovaný tým, že mechanizmus fúzie autofagozómu s lyzozómom je charakterizovaný len čiastočne. Jeho detailnejšie poznanie v budúcnosti by mohlo prispieť k vyriešeniu otázky interakcie nasýtenej SA s autofagickou dráhou, a tiež pomôcť k vysvetleniu inhibičného účinku OA na autofagický blok vyvolaný účinkom SA.

## **8.4 Degradácia proteínu p62 u pankreatickej línie NES2Y**

Defektná autofágia je spájaná s akumuláciou ubiquitinylovaných proteínov a ich hlavného autofagického receptora, proteínu p62 (Komatsu a Ichimura, 2010). Hromadenie ubiquitinylovaných proteínových agregátov bolo zaznamenané na modeli pankreatických  $\beta$  buniek s inaktivovanou autofágiou (Ebato et al., 2008; Jung et al., 2008) a rovnako aj u „Zuckerfatdiet“ potkanov, modeli používanom pre štúdium patogenézy DM2T (Kaniuk et al., 2007). Proteínové agregáty môžu byť u pankreatických  $\beta$  buniek odbúrané prostredníctvom proteazómovej degradačnej dráhy alebo cestou autofágie (Hartley et al., 2009). Relatívny podiel autofágie a proteazómu na degradácii samotného proteínu p62 ale nie je zatiaľ jasný. Degradácia p62 je pravdepodobne závislá na autofagickej dráhe nielen u hepatocytov a neurónov (Komatsu et al., 2007), ale aj u HeLa buniek (Bjorkoy et al., 2005) či myších embryonálnych fibroblastov (Wang et al., 2006). To by naznačovalo, že proteín p62 je degradovaný preferenčne autofagickou dráhou nezávisle na bunkovom type. V kontraste s týmito prácami sme ale u  $\beta$  buniek línie NES2Y po inhibícii autofágie účinkom bafilomycínu A1 a rovnako aj prostredníctvom Atg7 siRNA zaznamenali len mierny nárast hladín p62. Tieto výsledky naznačili, že p62 je v našom experimentálnom modeli degradovaný autofagickou dráhou len v malej miere, a že rovnako ako u pankreatických ostrovčekov *db/db* myší (Quan et al., 2012), reflektujú hladiny p62 u  $\beta$  buniek línie NES2Y skôr proteolýzu ako autofagickú degradáciu tohto proteínu. Túto interpretáciu získaných dát je však v budúcnosti nutné overiť, napr. sledovaním akumulácie p62 u buniek s inhibovanou funkciou proteazómu.

## 8.5 Úloha kinázy mTOR1 na regulácii autofágie po pôsobení mastných kyselín

Pre špecifickejšie stanovenie úlohy autofágie v regulácii apoptózy sme použili autofagický aktivátor, rapamycin. Vďaka svojej schopnosti blokovať funkciu kinázy mTOR1, hlavného inhibítora autofágie, je rapamycin bežne používaný pre indukciu autofágie u rôznych bunkových typov (Ravikumar et al., 2002; Boland et al., 2008). Účinná aktivácia autofágie po aplikácii rapamycinu bola u  $\beta$  buniek manifestovaná v *in vitro* aj v *in vivo* podmienkach (Tanemura et al., 2012). U  $\beta$  buniek línie NES2Y sme pozorovali efektívnu inhibíciu mTOR1 účinkom rapamycinu. Napriek tomu ale jeho prítomnosť neovplyvnila mieru expície proteínu LC3B-II, z čoho sme usúdili, že regulácia autofágie je u  $\beta$  buniek línie NES2Y nezávislá na signalizácii kinázy mTOR1. Účinok rapamycinu nevedol ani k zmene aktivácie autofágie v prípade pôsobenia nasýtenej SA a neovplyvnil ani mieru inhibičného účinku OA na pôsobenie SA pri ich spoločnej inkubácii. Týmito výsledkami sme naznačili, že u  $\beta$  buniek línie NES2Y sa kináza mTOR1 neuplatňuje na regulácii autofágie pôsobením MK a že ani inhibičný účinok nenasýtenej OA na efekt SA v súvislosti s autofagickým tokom nie je sprostredkovaný touto signálnou dráhou.

Úloha mTOR1 signálnej dráhy v regulácii autofágie u pankreatických  $\beta$  buniek nie je zatiaľ jasná. U potkaních INS1  $\beta$  buniek preukázali nezávisle na sebe Choi et al. (2009) a Martino et al. (2012), že MK regulujú autofágiu prostredníctvom mTOR1 dráhy, zatiaľ čo Komiya et al. (2010) zistili, že MK aktivujú autofágiu prostredníctvom JNK1 signálnej dráhy nezávisle na aktivácii komplexu mTOR1. Účasť JNK signalizácie na sprostredkovaní autofágie bola zaznamenaná aj po pôsobení PA u myších embryonálnych fibroblastov a HepG2 buniek (Tan et al., 2012).

Či sa signálna dráha kinázy mTOR1 uplatňuje na regulácii autofágie alebo nie objasnia až experimenty v budúcnosti. Aj keď je komplex mTOR1 považovaný za hlavný regulátor autofágie, netreba zabúdať, že regulácia autofágie a jej signalizácia bola skúmaná predovšetkým na modeli autofágie indukovanej za podmienok hladovania. Je možné, že MK regulujú autofágiu prostredníctvom iných signálnych dráh, ktoré doteraz neboli so signalizáciou autofágie vôbec spájané.

