

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Indukce a detekce autofagie *in vitro*
Bakalářská práce

2020

Adéla Lhotová

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Autophagy Induction and Detection *in vitro*
Bachelor Thesis

2020

Adéla Lhotová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Adéla Lhotová**
Osobní číslo: **C17186**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Indukce a detekce autofagie *in vitro***
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte literární ročční na téma indukce a detekce autofagie *in vitro*. V úvodní části textu bakalářské práce charakterizujte proces autofagie a shrňte jeho význam pro fyziologické fungování organismu. Dále uveďte, jakým způsobem lze procesy autofagie klasifikovat a zaměřte se na popis signálních drah zapojených do těchto procesů.
- 2) V hlavní části bakalářské práce se zaměřte na popis způsobů a mechanismů indukce buněčné autofagie při modelovém testování *in vitro*. Zároveň také charakterizujte, jakými způsoby lze autofagii detekovat a vyzdvihněte, jaký význam má studium procesu autofagie *in vitro*. V neposlední řadě se zaměřte na shrnutí onemocnění, která jsou s poruchou autofagie spojena.
- 3) Jako zdroj informací pro zpracování kompilačního textu, bakalářské práce využijte odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech. Jejich vyhledávání provádějte prostřednictvím elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Jiří Handl**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Jan Čapek**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 6. 2020

Adéla Lhotová

Mé poděkování patří Mgr. Jířímu Handlovi za odborné vedení, ochotu a cenné rady, které mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Děkuji také mému příteli, přátelům a rodině za trpělivost a podporu.

Anotace

Tato bakalářská práce popisuje proces autofagie včetně mechanismů její indukce a detekce. První část je věnována proteinům a proteinovým komplexům, které jsou pro tento proces nezbytné. V hlavní části práce jsou uvedeny způsoby indukce autofagie se zaměřením na *in vitro* systémy. Shrnuty jsou jak chemické, tak biologické způsoby indukce zahrnující například látky jako je lithium, trehalóza nebo metformin. V další části práce je pak charakterizována obrazová cytometrie, transmisní elektronová mikroskopie a vybrané typy imunoanalýzy, jakožto metody detekce autofagie v *in vitro* systémech. V závěrečné části práce pak následuje popis neurodegenerativních onemocnění, která souvisí s autofagií.

Klíčová slova

Autofagie, mTOR, indukce, detekce, neurodegenerativní onemocnění.

Title

Autophagy Induction and Detection *in vitro*

Annotation

This bachelor thesis is describing the process of autophagy including mechanisms of its induction and detection. The first part of the thesis is dedicated to the proteins and protein complexes that are essential for this process. In the main part the possibilities of the autophagy focusing on *in vitro* systems are introduced. Biological and chemical ways of induction including lithium, trehalose and metformin are summarized. In the next part of the thesis the methods of autophagy detection such as transmission electron microscopy, selected types of immunoanalysis and image-based cytometry are characterized in *in vitro* systems. In the final part of the thesis the neurodegenerative diseases connected with autophagy are described.

Keywords

Autophagy, mTOR, induction, detection, neurodegenerative diseases.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Znázornění mikroautofagie.....	16
Obr. 2: Průběh částečné jaderné mikroautofagie při nedostatku živin	17
Obr. 3: Znázornění působení oxidativního stresu na rozpoznání KFERQ motivu proteinu chaperonem	18
Obr. 4: Přesun, navázání a translokace proteinu, který je následně degradován lysozomálními enzymy.	20
Obr. 5: Znázornění procesu mitofagie ve vztahu k ER.....	22
Obr. 6: Autofagozom přímo fúzující s lysozomem.....	23
Obr. 7: Schéma makroautofagie, při které autofagozom fúzuje s endozomem a lysozomem.	23
Obr. 8: Podjednotky komplexu ULK1.	24
Obr. 9: Regulace komplexu ULK1	25
Obr. 10: Regulace komplexu ULK1 při nedostatku živin	26
Obr. 11: Schéma komplexu PI3KC3-C1.....	27
Obr. 12: Role konjugovaného komplexu Atg a LC3 při elongaci fagoforu	30
Obr. 13: Fúze autofagozomu s lysozomem za přítomnosti mediátorů	31
Obr. 14: Vztah lithia a inositolu.....	33
Obr. 15: Trehalóza indukující autofagii přes komplex ULK1	34
Obr. 16: Indukce autofagie metforminem.	35
Obr. 17: Schéma působení reaktivních forem kyslíku na autofagii.....	36
Obr. 18: Schéma indukce a narušení autofagie nanočásticemi	37
Obr. 19: Znázornění indukce autofagie za pomoci nukleoporinu Tpr	38
Obr. 20: Obrazy z transmisního elektronového mikroskopu.....	39
Obr. 21: Expres LC3 v kultuře buněk NIH 3T3.....	42
Obr. 22: Expres LC3 v buňkách kosterního svalu	42
Obr. 23: Schéma detekce autofagické aktivity metodou ELISA <i>in vitro</i>	44
Obr. 24: Porovnání kontrolních buněk a buněk, kde došlo k indukci autofagie nedostatkem živin nebo rapamycinem	45
Obr. 25: Schéma fluorescenčního obrazového cytometru	45

OBSAH

ÚVOD.....	15
1 Autofagie	16
1.1 Mikroautofagie.....	16
1.2 Autofagie zprostředkovaná chaperony	17
1.3 Makroautofagie.....	20
1.3.1 Iniclace	22
1.3.2 Nukleace	26
1.3.3 Elongace	29
1.3.4 Maturace	30
2 Indukce autofagie	32
2.1 Lithium.....	32
2.2 Trehalóza	33
2.3 Metformin	34
2.4 Reaktivní formy kyslíku	35
2.5 Nanočástice.....	36
2.6 Autofagie indukovaná nukleoporiny.....	37
3 Detekce autofagie	38
4 Neurodegenerativní onemocnění	46
4.1 Alzheimerova choroba.....	46
4.2 Huntingtonova choroba	48
4.3 Amyotrofická laterální skleróza.....	49
5 ZÁVĚR.....	50
6 POUŽITÁ LITERATURA	51

SEZNAM ZKRATEK

AAF	faktor aktivity autofagie (<i>Autophagy Activity Factor</i>)
AD	Alzheimerova choroba (<i>Alzheimer's Disease</i>)
AKT	serin/threonin proteinová kináza B (<i>Serin/Threonin Protein Kinase B</i>)
ALS	amyotrofická laterální skleróza (<i>Amyotrophic Lateral Sclerosis</i>)
AMBRA1	aktivační molekula autofagie regulované Beclin 1 (<i>Activating Molecule in Beclin 1-Regulated Autophagy Protein 1</i>)
AMPK	proteinová kináza aktivovaná adeninmonofosfátem (<i>AMP-Activated Protein Kinase</i>)
APP	amyloidový prekurzorový protein (<i>Amyloid Precursor Protein</i>)
Atg	proteiny kódované autofagickými geny (<i>Autophagy Related Gene</i>)
ATP	adenosintrifosfát (<i>Adenosin Triphosphate</i>)
AVd	autofagická vakuola (<i>Autophagic Vacuole</i>)
AVi	autofagozom (<i>Autophagosome</i>)
BATS	sekvence cílicí na autofagozom (<i>Barkor/Atg14 Autophagosome Targeting Sequence</i>)
CA	uhličitanová dehydratáza (<i>Carbonate Dehydratase</i>)
CEBPD	transkripční faktor protein delta (<i>CCAAT/Enhancer-Binding Protein Delta</i>)
CLIP	protein na vnitřní membráně navázaný na chromozomy (<i>Chromosome-Linkage Inner Nuclear Membrane Protein</i>)
CMA	autofagie zprostředkovaná chaperony (<i>Chaperone Mediated Autophagy</i>)
CRM 1	jaderný transportní protein (<i>Chromosomal Maintenance 1</i>)
CTSD	kathepsin D (<i>cathepsin D</i>)
DFCP1	protein 1 obsahující FYVE doménu (<i>FYVE Domain-Containing Protein 1</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DRAM	modulátor autofagie regulovaný poškozením (<i>Damage-Regulated Autophagy Modulator</i>)
EF1A	eukaryotický translační faktor 1 alfa 1 (<i>Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Alpha 1</i>)

ELISA	enzymaticky značená imunosorbentová analýza (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FIP200	proteinová kináza fokální adheze (<i>Focal Adhesion Kinase Family-Interacting Protein of 200 kDa</i>)
GFAP	kyselý gliální protein (<i>Glial Fibrillary Acid Protein</i>)
GFP	zelené fluorescenční značení (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GSK-3β	glykogenová serin/threoninová kináza 3 beta (<i>Glycogen Synthase Kinase 3 Beta</i>)
GTP	guanosintrifosfát (<i>Guanosin Triphosphate</i>)
HOPS	protein třídící vakuoly (<i>hsp70-hsp90 Organizing Protein</i>)
hsc40	cytozolický šokový chaperon (<i>Heat Shock Protein 40</i>)
hsc70	cytozolický šokový chaperon 70 (<i>Heat Shock Protein 70</i>)
IMP	inositol monofosfatáza (<i>Inositol Monophosphatase</i>)
IP1	inositol monofosfát (<i>Inositol Monophosphate</i>)
IP2	inositol difosfát (<i>Inositol Bisphosphate</i>)
IP3	myo-inositol-1, 4, 5-trifosfát (<i>Myo-Inositol-1, 4, 5-Triphosphate</i>)
IPP	inositol-fosfát fosfatáza (<i>Inositol-Phosphate Phosphatase</i>)
JNK	c-Jun-N-terminální kináza (<i>c-Jun-K Terminal Kinase</i>)
KFERQ	pentapeptidový proteinový motiv Lys-Phe-Glu-Arg-Gln (<i>Protein Pentapeptide Sequence Lys-Phe-Glu-Arg-Gln</i>)
LAMP1	membránový protein asociovaný s lysozomem 1 (<i>Lysosomal-Associated Membrane Protein 1</i>)
LAMP2	membránový protein asociovaný s lysozomem 2 (<i>Lysosomal-Associated Membrane Protein 1</i>)
LAMP2A	membránový protein typu 2A asociovaný s lysozomem (<i>Lysosome-Associated Membrane Protein Type 2A</i>)
LC3	protein podobný ubiquitinu asociovaný s mikrotubuly 3 (<i>Ubiquitin-Like Protein Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3</i>)
LIMP-2	lysozomální integrální membránový protein 2 (<i>Lysosomal Integral Membrane Protein 2</i>)
MDC	monodansylkadaverin (<i>monodansylcadaverine</i>)
MFI	střední intenzita fluorescence (<i>Mean Fluorescence Activity</i>)
mi	mitochondrie (<i>mitochondria</i>)

MPTP	1-methyl-4-fenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridin (<i>1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine</i>)
mLST8	savčí smrtící protein (<i>Mammalian Lethal with Sec-13 Protein 8</i>)
mSIN1	proteinová kináza aktivovaná stresem (<i>Mammalian Stress-Activated Protein Kinase-Interacting Protein 1</i>)
mTOR	proteinová kináza citlivá na rapamycin (<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>)
NRBF2	nukleární faktor vázající se na receptor 2 (<i>Nuclear Receptor-Binding Factor 2</i>)
NRF2	nukleární faktor 2 (<i>Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2</i>)
OPTN	optineurin (<i>Optineurin</i>)
p62	sequestozom 1, protein vázající se na ubikvitin (<i>Sequestosome 1</i>)
Pacer	protein asociovaný s UVRAG (<i>Protein Associated with UVRAG as Autophagy Enhancer</i>)
PAS	preautofagozomální struktura (<i>Phagophore Assembly Site</i>)
PE	fosfatidylethanolamin (<i>Phosphatidylethanolamine</i>)
PHLPP1	proteinová fosfatáza bohatá na leucin (<i>Leucine-Rich Repeat Protein Phosphatase 1</i>)
PI3KC3	fosfatidylinositol 3-kinázová kináza třetí třídy (<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase-Related Kinase Class III</i>)
PI3KR4	podjednotka 4 fosfoinositid-3-kinázy (<i>Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 4</i>)
PI3P	fosfatidylinositol 3-fosfát (<i>Phosphatidylinositol 3-Phosphate</i>)
PINK1	regulační proteinová kináza (<i>PTEN-Induced Putative Kinase 1</i>)
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i>)
PROTOR	protein vázající rictor (<i>Protein Observed with Rictor</i>)
PSEN1	presenilin 1 (<i>Presenilin 1</i>)
PSEN2	presenilin 2 (<i>Presenilin 2</i>)
PTEN	homolog fosfatázy a tensinu (<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>)
Rab	protein, který se váže na GTP po jeho přeměně z GDP (<i>GTP/GDP-Binding Protein</i>)