## 8.6 Úloha autofágie v regulácii apoptózy pôsobením mastných kyselín

Nepoškodená funkcia autofágie je u pankreatických  $\beta$  buniek nutná pre ich správnu fyziologickú funkciu. Vyplýva to z experimentov vykonaných na pankreatických ostrovčekoch s Atg7 deletovaným špecificky v pankreatických  $\beta$  bunkách, u ktorých bol detegovaný pokles množstva  $\beta$  buniek, ich znížená proliferácia a nárast apoptózy (Jung et al., 2008). Ebato et al. (2008) na tomto modeli ďalej demonštrovali, že lipotoxicita ešte akceleruje indukciu apoptózy. Poškodenie správnej funkcie autofágie u pankreatických  $\beta$  buniek pravdepodobne prispieva k patogeneze DM2T. Naznačil to nárast apoptotických buniek detegovaný u  $\beta$  buniek diabetických pacientov (Masini et al., 2009), a rovnako aj na modeli *db/db* myši s Atg7 deletovaným špecificky v pankreatických  $\beta$  bunkách (Quin et al., 2012). Za hlavnú príčinu indukcie apoptózy  $\beta$  buniek považujú Masini et al. (2009) práve poruchu autofágie, ktorá bola zaznamenaná na základe zvýšenej vakuolizácie pomocou elektrónovej mikroskopie. Následkom blokovania autofagickej dráhy dochádza v bunkách k hromadeniu autofagozómov obsahujúcich nezdegradovaný materiál, ktorý pôsobí na bunky toxicky.

Pre štúdium úlohy autofágie v regulácii apoptózy indukovanej MK sme v tejto DP využili pôsobenie autofagických modulátorov bafilomycinu A1 a rapamycinu. Pomocou ich účinku sme neboli schopní u  $\beta$  buniek línie NES2Y určiť vzťah autofágie k apoptóze indukovanej pôsobením SA. Na základe detekcie aktivácie kaspáz a štiepenia proteínu PARP metódou WB sme ale ukázali, že blokácia pozdných fáz autofágie pomocou bafilomycinu A1 neovplyvňuje inhibičný efekt nenasýtenej OA na autofagický blok vyvolaný účinkom nasýtenej SA. To tiež nepriamo naznačuje, že modulácia autofagického toku sa v našom experimentálnom modeli neuplatňuje v indukcii ani v inhibícii apoptózy pôsobením MK.

U iných experimentálnych modelov aplikácia autofagických modulátorov prispela k vyriešeniu úlohy autofágie v regulácii apoptózy indukovanej MK. Aktivácia autofágie účinkom rapamycinu viedla k poklesu apoptózy indukovanej pôsobením nasýtenej PA u pokaních  $\beta$  buniek línie INS1 (Choi et al., 2009) aj u ľudských pankreatických ostrovčekov (Martino et al., 2012). Tým štúdie naznačili, že autofágia predstavuje obranný mechanizmus  $\beta$  buniek voči apoptóze indukovanej MK. Použitím chloroquine diphosphate, inhibítora autofagickej degradácie, dospeli k rovnakému záveru aj Tan et al. (2012) u myších embryonálnych buniek a HepG2 buniek.

To, že autofágia chráni bunky pred lipotoxicitou potvrdili Tan et al. (2012) aj na základe umlčania expresie esenciálneho autofagického proteínu Atg7 prostredníctvom siRNA. Odvodili to na základe zvýšenej aktivácie kaspázy 3 a štiepenia proteínu PARP, ktoré detegovali u myších embryonálnych fibroblastov a HepG2 buniek s takto inhibovanou autofágiou po pôsobení PA. U  $\beta$  buniek línie NES2Y s umlčanou expresiou Atg7 sme však zmenu v aktivácii apoptózy po aplikácii Atg7 siRNA nezaznamenali na úrovni expresie žiadnej z detegovaných kaspáz (kaspáza 2, 7, 8 a 9) a ani na úrovni hladín štiepenej formy proteínu PARP. Vzhľadom k tomu, že účasť kaspázy 3 na sprostredkovaní apoptózy indukovanej MK nebola v našom experimentálnom modeli preukázaná (Fürstová, et al., 2008), nebola jej aktivácia v tejto DP detegovaná.

Autofágia ako obranný mechanizmus buniek voči apoptóze indukovanej MK bola preukázaná aj po modulácii expresie ďalšieho esenciálneho proteínu autofágie, Atg5. Umlčanie expresie Atg5 prostredníctvom siRNA u potkaních INS1  $\beta$  buniek (Choi et al., 2009), a rovnako aj delécia Atg5 u myších embryonálnych fibroblastov (Tan et al., 2012) viedla k nárastu miery apoptózy indukovanej pôsobením nasýtenej PA.

Nezávisle na použitej metóde a skúmanom bunkovom type sa vyššie citované štúdie zhodujú v tom, že autofágia predstavuje obranný mechanizmus buniek proti apoptóze indukovanej MK, a že poškodenie jej funkcie pravdepodobne prispieva k vzniku DM2T. V rozpore s týmito výsledkami, sú ale dáta získané v tejto DP. Účinná inhibícia autofágie prostredníctvom siRNA a zníženej expresii Atg7 nemala u  $\beta$  buniek línie NES2Y vplyv na mieru indukcie apoptózy pôsobením MK. Rovnako sme nezaznamenali, ani rozdiel v inhibičnom efekte nenasýtenej OA na proapoptotický účinok SA pri ich spoločnej inkubácii. Tieto dáta naznačili, že autofágia sa u  $\beta$  buniek línie NES2Y nepodieľa na regulácii apoptózy indukovanej MK, z čoho môžeme usudzovať, že v našom experimentálnom modeli sa autofágia a apoptóza chovajú z hľadiska pôsobenia MK ako dva nezávislé mechanizmy.

Mechanizmus autofágie, reprezentujúci typ bunkovej smrti, nie je dodnes objasnený. Na základe výsledkov získaných v tejto DP nemôžeme vylúčiť, že autofagický blok vyvolaný účinkom SA nie je u  $\beta$  buniek línie NES2Y príčinou indukcie tohto typu bunkovej smrti, ktorá spoločne s apoptózou prispieva k celkovej úmrtnosti buniek po pôsobení SA. Autorka tejto DP preto navrhuje v budúcnosti porovnať vplyv pôsobenia MK na mieru úmrtnosti u  $\beta$  buniek línie NES2Y s



inhibovanou autofágiou (po aplikácii Atg7 siRNA) a u buniek s funkčnou autofágiou, napr. na základe detekcie viability u buniek farbených propidiom iodidom.