RAPTOR	regulační protein asociovaný s mTOR (<i>Regulatory Associated Protein of mTOR</i>)
Rheb	homolog Ras vyskytující se v mozku (<i>Ras Homologue Enriched in Brain</i>)
RICTOR	podjednotka mTOR nezávislá na Raptor (<i>Raptor Independent Companion of mTOR</i>)
ROS	reaktivní formy kyslíku (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SCARB2	vychytávající receptor (<i>Scavenger Receptor Class B Member 2</i>)
SOD1	superoxid dismutáza (<i>Superoxide Dismutase</i>)
SQSTM1	sequestozom 1, protein vázající se na ubikvitin (<i>Sequestosome 1</i>)
Stx17	syntaxin 17 (<i>Syntaxin 17</i>)
TBK1	serin/threoninová kináza navazující se na Tank (<i>Tank-Binding Kinase</i>)
TDP-43	protein vázající se na DNA 43 kDa (<i>TAR-Binding protein 43</i>)
TEM	transmisní elektronová mikroskopie (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TIP60	histonová transferáza (<i>Histone Transferase</i>)
Tpr	komponenta komplexu jaderných pórů (<i>Translocated Promoter Region</i>)
TRAF6	faktor asociovaný s receptorem nádorové nekrózy (<i>Tumor Necrosis Receptor Associated Factor 6</i>)
ULK1	nekoordinovaná proteinová kináza (<i>Uncoordinated-51 Like Protein Kinase 1</i>)
UPS	ubikvitin-proteasomový systém (<i>Ubiquitin-Proteasome System</i>)
UVRAG	protein rezistence proti UV (<i>UV Resistance-Associated Gene</i>)
Vps15, 34	protein třídící vakuoly 15, 34 (<i>Vacuolar Protein Sorting 15, 34</i>)
WIPI	protein interagující s fosfoinositidem (<i>WD-Repeat Domain Phosphoinositide-Interacting Protein 2</i>)

ÚVOD

Cílem této práce je popsat proces autofagie, při kterém buňka natráví poškozené složky sebe samotné. Pro tento proces je charakteristické pohlcení těchto složek a jejich degradace lysozomálními enzymy. Autofagie slouží jako obrana buňky proti stresu, nedostatku živin a toxickým metabolitům. Rozlišují se tři hlavní druhy autofagie: mikroautofagie, makroautofagie a autofagie zprostředkovaná chaperony. Makroautofagie je nejrozšířenějším druhem autofagie a dělí se na čtyři fáze, kdy autofagozom postupně maturuje, dokud není dostatečně vyvinutý ke splynutí s lysozomem. Pro makroautofagii je stěžejním proteinovým komplexem mTOR, na jehož inhibici je závislý celý proces. Kromě již zmíněných způsobů indukce autofagie, může být tento proces spuštěn *in vitro* různými chemickými látkami.

K detekci autofagie byly vyvinuty různé metody, které mohou detekovat počet autofagozomů nebo aktivitu autofagie s využitím fluorescenčního značení, cytometricky nebo imunochemicky. Nejčastěji používané jsou právě metody imunochemické, jejichž výhodou je dostupnost a neustálý vývoj používaných protilátek.

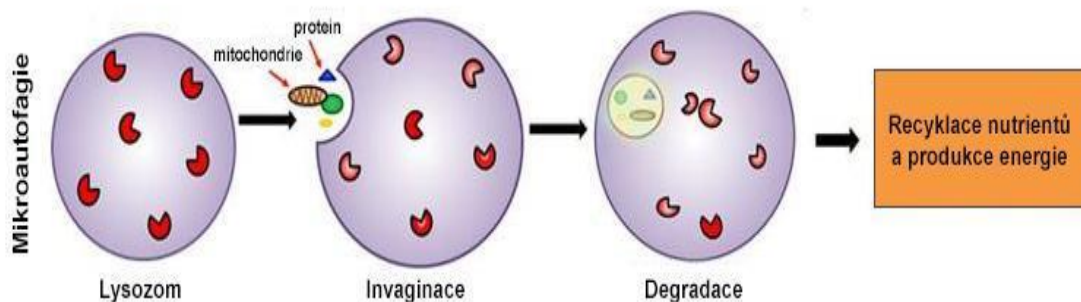
Defekty v procesu autofagie v mozku mohou vést k akumulaci nežádoucích proteinů, což může být příčina neurodegenerativního onemocnění jako je Amyotrofická laterální skleróza, Alzheimerova a Huntingtonova choroba.

1 Autofagie

Autofagie je katabolický proces, při kterém dochází k lysozomální degradaci buněčného materiálu. Rozklad poškozených cytoplazmatických proteinů a organel přispívá k udržení homeostázy a produkuje množství energie (Hönscheid, 2014; Tavakol, 2019). Podílí se na fyziologických procesech buňky, jako je degradace agregovaných a chybně složených proteinů, odstraňování dlouho žijících buněk nebo na regulaci růstu (Ravanan, 2017). Ke spuštění procesu autofagie může dojít při poškození buněčných organel a deoxyribonukleové kyseliny, při nedostatečném zásobení kyslíkem, v okamžiku, kdy na buňku působí oxidativní stres nebo je ovlivněna léčivý (Chen, 2018; Xin, 2017). Autofagii dělíme na tři druhy.

1.1 Mikroautofagie

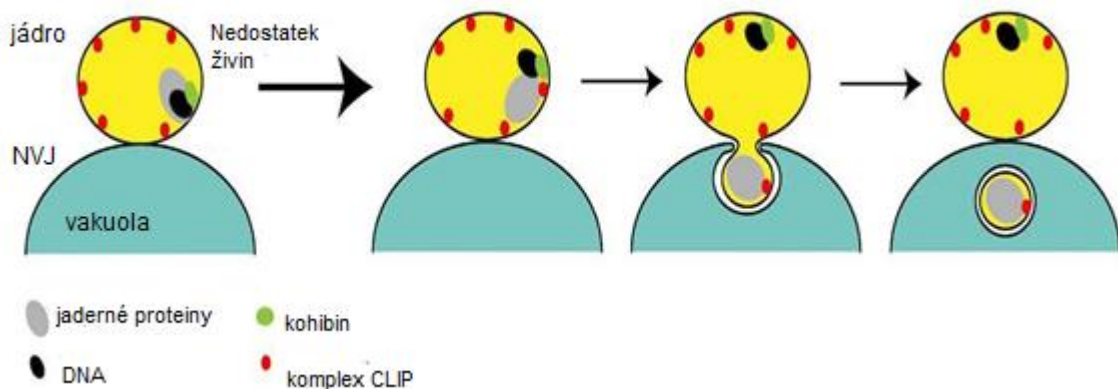
Při mikroautofagii část lysozomální membrány invaginuje, a tak se vytvoří endozom, který tímto pohltí buněčný obsah určený k degradaci. Po jeho odškrcení do lumen lysozomu ve formě malých vezikulů jsou tyto vezikuly degradovány lysozomálními enzymy i s buněčným obsahem (Obr. 1) (Ravanan, 2017). Dále se mikroautofagie dělí na mikropexofagii, mikromitofagii a částečnou jadernou mikroautofagii (Galluzzi, 2017).



Obr.1: Znárodnění mikroautofagie (upraveno dle Menikdiwela, 2020).

V procesu mikropexofagie dochází k degradaci již nepotřebných peroxizomů. V mitofagii třetího typu, tedy mikromitofagii, se vezikuly uvolňují z vnitřní i vnější mitochondriální membrány, obsahují oxidované proteiny a začleňují se do lumen lysozomu (Lemasters, 2018). Částečná jaderná

mikroautofagie je selektivní autofagický proces, který je indukován nedostatkem uhlíku a dusíku. Odpověď na tento nedostatek je regulována proteinovým komplexem citlivým na rapamycin mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) (Dawaliby, 2010). Jaderné proteiny určené pro degradaci jsou pohlceny vakuolou a v místě spojení jádra s jadernou vakuolou, dojde v invaginaci a odškrcení vakuoly s materiálem k degradaci (Obr. 2). Vždy dochází pouze k degradaci jaderných proteinů, nikoli DNA. Jejich rozlišení zajišťuje kohibin a vnitřní membránový protein navázaný na chromozomy CLIP (*Chromosome Linkage Inner Nuclear Membrane Protein*). Pokud jedna z těchto komponent v buňce chybí, nelze oddělit DNA a jaderné proteiny, proto k částečné jaderné mikroautofagii nedochází, i když je sama o sobě funkční (Verlhac, 2018).

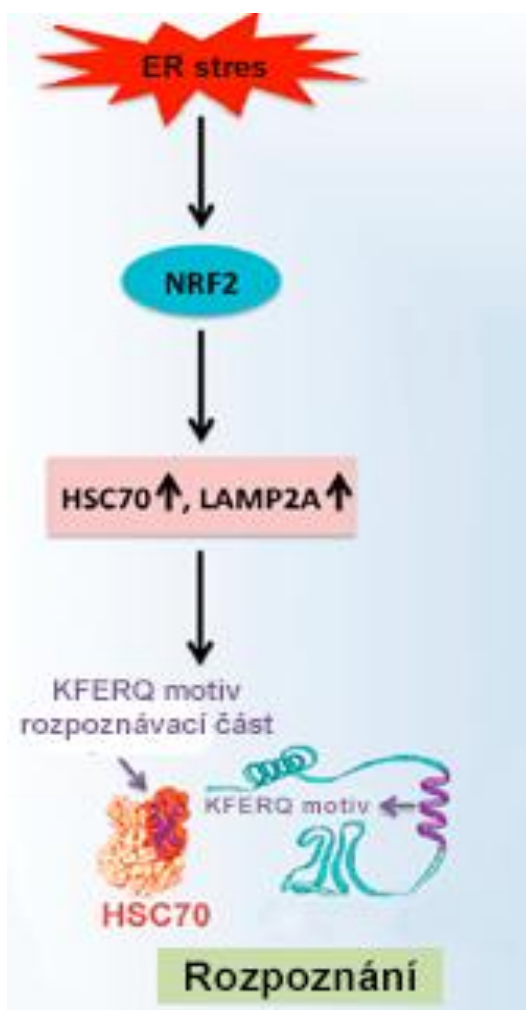


Obr. 2: Průběh částečné jaderné mikroautofagie při nedostatku živin (upraveno dle Verlhac, 2018).

1.2 Autofagie zprostředkovaná chaperony

Cytosolický chaperon hsc70 (*heat shock protein 70*) je protein, který je schopen rozpoznat specifický pentapeptid v aminokyselinovém řetězci poškozených a nefunkčních proteinů a dopravit ho k lysozomu. Na rozdíl od mikroautofagie se proteiny do lysozomu dostávají pomocí membránových protein-translokačních komplexů, s nimiž substrát tvoří translokační komplex. Následně dojde k rozvinutí proteinu a jeho degradaci pomocí lysozomálních enzymů. Autofagie zprostředkovaná chaperony (CMA) je maximálně aktivována oxidativním stresem, hypoxií, poškozením DNA a při nedostatku živin, který trvá alespoň osm až deset hodin (Juste, 2019; Tasset, 2016).

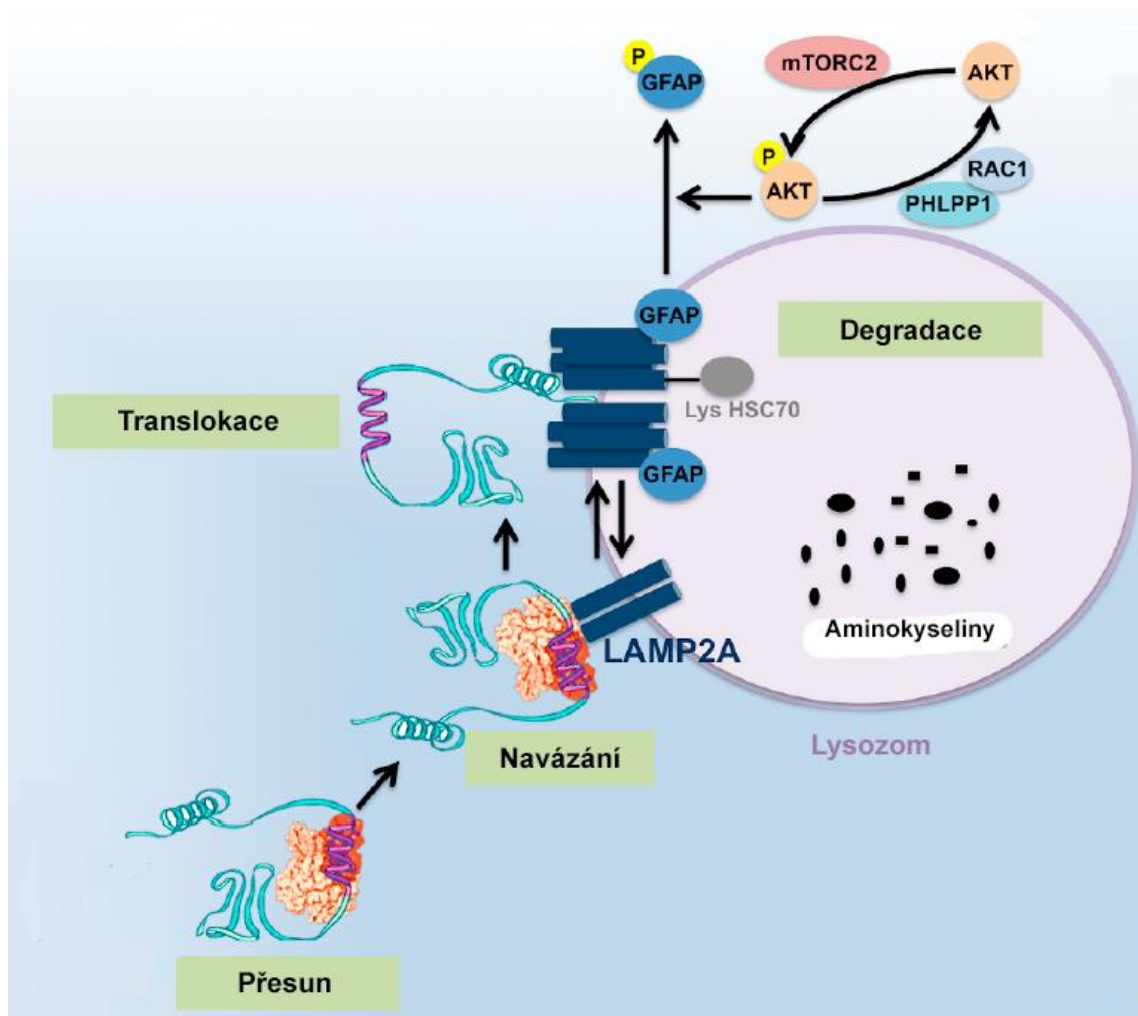
Působením oxidativního stresu začne nukleární faktor NRF2 (*Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2*) indukovat transkripci hsc70 a proteinu asociovaného s lysozomy LAMP2A (*Lysosome-associated Membrane Protein Type 2A*). Chaperon hsc70 se naváže v místě specifického pentapeptidového motivu Lys-Phe-Glu-Arg-Gln (KFERQ) na proteinu a interaguje s membránovým proteinem LAMP2A na lysozomální membráně (Ghavami, 2014). Přítomnost hsc70 na membráně lysozomu v podobě lys-hsc70 umožňuje narušení kvartérní struktury. Aktivita CMA je regulována produkcí a distribucí LAMP2A (Obr.3).



Obr. 3: Znárodnění působení oxidativního stresu na rozpoznání KFERQ motivu proteinu chaperonem. NRF2 (nukleární faktor), hsc70 (cytosolický chaperon) a LAMP2A (protein asociovaného s lysozomy) (upraveno dle Dash, 2019).

Dále se na přenosu proteinu k lysozomu podílí pomocné šokové kochaperony hsp40 (*Heat Shock Protein 40*) a HOP (*hsp70-hsp90 Organizing Protein*). Interakce s těmito kochaperony je pro aktivitu CMA nezbytná. V dalším

kroku komplex chaperonů přisedá na receptor LAMP2A na membráně lysozomu. LAMP2A přenáší protein přes membránu dovnitř lysozomu. Stabilita LAMP2A na membráně je regulována elongačním faktorem EF1A (*Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Alpha 1*), fosforylací a defosforylací gliálního kyselého proteinu GFAP (*Glial Fibrillary Acid Protein*). Stabilizační efekt GFAP je narušován asociací EF1A s guanosintrifosfátem GTP. Stejně tak inhibuje aktivitu CMA vysoká koncentrace mTORC2 v lysozomech přes AKT serin/threoninovou protein kinázu, která fosforyluje GFAP, čímž destabilizuje LAMP2A. Proteinová fosfatáza bohatá na leucin PHLPP1 (*Leucine-rich Repeat Protein Phosphatase 1*) je schopná CMA aktivovat a to defosforylací AKT. Na konci procesu autofagie zprostředkované chaperony dochází k degradaci a přeměně LAMP2A z oligomerní na monomerní strukturu (Obr. 4).



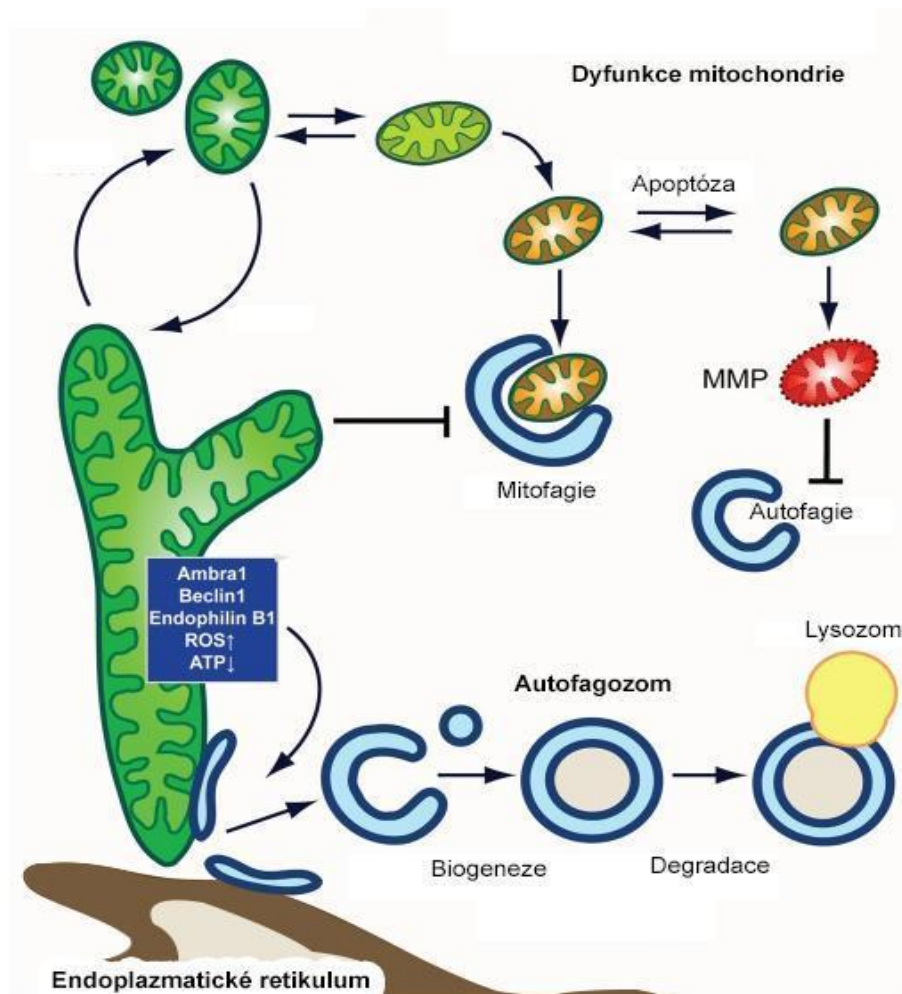
Obr. 4: Přesun, navázání a translokace proteinu, který je následně degradován lysozomálními enzymy. GFAP (stabilizační faktor), mTORC2 (savčí komplex proteinů obsahující serin/threoninovou kináza), AKT (serin/threoninová protein kináza B), PHLPP1 (proteinová fosfatáza bohatá na leucin), GFAP (gliální kyselý protein), Lys hsc70 (hsc70 na membráně lysozomu), LAMP2A (proteinu asociovaného s lysozomy) (upraveno dle Dash, 2019).

1.3 Makroautofagie

Základním znakem makroautofagie je tvorba fagoforu, z něhož maturací a zvětšováním vzniká autofagozom, což je organela (váček) s dvěma membránami schopná fúzovat s lysozomem. Tak se k autofagozomu dostanou lysozomální enzymy a dochází k degradaci jeho obsahu (Wen, 2016). Lysozomální enzymy, např. katepsiny, hydrolyticky degradují pohlcený materiál, který je dopraven do Krebsova cyklu a využit pro tvorbu ATP nebo syntézu

proteinů (Hönscheid, 2014). Podobně jako u mikroautofagie, existuje několik typů makroautofagie.

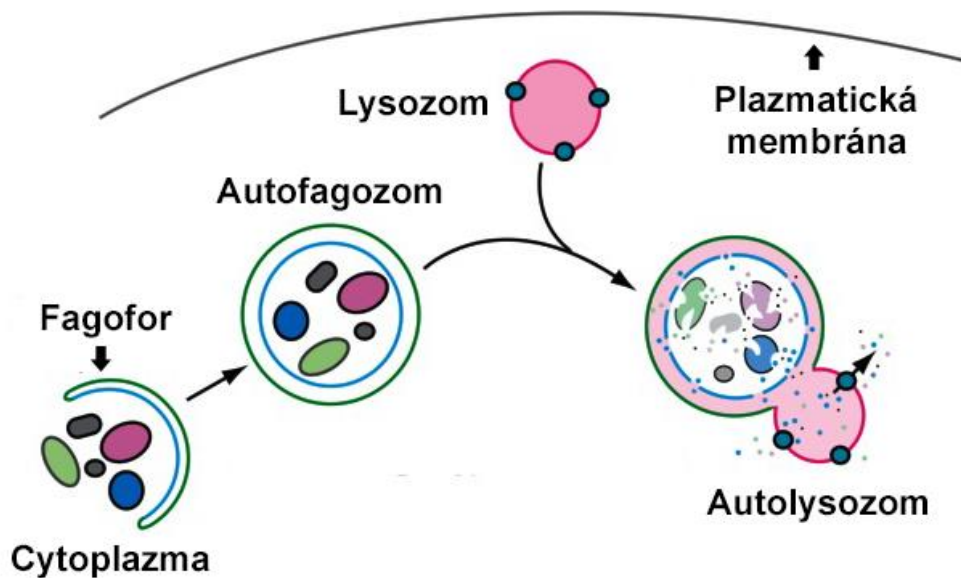
Například mitofagie (Obr. 5), tedy mitochondriální autofagie, se dělí do 2 odlišných variant. Při nedostatku živin jsou jednotlivé mitochondrie nebo její fragmenty obkloповány membránou. Vnější kompartment takto vzniklých mitofagozomů se okyselí, membrána zachycené mitochondrie je depolarizována regulační proteinovou kinázou PINK1 (*PTEN-induced Putative Kinase 1*) a následuje fúze s lysozomem. Samotná depolarizace mitochondriální membrány stimuluje druhou variantu mitofagie, při které nedochází k tvorbě mitofagoforu ani štěpení mitochondrie, ale je charakteristická navázáním autofagických struktur obsahujících mikrotubuly na povrch mitochondrie. Další rozdíl můžeme pozorovat při inhibici fosfoinositid-3-kinázy, která je schopná blokovat mitofagii prvního typu, druhého nikoli. K aktivaci mitofagie dochází například při požití ethanolu. Jeho vlivem na depolarizaci mitochondriální membrány usnadňuje metabolismus jaterního ethanolu a také indukuje mitofagii. Při dlouhodobém vysokém příjmu ethanolu se snižuje citlivost membrány k depolarizaci. Ethanolem poškozené mitochondrie pak produkují molekuly spojené s jejich poškozením, které podporují zánětlivé a profibrogenní reakce (Lemasters, 2018).