## 9 ZÁVER

V rámci tejto DP sme sledovali úlohu autofágie v regulácii apoptózy indukovanej MK u ľudskej línie  $\beta$  buniek NES2Y. Zamerali sme sa na antagonistické pôsobenie nasýtených a nenasýtených MK, ktoré bolo pozorované na tomto bunkovom modeli v prípade indukcie apoptózy.

Vzhľadom k tomu, že autofágia nebola predtým v našom laboratóriu skúmaná, prvotným cieľom práce bolo zavedenie metodiky pre štúdium autofágie. V rámci primárnych experimentov sme vytvorili protokoly pre analýzu autofágie pomocou troch nezávislých metód: (1) detekciou hladín proteínov esenciálnych pre autofágiu pomocou westernu blotu, (2) kvantifikáciou AVOs u buniek farbených AO pomocou prietokovej cytometrie a (3) vizualizáciou autofagozómov pomocou konfokálnej mikroskopie. Zároveň sme za použitia týchto metód zistili, že nasýtené a nenasýtené MK majú v prípade regulácie autofágie, rovnako ako aj pri indukcii apoptózy, antagonistické účinky.

Vplyv MK na autofagický tok sme stanovili na základe použitia inhibítora degradačných fáz autofágie, bafilomycin A1. Experimentami sme zistili, že zatiaľ čo nasýtená SA spôsobuje u  $\beta$  buniek línie NES2Y autofagický blok, nenasýtená OA nemá vplyv na bazálnu aktivitu autofágie. Nenasýtená OA preukázala pri spoločnej inkubácii s nasýtenou SA schopnosť inhibovať autofagický blok vyvolaný účinkom nasýtenej SA. V prípade proteínu p62 sme preukázali, že u  $\beta$  buniek línie NES2Y je len v malej miere degradovaný autofagickou dráhou.

Úlohu autofágie v regulácii apoptózy po pôsobení MK sme sledovali u buniek s modifikovanou autofágiou (1) aplikáciou autofagických modulátorov a (2) umlčaním esenciálneho autofagického proteínu prostredníctvom siRNA. Aplikácia autofagických modulátorov bafilomycinu A1 a rapamycinu neumožnila v našom experimentálnom systéme vysvetliť skúmanú problematiku. Napriek tomu experimenty naznačili, že kináza mTOR1 sa u  $\beta$  buniek línie NES2Y nezúčastňuje na regulácii bazálnej autofágie, a rovnako ani autofágie aktivovanej pôsobením MK. Použitím bafilomycinu A1 sme ukázali, že inhibičný efekt OA na autofagický blok vyvolaný účinkom SA pri ich spoločnej inkubácii sa pravdepodobne nepodieľa na regulácii apoptózy indukovanej nasýtenou SA. Na základe inaktivácie autofágie umlčaním expresie esenciálneho autofagického proteínu Atg7 sme preukázali, že autofágia sa u ľudských  $\beta$  buniek línie NES2Y neuplatňuje na regulácii apoptózy indukovanej MK.

# 10 POUŽITÁ LITERATÚRA

- Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N.T.** (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology* 182, 685-701.
- Barth, S., Glick, D., and Macleod, K.F.** (2010). Autophagy: assays and artifacts. *The Journal of pathology* 221, 117-124.
- Basciani, S., Vona, R., Matarrese, P., Ascione, B., Mariani, S., Cauda, R., Gnessi, L., Malorni, W., Straface, E., and Lucia, M.B.** (2007). Imatinib interferes with survival of multi drug resistant Kaposi's sarcoma cells. *FEBS letters* 581, 5897-5903.
- Beeharry, N., Chambers, J.A., and Green, I.C.** (2004). Fatty acid protection from palmitic acid-induced apoptosis is lost following PI3-kinase inhibition. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 9, 599-607.
- Bernales, S., Schuck, S., and Walter, P.** (2007). ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic reticulum. *Autophagy* 3, 285-287.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H., and Johansen, T.** (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *The Journal of cell biology* 171, 603-614.
- Boland, B., Kumar, A., Lee, S., Platt, F.M., Wegiel, J., Yu, W.H., and Nixon, R.A.** (2008). Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 6926-6937.
- Bouchier-Hayes, L., and Green, D.R.** (2012). Caspase-2: the orphan caspase. *Cell death and differentiation* 19, 51-57.
- Bouchier-Hayes, L., Oberst, A., McStay, G.P., Connell, S., Tait, S.W., Dillon, C.P., Flanagan, J.M., Beere, H.M., and Green, D.R.** (2009). Characterization of cytoplasmic caspase-2 activation by induced proximity. *Molecular cell* 35, 830-840.
- Bratton, S.B., and Cohen, G.M.** (2001). Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? *Trends in pharmacological sciences* 22, 306-315.
- Brookheart, R.T., Michel, C.I., and Schaffer, J.E.** (2009). As a matter of fat. *Cell metabolism* 10, 9-12.
- Brown, E.J., Albers, M.W., Shin, T.B., Ichikawa, K., Keith, C.T., Lane, W.S., and Schreiber, S.L.** (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369, 756-758.
- Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., and Butler, P.C.** (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102-110.
- Carlsson, C., Borg, L.A., and Welsh, N.** (1999). Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vitro. *Endocrinology* 140, 3422-3428.
- Castino, R., Davies, J., Beaucourt, S., Isidoro, C., and Murphy, D.** (2005). Autophagy is a prosurvival mechanism in cells expressing an autosomal dominant familial neurohypophyseal diabetes insipidus mutant vasopressin transgene. *FASEB journal : The official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 1021-1023.
- Cnop, M., Hannaert, J.C., Hoorens, A., Eizirik, D.L., and Pipeleers, D.G.** (2001). Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation.

Diabetes 50, 1771-1777.

**Cuervo, A.M., and Macian, F.** (2012). Autophagy, nutrition and immunology. *Molecular aspects of medicine* 33, 2-13.

**de Bruin, E.C., and Medema, J.P.** (2008). Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer treatment reviews* 34, 737-749.

**Dhayal, S., Welters, H.J., and Morgan, N.G.** (2008). Structural requirements for the cytoprotective actions of mono-unsaturated fatty acids in the pancreatic beta-cell line, BRIN-BD11. *British journal of pharmacology* 153, 1718-1727.

**Diakogiannaki, E., Dhayal, S., Childs, C.E., Calder, P.C., Welters, H.J., and Morgan, N.G.** (2007). Mechanisms involved in the cytotoxic and cytoprotective actions of saturated versus monounsaturated long-chain fatty acids in pancreatic beta-cells. *The Journal of endocrinology* 194, 283-291.

**Diakogiannaki, E., Welters, H.J., and Morgan, N.G.** (2008). Differential regulation of the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic beta-cells exposed to long-chain saturated and monounsaturated fatty acids. *The Journal of endocrinology* 197, 553-563.

**Ding, W.X., Ni, H.M., Gao, W., Yoshimori, T., Stolz, D.B., Ron, D., and Yin, X.M.** (2007). Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *The American journal of pathology* 171, 513-524.

**Dumit, V.I., and Dengjel, J.** (2012). Autophagosomal protein dynamics and influenza virus infection. *Frontiers in immunology* 3, 43.

**Ebato, C., Uchida, T., Arakawa, M., Komatsu, M., Ueno, T., Komiya, K., Azuma, K., Hirose, T., Tanaka, K., Kominami, E., et al.** (2008). Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell metabolism* 8, 325-332.

**Ehrlichova, M., Koc, M., Truksa, J., Naldova, Z., Vaclavikova, R., and Kovarr, J.** (2005). Cell death induced by taxanes in breast cancer cells: cytochrome C is released in resistant but not in sensitive cells. *Anticancer research* 25, 4215-4224.

**Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.U., and Kimchi, A.** (2009). Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell death and differentiation* 16, 966-975.

**Eitel, K., Staiger, H., Brendel, M.D., Brandhorst, D., Bretzel, R.G., Haring, H.U., and Kellerer, M.** (2002). Different role of saturated and unsaturated fatty acids in beta-cell apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* 299, 853-856.

**Eitel, K., Staiger, H., Rieger, J., Mischak, H., Brandhorst, H., Brendel, M.D., Bretzel, R.G., Haring, H.U., and Kellerer, M.** (2003). Protein kinase C delta activation and translocation to the nucleus are required for fatty acid-induced apoptosis of insulin-secreting cells. *Diabetes* 52, 991-997.

**Eizirik, D.L., Cardozo, A.K., and Cnop, M.** (2008). The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocrine reviews* 29, 42-61.

**Fadeel, B., and Orrenius, S.** (2005). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Journal of Internal Medicine* 258, 479-517.

**Fass, E., Shvets, E., Degani, I., Hirschberg, K., and Elazar, Z.** (2006). Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes. *The Journal of biological chemistry* 281, 36303-36316.

**Fingar, D.C., and Blenis, J.** (2004). Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 23, 3151-3171.

**Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T., and Yoshimori, T.** (2008). The Atg16L Complex Specifies the Site of LC3 Lipidation for Membrane Biogenesis in Autophagy. *Molecular*

Biology of the Cell 19, 2092-2100.

**Furstova, V., Kopska, T., James, R.F., and Kovar, J.** (2008). Comparison of the effect of individual saturated and unsaturated fatty acids on cell growth and death induction in the human pancreatic beta-cell line NES2Y. *Life sciences* 82, 684-691.

**Galluzzi, L., Morselli, E., Vicencio, J.M., Kepp, O., Joza, N., Tajeddine, N., and Kroemer, G.** (2008). Life, death and burial: multifaceted impact of autophagy. *Biochemical Society transactions* 36, 786-790.

**Galluzzi, L., Vicencio, J.M., Kepp, O., Tasdemir, E., Maiuri, M.C., and Kroemer, G.** (2008). To die or not to die: that is the autophagic question. *Current molecular medicine* 8, 78-91.

**Ganley, I.G., Lam du, H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., and Jiang, X.** (2009). ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *The Journal of biological chemistry* 284, 12297-12305.

**Gazdar, A.F., Carney, D.N., Russell, E.K., Sims, H.L., Baylin, S.B., Bunn, P.A., Jr., Guccion, J.G., and Minna, J.D.** (1980). Establishment of continuous, clonable cultures of small-cell carcinoma of lung which have amine precursor uptake and decarboxylation cell properties. *Cancer research* 40, 3502-3507.

**Gordon, P.B., Hoyvik, H., and Seglen, P.O.** (1992). Prelysosomal and lysosomal connections between autophagy and endocytosis. *The Biochemical journal* 283 ( Pt 2), 361-369.

**Gump, J.M., and Thorburn, A.** (2011). Autophagy and apoptosis: what is the connection? *Trends in cell biology* 21, 387-392.

**Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K., and Lippincott-Schwartz, J.** (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141, 656-667.

**Hamaguchi, K., Gaskins, H.R., and Leiter, E.H.** (1991). NIT-1, a pancreatic beta-cell line established from a transgenic NOD/Lt mouse. *Diabetes* 40, 842-849.

**Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S., Natsume, T., Guan, J.L., and Mizushima, N.** (2008). FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *The Journal of cell biology* 181, 497-510.

**Hartley, T., Brumell, J., and Volchuk, A.** (2009). Emerging roles for the ubiquitin-proteasome system and autophagy in pancreatic beta-cells. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 296, E1-10.

**He, C., and Klionsky, D.J.** (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics* 43, 67-93.

**Hennige, A.M., Ranta, F., Heinzemann, I., Dufer, M., Michael, D., Braumuller, H., Lutz, S.Z., Lammers, R., Drews, G., Bosch, F., et al.** (2010). Overexpression of kinase-negative protein kinase Cdelta in pancreatic beta-cells protects mice from diet-induced glucose intolerance and beta-cell dysfunction. *Diabetes* 59, 119-127.