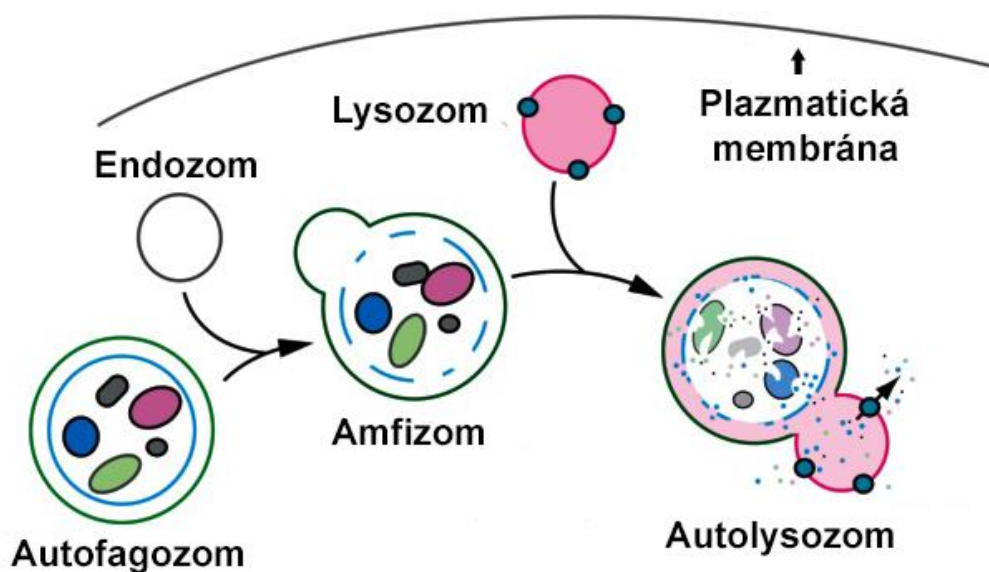
Obr. 5: Znáznornění procesu mitofagie ve vztahu k ER (upraveno dle Rambold, 2011).

1.3.1 Iniciace

Autofagie například u kvasinek začíná na vnější straně vakuoly, které se říká preautofagozomální struktura PAS (*Phagophore Assembly Site*), ale může být lokalizována kdekoli v cytoplazmě. Zdrojem pro vytvoření membrány může být endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, mitochondrie, cytoplazmatická membrána a endozomy (Ravanan, 2017). Vzniklý autofagozom může fúzovat s lysozomem přímo za vzniku autofagolysozomu (Obr. 6). V lysozomálních drahách vzniká fúzí autofagozomu a endozomu amfizom, který následně fúzuje s lysozomem a dochází k natrávení jeho obsahu (Obr. 7). Amfizom je typický pro axony neuronů, ale jemu podobné struktury se kromě autofagie podílí na sekreci mucinu pohárkovými buňkami a jejich výskyt můžeme očekávat také v enterocytech při hibernaci (Klionsky, 2016; Vistro, 2019).



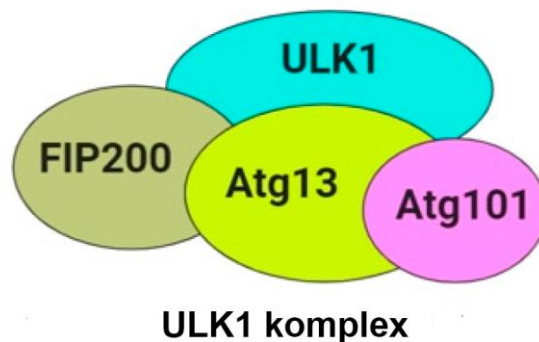
Obr. 6: Autofagozom přímo fúzující s lysozomem (upraveno dle Klionsky, 2016).



Obr. 7: Schéma makroautofagie, při které autofagozom fúzuje s endozomem za vzniku amfizomu a následně fúzuje s lysozomem (upraveno dle Klionsky, 2016).

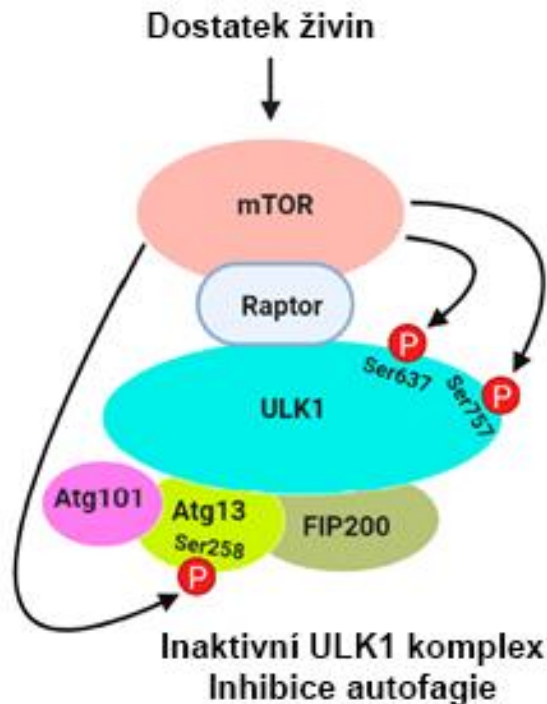
V iniciační fázi hrají důležitou roli proteinové komplexy mTOR, což jsou serin/threoninové kinázy, které tvoří dvě funkčně odlišné jednotky mTORC1 a mTORC2. Komplex mTORC2 se skládá z proteinu mLST8 (*Mammalian Lethal with sec-13 Protein 8*), RICTOR (*Raptor Independent Companion of mTOR*), mSIN1 (*Mammalian Stress-activated Protein Kinase-interacting Protein 1*)

a PROTOR (*protein observed with rictor*). Podjednotky tvořící komplex mTORC1 je proteinová kináza ULK1 (*Uncoordinated-51 Like Protein Kinase 1*), proteiny kódované geny související s autofagií Atg13 (*Autophagy Related Gene*), Atg101, protein FIP200 (*Focal Adhesion Kinase Family-interacting Protein of 200 kDa*) a regulační protein RAPTOR (*Regulatory Associated Protein of mTOR*), které jsou více citlivé na výživu buňky, proto při nedostatku živin dochází k inhibici tohoto komplexu, čímž se aktivuje proces autofagie. Podjednotky Atg13 a FIP200 interagují s ULK1 v jeho C-terminální oblasti (C-konec). Dále se na ULK1 napojuje podjednotka Atg101 přes N-konec na Atg13 (Obr. 8). Tyto kroky jsou nezbytné pro iniciaci a správnou funkci celého děje (Ravanan, 2017).



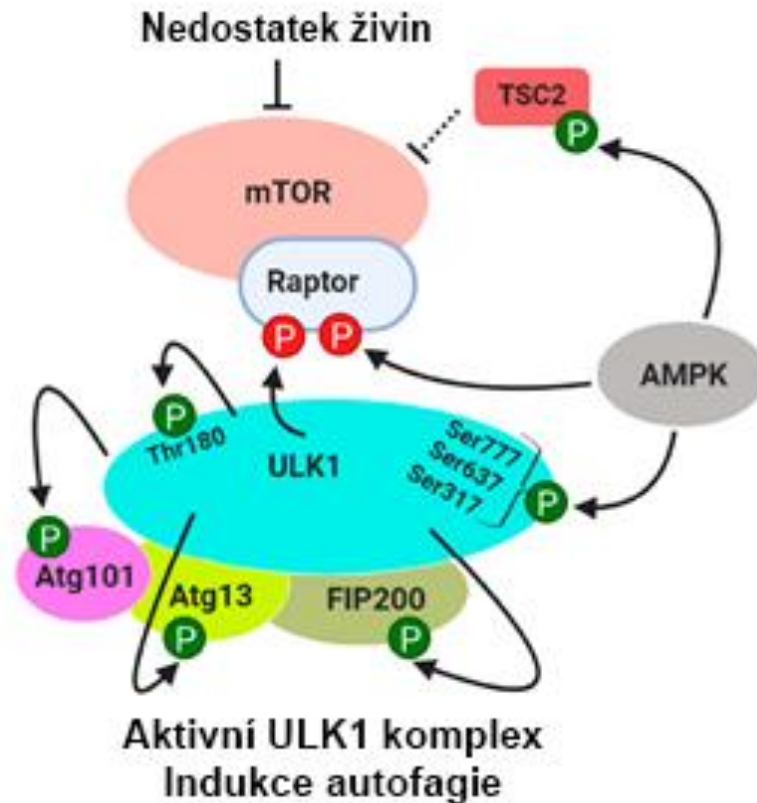
Obr. 8: **Podjednotky komplexu ULK1.** ULK1 (proteinová kináza A), FIP200 (protein interagující s fokálními adhezními kinázami), Atg 13 a 101 (autofagické proteiny 13 a 101) (upraveno dle Dossou, 2019).

Za normálních podmínek transportuje hydroláza GTPáza mTORC1 k lysozomu, který obsahuje další hydrolázu v-ATPázu nezbytnou pro aktivaci mTORC1. V lysozomu je mTORC1 aktivován Rheb (*Ras Homologue Enriched in Brain*). Takto aktivovaný mTORC1 následně inaktivuje komplex ULK1 fosforylací ULK1 a Atg13 za přítomnosti regulační molekuly RAPTOR (Obr. 9). Tato molekula dále reaguje s ULK1, a tak zprostředkovává interakci mTORC1 a ULK1-Atg13-FIP200. Aktivovaný mTORC1 zůstává spojen s lysozomem a spouští fosforylační kaskádu, která napomáhá přežití buňky a její proliferaci.



Obr. 9: **Regulace komplexu ULK1.** MTORC1 (serin/threoninová kináza) fosforyluje ULK1 (proteinovou kinázu A) v oblasti Ser637, Ser757 (serin 637, serin 757) a Atg13 (autofagický protein) v oblasti Ser258 (serin 258) (upraveno dle Dossou, 2019).

Když buňka strádá, což může být způsobeno nedostatkem aminokyselin, růstových faktorů, kyslíku a ATP, se mTORC1 inhibuje a spojení s lysozomem se přeruší, protože vazby vzniklé fosforylací jsou rozrušeny fosfatázami, dojde k disociaci mTORC1 a komplex ULK1 se aktivuje autofosforylací na Thr180, tudíž dojde k aktivaci autofagie touto cestou. Tento aktivovaný komplex následně spouští vznik autofagozomu. Samotný komplex ULK1 dokáže ovlivňovat mTORC1, protože dokáže fosforylovat jeho regulační molekulu RAPTOR. AMPK (AMP aktivovaná proteinkináza) komplex je také schopný inhibovat mTORC1 fosforylací Rheb a RAPTOR (Bareja, 2019). Takto aktivovaný ULK1 fosforyluje Atg13 a FIP200 a tím dojde k jejich aktivaci (Obr. 10). Mimo to fosforyluje Beclin-1 ve fosfatidylinositol 3-kinázovém komplexu PI3K, který hraje roli při tvorbě fagoforu a ten je nezbytný pro další průběh autofagie (Ravanan, 2017).

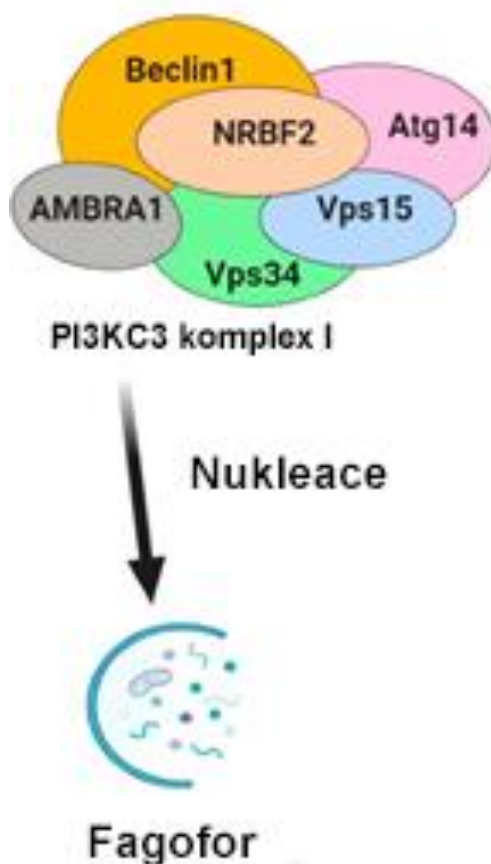


Obr. 10: **Regulace komplexu ULK1 při nedostatku živin.** TSC2 (růstový tuberinový komplex), mTOR (serin/threoninová kináza), Raptor (regulační protein), ULK1 (proteinová kináza A), Atg 101 (autofagický protein 101), Atg 13 (autofagický protein 13), FIP200 (fokální adhezni kináza), AMPK (AMP dependentní proteinkináza), Ser777, Ser637, Ser317 (serin 777, 637, 317), P (fosfát) (upraveno dle Dossou, 2019).