**Hershko, A., and Ciechanover, A.** (1998). The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry* 67, 425-479.

**Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., et al.** (2009b). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* 20, 1981-1991.

**Hosokawa, N., Sasaki, T., Iemura, S., Natsume, T., Hara, T., and Mizushima, N.** (2009a). Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy* 5, 973-979.

**Chen, Y., Azad, M.B., and Gibson, S.B.** (2010). Methods for detecting autophagy and determining

autophagy-induced cell death This review is one of a selection of papers published in a Special Issue on Oxidative Stress in Health and Disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 88, 285-295.

**Chen, Y., Chen, H., Rhoad, A.E., Warner, L., Caggiano, T.J., Failli, A., Zhang, H., Hsiao, C.L., Nakanishi, K., and Molnar-Kimber, K.L.** (1994). A putative sirolimus (rapamycin) effector protein. *Biochemical and biophysical research communications* 203, 1-7.

**Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S.J., and Gibson, S.B.** (2007). Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species. *J Cell Sci* 120, 4155-4166.

**Chick, W.L., Warren, S., Chute, R.N., Like, A.A., Lauris, V., and Kitchen, K.C.** (1977). A transplantable insulinoma in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 628-632.

**Chiu, M.I., Katz, H., and Berlin, V.** (1994). RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 12574-12578.

**Choi, S.E., Kim, H.E., Shin, H.C., Jang, H.J., Lee, K.W., Kim, Y., Kang, S.S., Chun, J., and Kang, Y.** (2007). Involvement of Ca<sup>2+</sup>-mediated apoptotic signals in palmitate-induced MIN6N8a beta cell death. *Molecular and cellular endocrinology* 272, 50-62.

**Choi, S.E., Lee, S.M., Lee, Y.J., Li, L.J., Lee, S.J., Lee, J.H., Kim, Y., Jun, H.S., Lee, K.W., and Kang, Y.** (2009). Protective role of autophagy in palmitate-induced INS-1 beta-cell death. *Endocrinology* 150, 126-134.

**Chowdhury, I., Tharakan, B., and Bhat, G.K.** (2008). Caspases - an update. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 151, 10-27.

**Ichimura, Y., Kumanomidou, T., Sou, Y.S., Mizushima, T., Ezaki, J., Ueno, T., Kominami, E., Yamane, T., Tanaka, K., and Komatsu, M.** (2008). Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *The Journal of biological chemistry* 283, 22847-22857.

**Inbal, B., Bialik, S., Sabanay, I., Shani, G., and Kimchi, A.** (2002). DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *The Journal of cell biology* 157, 455-468.

**Iwata, J.-i., Ezaki, J., Komatsu, M., Yokota, S., Ueno, T., Tanida, I., Chiba, T., Tanaka, K., and Kominami, E.** (2006). Excess Peroxisomes Are Degraded by Autophagic Machinery in Mammals. *Journal of Biological Chemistry* 281, 4035-4041.

**Jager, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., and Eskelinen, E.L.** (2004). Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci* 117, 4837-4848.

**Jahreiss, L., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C.** (2008). The Itinerary of Autophagosomes: From Peripheral Formation to Kiss-and-Run Fusion with Lysosomes. *Traffic* 9, 574-587.

**Jung, H.S., Chung, K.W., Won Kim, J., Kim, J., Komatsu, M., Tanaka, K., Nguyen, Y.H., Kang, T.M., Yoon, K.H., Kim, J.W., et al.** (2008). Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell metabolism* 8, 318-324.

**Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.H., Kim, Y.M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D.H.** (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 20, 1992-2003.

**Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T.** (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 19, 5720-5728.

**Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T.**

(2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* *117*, 2805-2812.

**Kahn, S.E., Hull, R.L., and Utzschneider, K.M.** (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* *444*, 840-846.

**Kaniuk, N.A., Kiraly, M., Bates, H., Vranic, M., Volchuk, A., and Brumell, J.H.** (2007). Ubiquitinated-protein aggregates form in pancreatic beta-cells during diabetes-induced oxidative stress and are regulated by autophagy. *Diabetes* *56*, 930-939.

**Karaskov, E., Scott, C., Zhang, L., Teodoro, T., Ravazzola, M., and Volchuk, A.** (2006). Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis. *Endocrinology* *147*, 3398-3407.

**Kaushik, S., Singh, R., and Cuervo, A.M.** (2010). Autophagic pathways and metabolic stress. *Diabetes, Obesity and Metabolism* *12*, 4-14.

**Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R.** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* *26*, 239-257.

**Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R.** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* *26*, 239-257.

**Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T.** (2007). Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* *3*, 452-460.

**Klionsky, D.J.** (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature reviews. Molecular cell biology* *8*, 931-937.

**Klionsky, D.J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D.K., Aliev, G., Askew, D.S., Baba, M., Baehrecke, E.H., Bahr, B.A., Ballabio, A., et al.** (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* *4*, 151-175.

**Koga, H., Kaushik, S., and Cuervo, A.M.** (2010). Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *24*, 3052-3065.

**Komatsu, M., and Ichimura, Y.** (2010). Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS letters* *584*, 1374-1378.

**Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., et al.** (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *The Journal of cell biology* *169*, 425-434.

**Komiya, K., Uchida, T., Ueno, T., Koike, M., Abe, H., Hirose, T., Kawamori, R., Uchiyama, Y., Kominami, E., Fujitani, Y., et al.** (2010). Free fatty acids stimulate autophagy in pancreatic beta-cells via JNK pathway. *Biochemical and biophysical research communications* *401*, 561-567.

**Korolchuk, V.I., Mansilla, A., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C.** (2009). Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Molecular cell* *33*, 517-527.

**Kovar, J., and Franek, F.** (1989). Growth-stimulating effect of transferrin on a hybridoma cell line: relation to transferrin iron-transporting function. *Experimental cell research* *182*, 358-369.

**Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M., and Peter, M.** (2008). Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat Cell Biol* *10*, 602-610.