1.3.2 Nukleace

K nukleaci fagoforu je nezbytná aktivita lipidové kinázy třetí třídy PI3KC3 (*Phosphatidylinositol 3-kinase-related Kinase Class III*). Tato kináza poskytuje fosfatidylinositol-3-fosfát získaný z fosfatidylinositolu na fagoforu. PI3KC3 vytváří 2 různé komplexy. Komplex 1 lipidové kinázy třetí třídy PI3KC3-C1 se váže na Atg14, zatímco komplex 2 lipidové kinázy třetí třídy PI3KC3-C2 na protein odolnosti proti UV UVRAG (*UV Resistance-associated Gene*). PI3KC3-C1 a jeho podjednotky protein třídící vakuoly Vps34 (*Vacuolar Protein Sorting 34*), regulační protein Beclin-1, genový produkt PI3KR4 protein Vps15 (*Vacuole Sorting Protein 15, Gene Product of PIK3R4*) a protein související s autofagií Atg14 (Atg14L nebo barkor) (Kang, 2011). Do nukleace fagoforu se dále zapojuje aktivační molekula AMBRA1 (*Activating Molecule in Beclin-1-regulated Autophagy Protein 1*) a nukleární faktor NRBF2 (*Nuclear Receptor-binding*

Factor 2) (Obr. 11). Za normálních podmínek zůstává PI3KC3-C1 spojen s cytoskeletem. Jakmile se aktivuje ULK1 komplex, přesune se do endoplazmatického retikula do omegazomů a způsobuje produkci PI3P komplexem PI3KC3-C1 na fagoforu (Dossou, 2019). Omegazomy jsou rozšířené části membrány endoplazmatického retikula, které vznikají jako odpověď na syntézu PI3CK-C1. Uvnitř omegazomů mohou také vznikat autofagozomy (Karanasios, 2013).



Obr. 11: **Schéma komplexu PI3KC3-C1** (lipidová kináza třetí třídy) **nezbytného pro nukleaci**. Beclin-1 (regulační protein), AMBRA (aktivační molekula), NRBF2 (nukleární faktor), Atg14 (autofagický protein), Vps34, Vps15 (protein třídící vakuoly 34, 15) (upraveno dle Dossou, 2019).

Aktivace PI3KC3-C1 je vyvolána kromě aktivace ULK1 také inhibicí mTORC1. Oba děje se projeví fosforylací Beclin-1 na Ser15 a Ser30. Komplex mTORC1 může PI3KC3-C1 regulovat také přímo, a to fosforylací jeho komponent Atg14, AMBRA1 a NRBF2. Atg14 je protein, který přivádí komplex

PI3KC3 k autofagozomu pomocí sekvence cílící na autofagozom BATS (*Barkor/Atg14 Autophagosome Targeting Sequence*). Protein Atg14 také usnadňuje interakci komplexu PI3KC3-C1 s komplexem ULK1 prostřednictvím interakce Atg14 a Atg13. Ukázalo se, že Atg14 je přímý substrát pro mTORC1, který ho fosforyluje v místě Ser3, Ser223, Thr233, Ser383 a Ser40. Všechny tyto vazby jsou důležité, protože v momentě, kdy by došlo na jakékoli z nich k mutaci, nemohlo by dojít k inhibici aktivity PI3KC3-C1, kterou způsobuje mTORC1, čímž se zajišťuje, aby nedošlo k inhibici PI3KC3 lipidové kinázy. Fosforylace Atg14 v místě Ser29 se může účastnit i ULK1 a tím také aktivovat PI3KC3-C1, ale i tato reakce je závislá na inhibici mTORC1.

Za normálních podmínek, když je AMBRA1 navázána přes Beclin-1 na PI3K, interaguje s lehkým řetězcem dyneinu, a proto se odděluje komplex PI3K od cytoskeletu. Při nedostatečné výživě buňky, aktivní ULK1 fosforyluje Ser465 a Ser635 a AMBRA1 se odděluje od cytoskeletu, přenáší PI3K k endoplazmatickému retikulu a tím podporuje nukleaci. Za normálních podmínek je AMBRA1 regulována mTORC1, který ji fosforyluje v místě Ser52. Inhibice mTOR1 způsobuje její defosforylaci a AMBRA1 má tak možnost interagovat s faktorem TRAF6 (*Tumor Necrosis Receptor Associated Factor 6*) asociovaným s nekrózou a s E3-ligázou, která připojuje ubikvitin na ULK1 v místě Lys63. Tento proces indukuje kinázovou aktivitu ULK1, a tak má mTORC1 možnost negativně ovlivňovat autofagii nejen fosforylací ULK1, ale i AMBRA1.

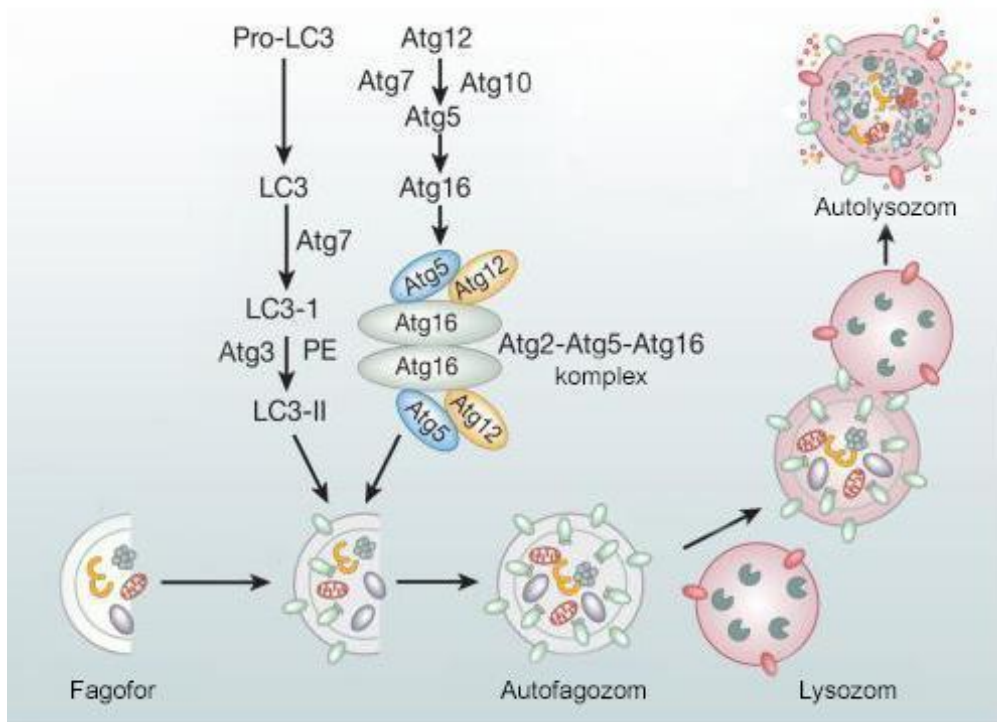
Aktivitu PI3KC3 komplexu ovlivňuje dále nukleární faktor NRBF2. Jaký vliv má NRBF2 na autofagii záleží na jeho fosforylačním stavu. PI3KC3 může existovat ve dvou formách. Když se NRBF2, fosforylovaný mTORC1, naváže v místě Vps34-Vps15, bude mít komplex negativní vliv na autofagii, protože aktivita lipidové kinázy bude nízká. V opačném případě, kdy NRBF2 nebude fosforylovaný z důvodu inhibice mTORC1 nebo nedostatečné výživy buňky, naváže se na komplex Atg14-Beclin1, tím způsobí hromadění PI3KC3, produkci fosfatidylinositol 3-fosfátu PI3P (*Phosphatidylinositol 3-Phosphate*), asociaci ULK1 a tím autofagii ovlivňuje pozitivně. Autofagie, na které se podílí NRBF2, je narušena ve fázi nukleace i ve fázi maturace autofagozomu, protože v nich hraje roli PI3CK3-C1 a PI3CK3-C2. Z toho vyplývá, že interakce NRBF2 s Atg14,

stejně tak s UVRAG, reguluje tvorbu autolysozomu. Vzhledem k tomu, že NRBF2 je fosforylován mTORC1, hraje tento komplex hlavní roli při tvorbě membrány.

1.3.3 Elongace

Ke zvětšování fagoforu dochází, když omegazom začne produkovat PI3P. PI3P přivádí protein interagující s fosfoinositidem WIPI (*WD-Repeat Domain Phosphoinositide-Interacting Protein 2*), což je lidská forma Atg 18 a protein obsahující specifickou doménu FYVE DFCP1 (*FYVE Domain-Containing Protein 1*) k omegazomu. K tomu, aby se vytvořila dvouvrstvá membrána, musí dojít ke konjugaci s proteinem, který je podobný ubikvitinu a asociovaný s mikrotubuly LC3 (*Ubiquitin-like Protein Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3*) pomocí komplexu Atg12-Atg5-Atg16L. WIPI se váže na Atg16, dopravuje komplex Atg12-Atg5-Atg16L k fagoforu a tím usnadňuje lipidaci LC3. Komplex Atg12-Atg5-Atg16L se pak stane součástí konjugovaného systému, kde enzym Atg7 přenáší LC3-1 k Atg3 navázanému na komplexu Atg12. Za přítomnosti Atg3 a fosfatidylethanolaminu, který je složkou membrány fagoforu, může dojít k samotné lipidaci a přeměně LC3-I na LC3-II (Obr. 12).

Pro lipidaci LC3 a tvorbu fagozomu je také nezbytná deacetylace LC3. Negativní vliv na růst autofagozomu má mTORC1, protože fosforyluje protein WIPI 2 a p300 acetyltransferázu, která acetylací potlačuje aktivitu PI3CK3. Acetylace LC3 zabraňuje interakci s ubikvitinovou ligázou Atg7 (*E1 Ubiquitin Ligase*), která by způsobila jeho aktivaci. Kromě toho acetylace LC3 reguluje transport LC3 mezi jádrem a cytoplazmou. Komplex mTORC1 interaguje s p300, přímo fosforyluje C-konce Ser2271, Ser2291, Ser2279 a Ser2375 a tím se aktivuje. Pokud má buňka nedostatek aminokyselin, defosforyluje se p300, deacetyluje se LC3, roste interakce LC3-Atg7, lipidace LC3 a autofagozom se zvětšuje. Ukázalo se, že i hladina proteinu WIPI je regulována fosforylací v místě Ser395 komplexem mTORC1, což usnadňuje interakci s ubikvitinovou ligázou E3 (*E3 Ubiquitin Ligase*) a proteozomální degradaci. Inhibice mTORC1 zvyšuje stabilitu WIPI a následně i tvorbu autofagozomu. Takto mTORC1 ovlivňuje množství WIPI při autofagii za normálních podmínek, ale i při nedostatečné výživě buňky (Dossou, 2019).



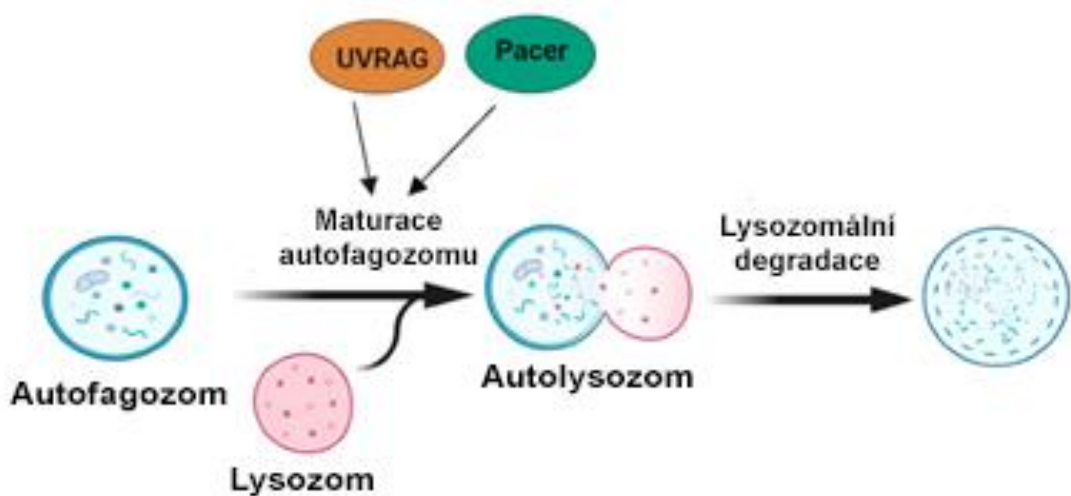
Obr. 12: **Role konjugovaného komplexu Atg a LC3 při elongaci fagoforu.** LC3 (protein podobný ubikvitinu asociovaný s mikrotubuly), Atg 3, 5, 7, 10, 12, 16 (autofagické proteiny 3, 5, 7, 10, 12, 16), PE (fosfatidylethanolamin) (upraveno dle Kaushal, 2016).

1.3.4 Maturace

Když je tvorba autofagozomu kompletní, může dojít k splynutí s lysozomem a degradaci pohlceného materiálu. Interakci komplexu PI3CK3 s autofagozomem zprostředkovává UVRAG (Obr. 10) a podobně jako Atg14 podporuje aktivitu Vps34 lipidové kinázy. Konkrétně interakce UVRAG s proteinem pro třídění vakuol HOPS stimuluje fúzi autofagozomu a lysozomu. UVRAG může ovlivňovat maturaci autofagozomu i negativně. Interaguje s proteinem Run a tím zabraňuje zrání autofagozomu podobně jako Beclin-1 nebo modulátor bohatý na cystein Rubicon. Antagonistou Rubiconu je protein propojený s UVRAG, který zlepšuje maturaci autofagozomu tím, že k němu přibližuje Vps34 a komplex HOPS.

Aby byla během autofagie udržena homeostáza lysozomu, je nutná přeměna jeho membrány. To značí konečnou fázi autofagie, kterou reguluje mTORC1, v případě dostatku živin, fosforylací UVRAG v místě Ser498 a stimulátor asociovaný s UVRAG Pacer (*Protein Associated with UVRAG as Autophagy Enhancer*) (Obr. 13). Tuto reakci usnadňuje interakce UVRAG

s Rubicon, inhibuje aktivitu Vps34 (lipidová kináza) a interakci komplexů UVRAG a HOPS. Fosforylace UVRAG na Ser498 neovlivňuje počáteční fáze autofagie. Pokud buňka strádá a k fosforylaci nedošlo, Rubicon reaguje s HOPS a autofagozom je schopen dozrát. I když je k vyvolání autofagie nutná inhibice mTORC1, pro přeměnu membrány lysozomu je potřeba jeho reaktivace, která zajišťuje fosforylaci UVRAG na Ser550 a Ser571, což aktivuje Vps34 a vytváří PI3P na lysozomu. Pokud by nedošlo k této reakci, deprivace živin by buňky snadněji usmrtila.



Obr. 13: Fúze autofagozomu s lysozomem za přítomnosti mediátorů UVRAG (protein odolnosti proti UV) a Pacer (upraveno dle Dossou, 2019).

Regulace komplexů PI3KC3 je odlišná. Když buňka strádá, inhibice mTORC1 zvyšuje množství PI3P v autofagozomu, které je regulováno připojením Atg14 k PI3CK3-CI, ale zároveň se snižuje aktivita vazby UVRAG a PI3KC3-CII, a tak klesá množství PI3P v lysozomu i uvnitř buňky. Aby došlo k fúzi autofagozomu s lysozomem, je potřeba komplex HOPS. Kromě toho fúzi usnadňuje syntaxin-17 (Stx-17), který interaguje s komplexem Pacer a ten přenáší HOPS k autofagozomu. Interakci mezi Pacer, HOPS a Stx-17 zajišťuje acetylace Pacer TIP60 histonovou acyltransferázou. Pacer je také v místě Ser157 fosforylován mTORC1, a tak inhibuje jeho acetylaci. Pokud má buňka dostatek živin, fosforylace zabraňuje interakci HOPS a Stx17, což brání maturaci

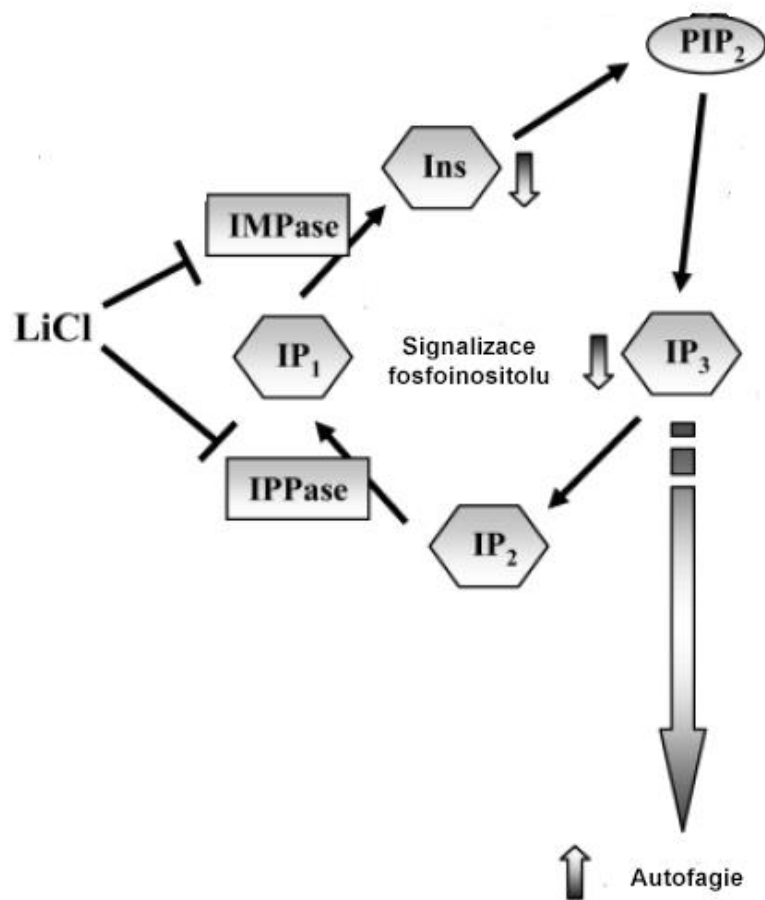
autofagozomu. Naopak při nedostatku živin defosforylace komplexu Pacer umožňuje interakci s HOPS a maturaci podporuje (Dossou, 2019).

2 Indukce autofagie

Pokud je autofagie z různých důvodů v buňce nefunkční nebo její aktivita není dostačující, je možné ji v *in vitro* systémech vyvolat chemickými látkami, které se v těle běžně nenacházejí, ale mohou být použity jako léčiva. Tyto látky mohou autofagii indukovat prostřednictvím komplexů mTOR nebo proteinové kinázy AMPK. Autofagie může být vyvolána také stavem buňky, který pro ni je ohrožující, například při poškození některé organely nebo při zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku.

2.1 Lithium

Ke zvýšení aktivity autofagie se převážně využívá rapamycin, který inhibuje negativní regulátor autofagie mTOR. Mimo rapamycinu je možné indukovat autofagii lithiem. Lithium inhibuje inositol monofosfatázu (IMP) a inositol-fosfát fosfatázu (IPP), proto se spotřebuje volný inositol a následně se sníží množství myo-inositol-1, 4, 5-trifosfátu (IP3) (Obr. 14). Indukce lithiem je tedy nezávislá na komplexu mTOR. Indukcí autofagie se redukuje počet mutantních proteinů, tím se buňka chrání proti jejich toxicitě a rozvoji neurodegenerativních chorob (Sarkar, 2005; 2008).

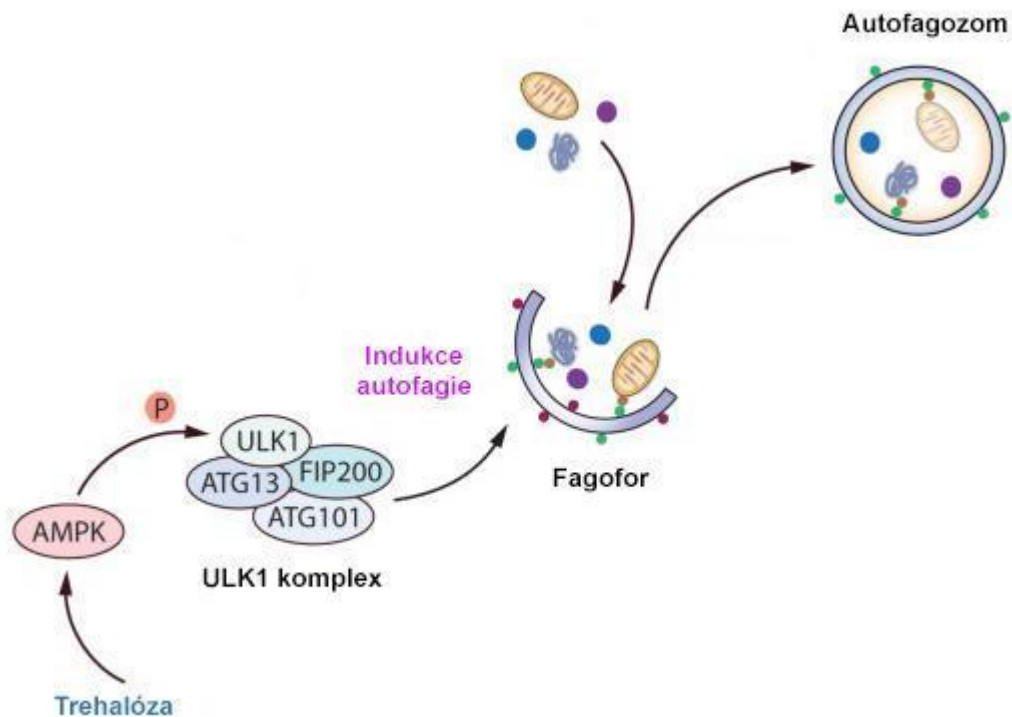


Obr. 14: **Vztah lithia a inositolu.** IMP (inositol monofosfatáza), IPP (inositol-fosfát fosfatáza), IP₁ (inositol monofosfát), IP₂ (inositol bisfosfát), IP₃ (inositol trifosfát), PIP₂ (fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát) (upraveno dle Sarkar, 2006).

2.2 Trehalóza

Trehalóza je přírodní disacharid, který se vyskytuje v tělech rostlin, bakterií, kvasinek, hub, hmyzu a bezobratlých. Pomáhá chránit proti teplu, chladu, oxidaci a vysychání, protože brání denaturaci proteinů. Tuto ochrannou funkci může mít i u savčích buněk *in vitro*, i když jimi není produkována. Další funkcí trehalózy je indukce autofagie a to aktivací AMPK (Obr. 15), dále přes LC3 a Atg5, tedy způsobem nezávislým na mTOR. Tato indukce není závislá na příjmu živin ani na přítomnosti reaktivních forem kyslíku. Mimo jiné se ukázalo, že trehalóza snižuje poškození hematoencefalické bariéry způsobené 1-methyl-4-fenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridinem (MPTP). MPTP bývá součástí syntetických

opiooidů a vyvolává příznaky podobné Parkinsonově chorobě. Trehalóza se podílí na ustálení hladin proteinů těsných spojení, které jsou kvůli MPTP v nerovnováze. Této vlastnosti se dá využít také při léčbě neurodegenerativních chorob (Hosseinpour-Moghaddam, 2018; Park, 2015).