**Kumar, S.** (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell death and differentiation* *14*, 32-43.

**Lagerstedt, S.A., Hinrichs, D.R., Batt, S.M., Magera, M.J., Rinaldo, P., and McConnell, J.P.** (2001).

Quantitative determination of plasma c8-c26 total fatty acids for the biochemical diagnosis of nutritional and metabolic disorders. *Molecular genetics and metabolism* 73, 38-45.

**Las, G., Serada, S.B., Wikstrom, J.D., Twig, G., and Shirihai, O.S.** (2011). Fatty acids suppress autophagic turnover in beta-cells. *The Journal of biological chemistry* 286, 42534-42544.

**Las, G., and Shirihai, O.S.** (2010). The role of autophagy in beta-cell lipotoxicity and type 2 diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism* 12 Suppl 2, 15-19.

**Lassus, P., Opitz-Araya, X., and Lazebnik, Y.** (2002). Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science (New York, N.Y.)* 297, 1352-1354.

**Lee, G.H., Proenca, R., Montez, J.M., Carroll, K.M., Darvishzadeh, J.G., Lee, J.I., and Friedman, J.M.** (1996). Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379, 632-635.

**Leibowitz, B., and Yu, J.** (2010). Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer biology & therapy* 9, 417-422.

**Liang, C., Lee, J.S., Inn, K.S., Gack, M.U., Li, Q., Roberts, E.A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., et al.** (2008). Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol* 10, 776-787.

**Listenberger, L.L., Han, X., Lewis, S.E., Cases, S., Farese, R.V., Jr., Ory, D.S., and Schaffer, J.E.** (2003). Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 3077-3082.

**Loos, B., and Engelbrecht, A.M.** (2009). Cell death: a dynamic response concept. *Autophagy* 5, 590-603.

**Luo, S., and Rubinsztein, D.C.** (2010). Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL. *Cell death and differentiation* 17, 268-277.

**Ma, X.M., and Blenis, J.** (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10, 307-318.

**Macfarlane, W.M., Cragg, H., Docherty, H.M., Read, M.L., James, R.F., Aynsley-Green, A., and Docherty, K.** (1997). Impaired expression of transcription factor IUF1 in a pancreatic beta-cell line derived from a patient with persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy (nesidioblastosis). *FEBS letters* 413, 304-308.

**Maedler, K., Oberholzer, J., Bucher, P., Spinas, G.A., and Donath, M.Y.** (2003). Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes* 52, 726-733.

**Maedler, K., Spinas, G.A., Dyntar, D., Moritz, W., Kaiser, N., and Donath, M.Y.** (2001). Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. *Diabetes* 50, 69-76.

**Maestre, I., Jordan, J., Calvo, S., Reig, J.A., Cena, V., Soria, B., Prentki, M., and Roche, E.** (2003). Mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis induced by serum withdrawal and fatty acids in the beta-cell line INS-1. *Endocrinology* 144, 335-345.

**Magnuson, B., Ekim, B., and Fingar, D.C.** (2012). Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *The Biochemical journal* 441, 1-21.

**Mancini, M., Machamer, C.E., Roy, S., Nicholson, D.W., Thornberry, N.A., Casciola-Rosen, L.A., and Rosen, A.** (2000). Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *The Journal of cell biology* 149, 603-612.

**Martino, L., Masini, M., Novelli, M., Befly, P., Bugliani, M., Marselli, L., Masiello, P., Marchetti, P., and De Tata, V.** (2012). Palmitate Activates Autophagy in INS-1E  $\beta$ -Cells and in Isolated Rat and



Human Pancreatic Islets. PLoS ONE 7, e36188.

**Masiello, P.** (2006). Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic beta-cell mass. The international journal of biochemistry & cell biology 38, 873-893.

**Masini, M., Bugliani, M., Lupi, R., del Guerra, S., Boggi, U., Filipponi, F., Marselli, L., Masiello, P., and Marchetti, P.** (2009). Autophagy in human type 2 diabetes pancreatic beta cells. Diabetologia 52, 1083-1086.

**McClenaghan, N.H., and Flatt, P.R.** (1999). Engineering cultured insulin-secreting pancreatic B-cell lines. J Mol Med (Berl) 77, 235-243.

**Mei, S., Ni, H.M., Manley, S., Bockus, A., Kassel, K.M., Luyendyk, J.P., Copple, B.L., and Ding, W.X.** (2011). Differential roles of unsaturated and saturated fatty acids on autophagy and apoptosis in hepatocytes. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 339, 487-498.

**Miyazaki, J., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y., and Yamamura, K.** (1990). Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. Endocrinology 127, 126-132.

**Mizushima, N.** (2004). Methods for monitoring autophagy. The international journal of biochemistry & cell biology 36, 2491-2502.

**Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J.** (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. Nature 451, 1069-1075.

**Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T.** (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. The Journal of cell biology 152, 657-668.

**Moffitt, J.H., Fielding, B.A., Evershed, R., Berstan, R., Currie, J.M., and Clark, A.** (2005). Adverse physicochemical properties of tripalmitin in beta cells lead to morphological changes and lipotoxicity in vitro. Diabetologia 48, 1819-1829.

**Musilkova, J., and Kovar, J.** (2001). Additive stimulatory effect of extracellular calcium and potassium on non-transferrin ferric iron uptake by HeLa and K562 cells. Biochimica et biophysica acta 1514, 117-126.

**Nemcova-Furstova, V., Balusikova, K., Sramek, J., James, R.F., and Kovar, J.** (2013). Caspase-2 and JNK Activated by Saturated Fatty Acids are Not Involved in Apoptosis Induction but Modulate ER Stress in Human Pancreatic beta-cells. Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology 31, 277-289.

**Nemcova-Furstova, V., James, R.F., and Kovar, J.** (2011). Inhibitory effect of unsaturated fatty acids on saturated fatty acid-induced apoptosis in human pancreatic beta-cells: activation of caspases and ER stress induction. Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology 27, 525-538.

**Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y., and Shimizu, S.** (2009). Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. Nature 461, 654-658.

**Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., et al.** (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. Molecular and cellular biology 26, 9220-9231.