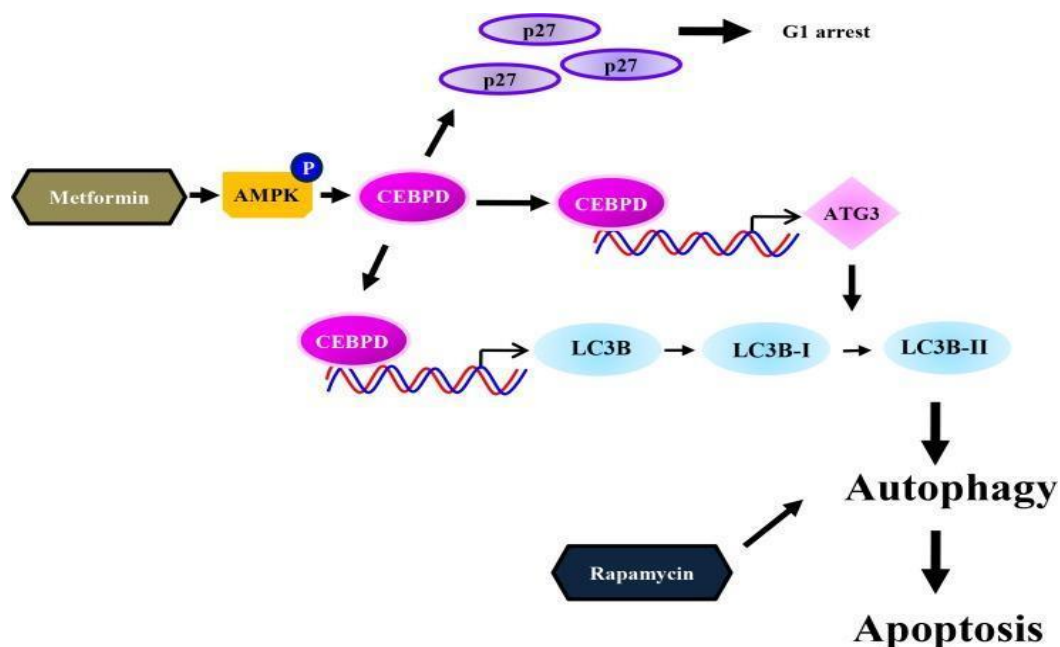


Obr. 15: Trehalóza indukující autofagii přes komplex ULK1 (upraveno dle Palhegyj, 2019).

2.3 Metformin

Metformin je běžně užívané orální antidiabetikum. Napomáhá snižovat inzulinovou rezistenci, a tak snižovat hladinu cukru v krvi. Mimo to se využívá i při léčbě rakoviny slinivky a melanomu. Je známo, že činnost AMPK závisí na energii mitochondrie. Metformin tuto energii snižuje a aktivuje AMPK, čímž podporuje autofagii. Působením metforminu se snižuje degradace transkripčního faktoru proteinu CEBPD (*CCAAT/Enhancer-Binding Protein Delta*), v závislosti na vyšším množství CEBPD se zvyšuje transkripce genu pro Atg3 a LC3 (Obr. 16). Zvýšenou indukci autofagie lze detekovat fluorescenčním barvením nebo imunoblotem (Obr. 16). Vzhledem k tomu, že autofagie může mít pozitivní i negativní vlivy na léčbu nádorů, ve většině případů závisí účinek na podané dávce. Autofagie spuštěná metforminem může mít vliv antiapoptický. Naopak s rostoucí se dávkou metforminu se zvyšuje procento

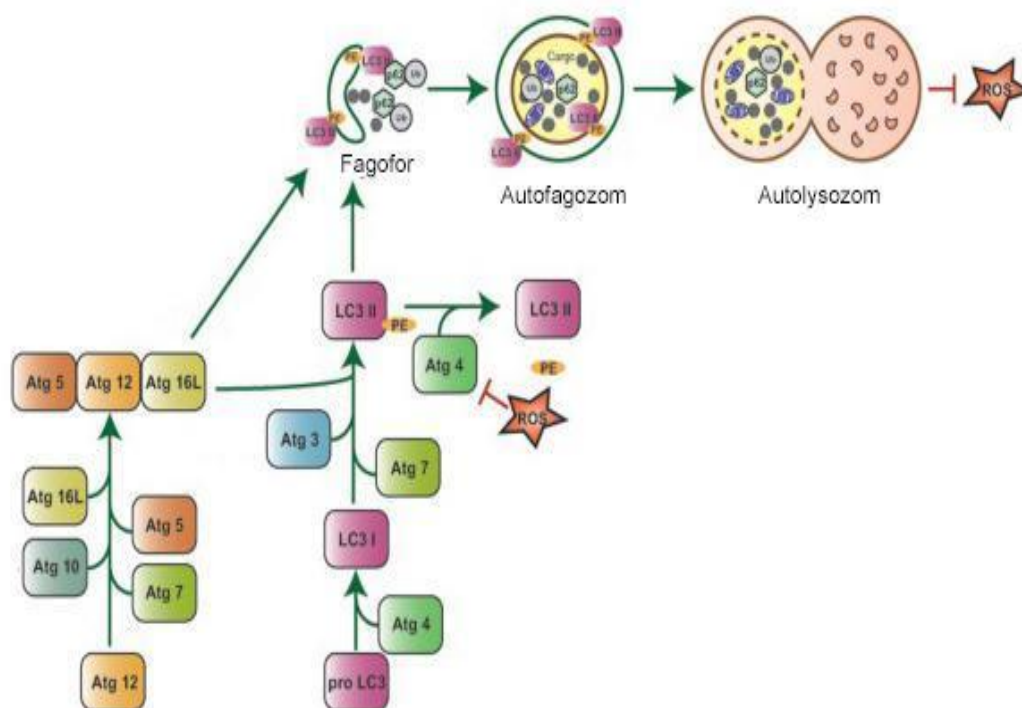
apoptických buněk. Tento nárůst můžeme sledovat pomocí fluorescenčního barvení nebo cytometricky. Kromě působení na AMPK může metformin také aktivovat gen ACAD 10, který omezuje růst rakovinové populace buněk *in vitro* (Li, 2020).



Obr. 16: **Indukce autofagie metforminem.** AMPK (AMP aktivovaná proteinkináza), CEBPD (transkripční faktor), Atg 3 (autofagický protein 13), LC3 (protein podobný ubiquitinu asociovaný s mikrotubuly) (upraveno dle Tsai, 2017).

2.4 Reaktivní formy kyslíku

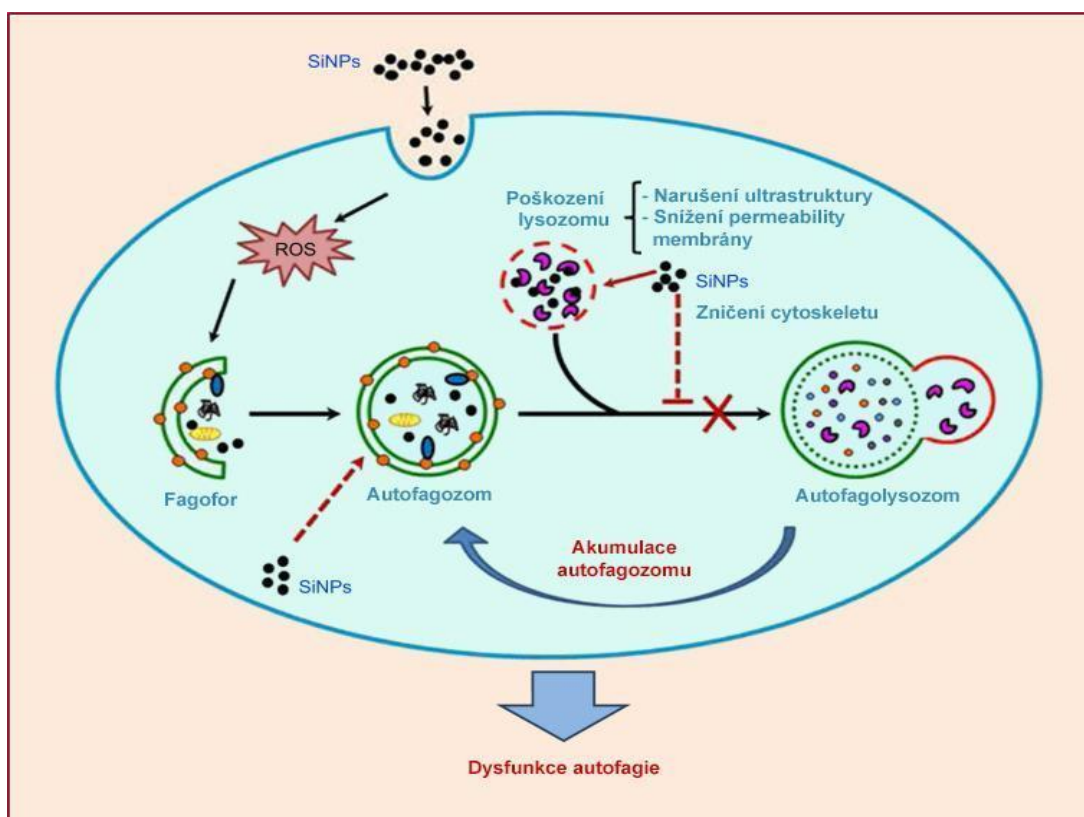
Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou skupina radikálů, které jsou produkovány buňkami při metabolismu kyslíku a ve značné míře jsou schopny přispět k indukci apoptózy i autofagie. ROS mají na autofagii přímý i nepřímý efekt. Přímě ovlivňuje autofagii nedostatek aminokyselin. V mitochondriích pak vzniká peroxid vodíku, který oxiduje Cys81 na Atg4, čímž brání delipidaci LC3, bez které by k autofagii nedošlo. Nepřímě je autofagie indukována fosforylací růstového tuberinového komplexu TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex 2*), Raptor nebo ULK1. Tuto reakci zajišťuje AMPK (Kongara, 2012). Kromě toho jsou ROS schopny indukovat aktivitu mitogen-aktivované proteinkinázy (MAPK), konkrétně c-Jun-N-terminální kinázy (JNK) (Obr. 17), jejíž kaskády se také využívá při léčbě maligních tumorů (Li, 2020).



Obr. 17: Schéma působení reaktivních forem kyslíku na autofagii
(upraveno dle Kongara, 2012).

2.5 Nanočástice

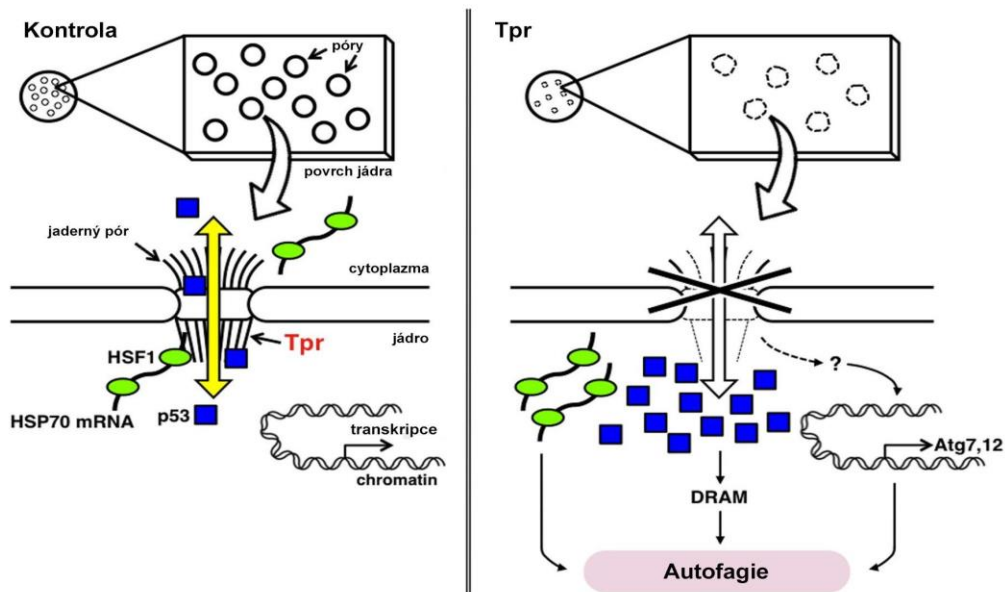
Reaktivní formy kyslíku jsou produkovány také v důsledku setkání buňky s nanočásticemi. Nanočástice, které touto cestou vyvolávají autofagii, mohou být nanočástice zlata, stříbra, fullereny a jejich deriváty, oxid titaničitý a oxid železnatý. Spolu s produkcí ROS se fosforylací aktivuje AMPK a proces autofagie. Kromě vyvolání produkce ROS, pravděpodobně aktivují nanočástice autofagii i tak, že se začlení do autofagozomu. Nežádoucím účinkem nanočástic je osídlení lysozomů, přičemž dochází ke zvýšení permeability lysozomální membrány a v důsledku toho se kyselá hydrolázy uvolňují z lysozomu do cytoplazmy. Takto poškozené lysozomy nejsou schopné fúzovat s autofagozomem a nelze degradovat obsah autofagozomů, proto dochází k hromadění chybně složených proteinů a poškozených organel v buňce (Obr. 18). *In vitro* se po inkubaci a barvení monodansylkadaverinem MDC (*monodansylcadaverine*) se takové vzorky analyzují konfokální mikroskopem. Nanočástice oxidu železnatého způsobily akumulaci autofagozomů specificky ve vzorcích rakovinových buněk (Khan, 2012).