**Ohsumi, Y.** (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. Nature reviews. Molecular cell biology 2, 211-216.

**Olokoba, A.B., Obateru, O.A., and Olokoba, L.B.** (2012). Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. Oman medical journal 27, 269-273.

- O'Reilly, L.A., Ekert, P., Harvey, N., Marsden, V., Cullen, L., Vaux, D.L., Hacker, G., Magnusson, C., Pakusch, M., Cecconi, F., et al.** (2002). Caspase-2 is not required for thymocyte or neuronal apoptosis even though cleavage of caspase-2 is dependent on both Apaf-1 and caspase-9. *Cell death and differentiation* *9*, 832-841.
- Orenstein, S.J., and Cuervo, A.M.** (2010). Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Seminars in cell & developmental biology* *21*, 719-726.
- Paglin, S., Hollister, T., Delohery, T., Hackett, N., McMahon, M., Sphicas, E., Domingo, D., and Yahalom, J.** (2001). A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer research* *61*, 439-444.
- Park, H.H., Lo, Y.C., Lin, S.C., Wang, L., Yang, J.K., and Wu, H.** (2007). The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annual review of immunology* *25*, 561-586.
- Periyasamy-Thandavan, S., Jiang, M., Schoenlein, P., and Dong, Z.** (2009). Autophagy: molecular machinery, regulation, and implications for renal pathophysiology. *American journal of physiology. Renal physiology* *297*, F244-256.
- Peter, M.E., and Krammer, P.H.** (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell death and differentiation* *10*, 26-35.
- Piro, S., Anello, M., Di Pietro, C., Lizzio, M.N., Patane, G., Rabuazzo, A.M., Vigneri, R., Purrello, M., and Purrello, F.** (2002). Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress. *Metabolism: clinical and experimental* *51*, 1340-1347.
- Polak, P., and Hall, M.N.** (2009). mTOR and the control of whole body metabolism. *Current opinion in cell biology* *21*, 209-218.
- Qian, W., Liu, J., Jin, J., Ni, W., and Xu, W.** (2007). Arsenic trioxide induces not only apoptosis but also autophagic cell death in leukemia cell lines via up-regulation of Beclin-1. *Leukemia research* *31*, 329-339.
- Qu, X., Zou, Z., Sun, Q., Luby-Phelps, K., Cheng, P., Hogan, R.N., Gilpin, C., and Levine, B.** (2007). Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* *128*, 931-946.
- Quan, W., Hur, K.Y., Lim, Y., Oh, S.H., Lee, J.C., Kim, K.H., Kim, G.H., Kim, S.W., Kim, H.L., Lee, M.K., et al.** (2012). Autophagy deficiency in beta cells leads to compromised unfolded protein response and progression from obesity to diabetes in mice. *Diabetologia* *55*, 392-403.
- Raben, N., Hill, V., Shea, L., Takikita, S., Baum, R., Mizushima, N., Ralston, E., and Plotz, P.** (2008). Suppression of autophagy in skeletal muscle uncovers the accumulation of ubiquitinated proteins and their potential role in muscle damage in Pompe disease. *Human molecular genetics* *17*, 3897-3908.
- Ravassard, P., Hazhouz, Y., Pechberty, S., Bricout-Neveu, E., Armanet, M., Czernichow, P., and Scharfmann, R.** (2011). A genetically engineered human pancreatic beta cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *The Journal of clinical investigation* *121*, 3589-3597.
- Ravikumar, B., Duden, R., and Rubinsztein, D.C.** (2002). Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Human molecular genetics* *11*, 1107-1117.
- Ravikumar, B., Moreau, K., and Rubinsztein, D.C.** (2010). Plasma membrane helps autophagosomes grow. *Autophagy* *6*, 1184-1186.
- Rieux-Laucat, F., Fischer, A., and Deist, F.L.** (2003). Cell-death signaling and human disease. *Current opinion in immunology* *15*, 325-331.
- Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoege, C., and Jentsch, S.** (2005). A series of ubiquitin

binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell* 120, 73-84.

**Rubinsztein, D.C., Cuervo, A.M., Ravikumar, B., Sarkar, S., Korolchuk, V., Kaushik, S., and Klionsky, D.J.** (2009). In search of an "autophagometer". *Autophagy* 5, 585-589.

**Sabatini, D.M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., and Snyder, S.H.** (1994). RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78, 35-43.

**Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C.C., Cannizzo, E.S., Scharf, B., Follenzi, A., Potolicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A.M., and Santambrogio, L.** (2011). Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Developmental cell* 20, 131-139.

**Salvesen, G.S.** (2002). Caspases and apoptosis. *Essays in biochemistry* 38, 9-19.

**Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., and Sabatini, D.M.** (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular cell* 22, 159-168.

**Shi, Y.** (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular cell* 9, 459-470.

**Shvets, E., Fass, E., and Elazar, Z.** (2008). Utilizing flow cytometry to monitor autophagy in living mammalian cells. *Autophagy* 4, 621-628.

**Schutze, S., Tchikov, V., and Schneider-Brachert, W.** (2008). Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 655-662.

**Schweers, R.L., Zhang, J., Randall, M.S., Loyd, M.R., Li, W., Dorsey, F.C., Kundu, M., Opferman, J.T., Cleveland, J.L., Miller, J.L., et al.** (2007). NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 19500-19505.

**Schworer, C.M., and Mortimore, G.E.** (1979). Glucagon-induced autophagy and proteolysis in rat liver: mediation by selective deprivation of intracellular amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 3169-3173.

**Singh, R., and Cuervo, A.M.** (2011). Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell metabolism* 13, 495-504.

**Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., and Czaja, M.J.** (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458, 1131-1135.

**Sinha, S., and Levine, B.** (2008). The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene* 27 *Suppl 1*, S137-148.

**Soldani, C., and Scovassi, A.I.** (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 7, 321-328.

**Sou, Y.-s., Waguri, S., Iwata, J.-i., Ueno, T., Fujimura, T., Hara, T., Sawada, N., Yamada, A., Mizushima, N., Uchiyama, Y., et al.** (2008). The Atg8 Conjugation System Is Indispensable for Proper Development of Autophagic Isolation Membranes in Mice. *Molecular Biology of the Cell* 19, 4762-4775.

**Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., and Samali, A.** (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 7, 880-885.

**Takeuchi, H., Kondo, Y., Fujiwara, K., Kanzawa, T., Aoki, H., Mills, G.B., and Kondo, S.** (2005). Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer research* 65, 3336-3346.

- Tamai, M., Matsumoto, K., Omura, S., Koyama, I., Ozawa, Y., and Hanada, K.** (1986). In vitro and in vivo inhibition of cysteine proteinases by EST, a new analog of E-64. *Journal of pharmacobiodynamics* 9, 672-677.
- Tamai, M., Yokoo, C., Murata, M., Oguma, K., Sota, K., Sato, E., and Kanaoka, Y.** (1987). Efficient synthetic method for ethyl (+)-(2S,3S)-3-[(S)-3-methyl- 1-(3-methylbutylcarbamoyl)butylcarbamoyl]-2-oxiranecarboxylate (EST), a new inhibitor of cysteine proteinases. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 35, 1098-1104.
- Tan, S.H., Shui, G., Zhou, J., Li, J.J., Bay, B.H., Wenk, M.R., and Shen, H.M.** (2012). Induction of autophagy by palmitic acid via protein kinase C-mediated signaling pathway independent of mTOR (mammalian target of rapamycin). *The Journal of biological chemistry* 287, 14364-14376.
- Tanemura, M., Ohmura, Y., Deguchi, T., Machida, T., Tsukamoto, R., Wada, H., Kobayashi, S., Marubashi, S., Eguchi, H., Ito, T., et al.** (2012). Rapamycin causes upregulation of autophagy and impairs islets function both in vitro and in vivo. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 12, 102-114.
- Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., and Kominami, E.** (2005). Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* 1, 84-91.
- Tanida, I., Sou, Y.-s., Ezaki, J., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., and Kominami, E.** (2004). HsAtg4B/HsApg4B/Autophagin-1 Cleaves the Carboxyl Termini of Three Human Atg8 Homologues and Delipidates Microtubule-associated Protein Light Chain 3- and GABAA Receptor-associated Protein-Phospholipid Conjugates. *Journal of Biological Chemistry* 279, 36268-36276.
- Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Komatsu, M., Ueno, T., and Kominami, E.** (2002). Human Apg3p/Aut1p Homologue Is an Authentic E2 Enzyme for Multiple Substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and Facilitates the Conjugation of hApg12p to hApg5p. *Journal of Biological Chemistry* 277, 13739-13744.
- Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Ueno, T., and Kominami, E.** (2001). The Human Homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p Is a Protein-activating Enzyme for Multiple Substrates Including Human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *Journal of Biological Chemistry* 276, 1701-1706.
- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J., and Lenzen, S.** (1997). Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46, 1733-1742.
- Walker, S., Chandra, P., Manifava, M., Axe, E., and Ktistakis, N.T.** (2008). Making autophagosomes: localized synthesis of phosphatidylinositol 3-phosphate holds the clue. *Autophagy* 4, 1093-1096.
- Wang, Q.J., Ding, Y., Kohtz, D.S., Mizushima, N., Cristea, I.M., Rout, M.P., Chait, B.T., Zhong, Y., Heintz, N., and Yue, Z.** (2006). Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 8057-8068.
- Webber, J.L., and Tooze, S.A.** (2010). New insights into the function of Atg9. *FEBS letters* 584, 1319-1326.
- Welters, H.J., Tadayyon, M., Scarpello, J.H., Smith, S.A., and Morgan, N.G.** (2004). Mono-unsaturated fatty acids protect against beta-cell apoptosis induced by saturated fatty acids, serum withdrawal or cytokine exposure. *FEBS letters* 560, 103-108.
- Wirawan, E., Vande Walle, L., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I., Roelandt, R., De Rycke, R., Verspurten, J., Declercq, W., et al.** (2010). Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell death & disease* 1, e18.
- Wrede, C.E., Dickson, L.M., Lingohr, M.K., Briaud, I., and Rhodes, C.J.** (2002). Protein kinase B/Akt prevents fatty acid-induced apoptosis in pancreatic beta-cells (INS-1). *The Journal of biological chemistry* 277, 49676-49684.

- Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., and Tashiro, Y.** (1998). Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell structure and function* 23, 33-42.
- Yan, Y., Flinn, R.J., Wu, H., Schnur, R.S., and Backer, J.M.** (2009). hVps15, but not Ca<sup>2+</sup>/CaM, is required for the activity and regulation of hVps34 in mammalian cells. *The Biochemical journal* 417, 747-755.
- Yang, W., Monroe, J., Zhang, Y., George, D., Bremer, E., and Li, H.** (2006). Proteasome inhibition induces both pro- and anti-cell death pathways in prostate cancer cells. *Cancer letters* 243, 217-227.
- Yang, Z., and Klionsky, D.J.** (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current opinion in cell biology* 22, 124-131.
- Yokoyama, T., Miyazawa, K., Naito, M., Toyotake, J., Tauchi, T., Itoh, M., Yuo, A., Hayashi, Y., Georgescu, M.M., Kondo, Y., et al.** (2008). Vitamin K2 induces autophagy and apoptosis simultaneously in leukemia cells. *Autophagy* 4, 629-640.
- Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E.H., and Lenardo, M.J.** (2004). Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science (New York, N.Y.)* 304, 1500-1502.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M.** (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
- Zhivotovsky, B.** (2003). Caspases: the enzymes of death. *Essays in biochemistry* 39, 25-40.
- Zhou, H., and Huang, S.** (2010). The complexes of mammalian target of rapamycin. *Current protein & peptide science* 11, 409-424.
- Zhu, Y., Zhao, L., Liu, L., Gao, P., Tian, W., Wang, X., Jin, H., Xu, H., and Chen, Q.** (2010). Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis. *Protein & cell* 1, 468-477