Obr. 18: Schéma indukce a narušení autofagie nanočásticemi (upraveno dle Wang, 2017).

2.6 Autofagie indukovaná nukleoporiny

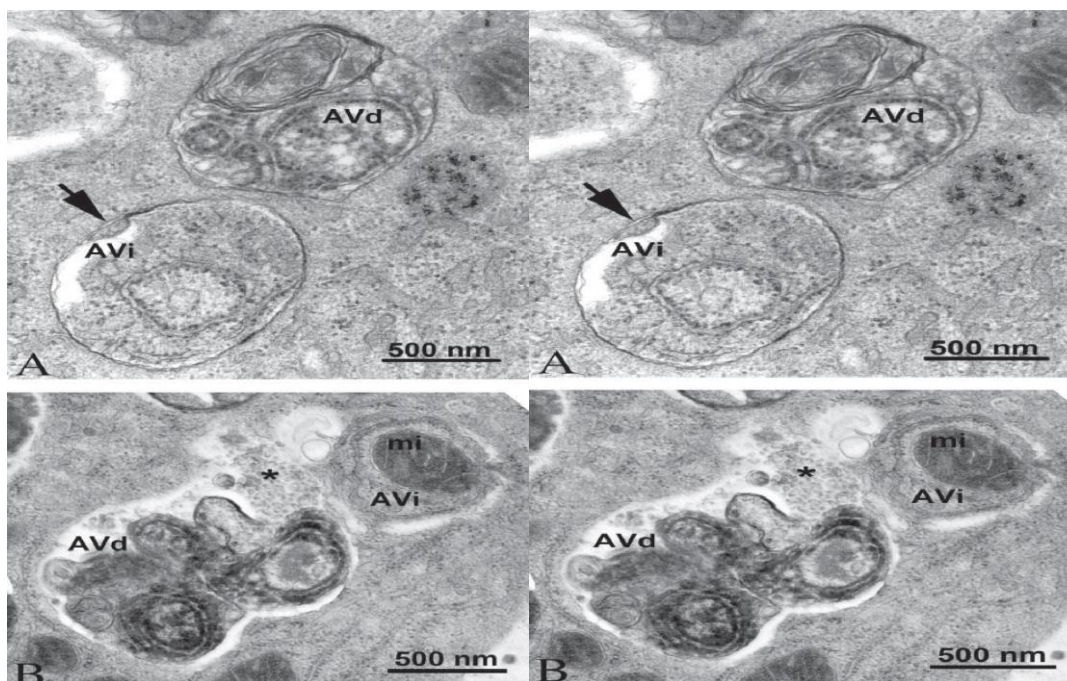
Nukleoporiny jsou proteiny, které tvoří komplex jaderných pórů. Nukleoporin Tpr (*Translocated Promoter Region*) je lokalizován na filamentech uvnitř jádra a umožňuje vyměňovat buněčný materiál mezi cytoplazmou a jádrem. V autofagii hraje roli transkripční faktor p53 a transportér proteinu hsp70. Po depleci Tpr se snižuje počet jaderných pórů, p53 se transportuje do jádra, kde se akumuluje a přes modulátory DRAM (*Damage-Regulated Autophagy Modulator*) reguluje autofagii indukovanou poškozením. Nedostatek Tpr zvyšuje transkripci genů Atg7 a Atg12, které hrají roli v procesu autofagie. (Obr. 19). Kromě toho také p53 interaguje s transportním proteinem CRM1 (*Chromosomal Maintenance 1*), ale jeho deplece neindukuje autofagii tak intenzivně jako deplece Tpr. Důvodem může být přispívání Tpr při přenosu hsp70 mRNA do jádra a při transkripci autofagických proteinů Atg7 a Atg12 (Funasaka, 2012).



Obr. 19: Znárodnění indukce autofagie za pomoci nukleoporinu Tpr (upraveno dle Funasaka, 2012).

3 Detekce autofagie

Elektronová transmisní mikroskopie je jediná metoda, kterou je možné sledovat autofagické struktury o velikosti nanometrů přímo v buňce v porovnání s ostatními organelami. Při selektivní autofagii je v podstatě vyloučena cytoplazma. Naopak při neselektivní autofagii jsou složky cytoplazmy náhodně sekvestrovány, při čemž vznikají autofagozomy. Ty jsou obklopeny dvouvrstvou membránou. Amfizozy můžeme identifikovat podle přítomnosti vezikulů v lumen, které fúzí s endozomy. Autofagozomy mají jednu membránu a obvykle obsahují organely v různé fázi degradace, proto je nelze snadno rozeznat od lysozomů nebo endozomů. Autofagozomy se vyznačují intaktní cytoplazmou obsahující ribozomy a endoplazmatické retikulum, jsou obklopeny dvouvrstvou membránou, pro kterou je typický elektronově lucentní štěp. Autofagická vakuola bývá identifikována na základě částečně degradovaného obsahu elektronově hustého drsného endoplazmatického retikula (Obr. 20). Autofagickou vakuolou nazýváme autofagozomy, amfizozy a autolysozomy.



Obr. 20: **Obrazy z transmisního elektronového mikroskopu.** AVi (autofagozom), AVd (autofagická vakuola), mi (mitochondrie) (Klionsky, 2016).

K přesné identifikaci se využívá imuno-elektronová mikroskopie, kdy se detekují katepsiny a jiné lysozomální hydrolázy. Dále mohou být pro potvrzení použity také strukturní proteiny LAMP1, LAMP2 nebo SCARB2/LIMP-2. Neexistuje jeden specifický proteinový marker účinný pro rozlišování autolysozomů kvůli dynamické fúzi a výměně komponent (kiss-and-run), vždy je potřeba ověřit další marker, například značený LC3-CTSD (katepsin D), okyselením kompartmentu, případně vyloučením markerů jiných vezikulárních komponentů.

I když není možné identifikovat již natrávené struktury uvnitř autolysozomu, lze vystopovat předešlá stádia jejich degradace. Nejprve dochází ke zvýšení hustoty organel, která jsou ještě stále rozpoznatelné. Následně se vytváří vakuoly s různou hustotou. Ta se dále homogenizuje a stává se amorfni. Elektronová hustota stádií může být různá. I u patologických stavů se obvykle v lumen vyskytují autolysozomy obsahující částečně natrávené amorfni substráty. Tyto autolysozomy jsou bohaté na hydrolázy a při těchto stavech je můžete vidět v elektronovém mikroskopu jako nabobtnané dystrofické neurity v mozkových řezech *in vitro* u neurodegenerativních chorob a v tkáních infikovaných priony. Většinou se vyšetřují časná i pozdější stádia autofagie

proteinu. Například superoxid dismutáza SOD1 (CuZn superoxid dismutáza) je mnohem odolnější vůči lysozomální degradaci na rozdíl od dehydratázy CA (*Carbonate Dehydratase*).

Kromě autolyzozomů můžeme pozorovat multilamelární membrány. Jejich původ zatím není zcela prozkoumán, ale mohou být tvořeny vrstvami fagoforu a jsou pozitivní na LC3, mohou být důkazem pro přítomnost autolyzozomů nebo se vytváří uměle během fixace.

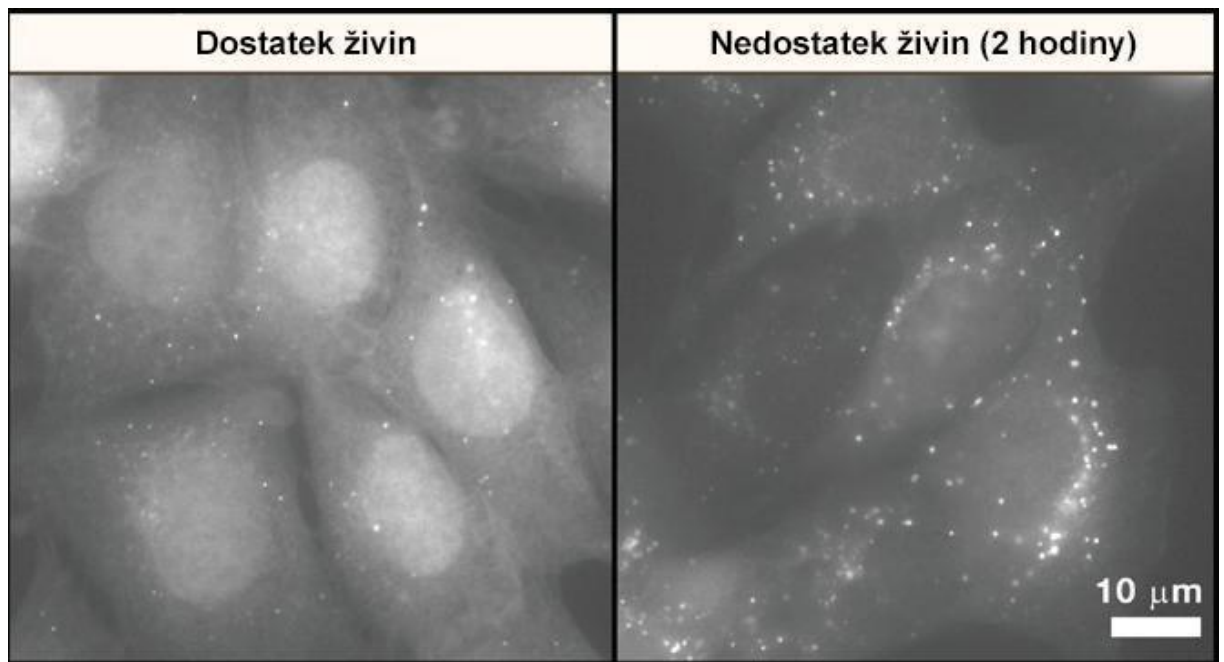
Přítomnost struktur typických pro autofagii lze potvrdit imuno-TEM pomocí protilátek a značení zlatem. Zlatem se zvýrazňují proteiny cytoplazmatického původu a LC3. Značení LC3 zlatem také umožňuje detekovat obsah určený k degradaci. Autofagoproteazom se skládá z jednovrstvé nebo dvouvrstvé membrány LC3-pozitivních autofagozomů, které jsou specifickou součástí systému UPS (ubikvitin-proteazomový systém). V tomto případě se objevují antigeny LC3 a UPS. Jejich enzymatická aktivita působí uvnitř organel místo toho, aby se dělila mezi domény různých buněk. Ač značení LC3 není snadné, objevuje se čím dál víc dostupných komerčních protilátek. Je třeba mít na paměti, že LC3 může být spojeno i s neautofagickými strukturami. Podílí se také na specializovaných formách endocytózy. Mimo to může LC3 značit vezikuly určené k exocytóze v sekrečních systémech. Vzhledem k tomu, že se vyskytuje malé množství proteinů, které jsou asociovány s autofagozomem, možnosti, jak prokázat jeho aktivitu, jsou omezené. Kromě toho mohou být proteiny asociované s autofagozomem specifické pro každé typy buněk. Úspěch této techniky tedy závisí na kvalitě protilátek, postupu, přípravě a fixaci vzorku. Při využití TEM by měly být poskytnuty kontroly, které prokazují, že použité značení je specifické.

V klinické praxi je velmi obtížně zpětně detekovat LC3 ve vzorcích fixovaných parafínem nebo formalínem, protože fosfolipidy obsažené v buňkách se s těmito látkami mísí a značení zlatem pak není efektivní. Proto je výhodné v těchto případech využít metody, kdy je nalezen antigen a tkáň následně obarvena a označena protilátkou proti lidskému LC3 za přítomnosti komplexu avidin-biotin peroxidáza. Takto připravené preparáty je možné pozorovat ve světelném i TE mikroskopu. Obzvláště TEM dokáže odhalit aktivitu peroxidázy, která reaguje právě ve vakuolách s přítomností LC3. Pro vyhodnocení je potřeba,

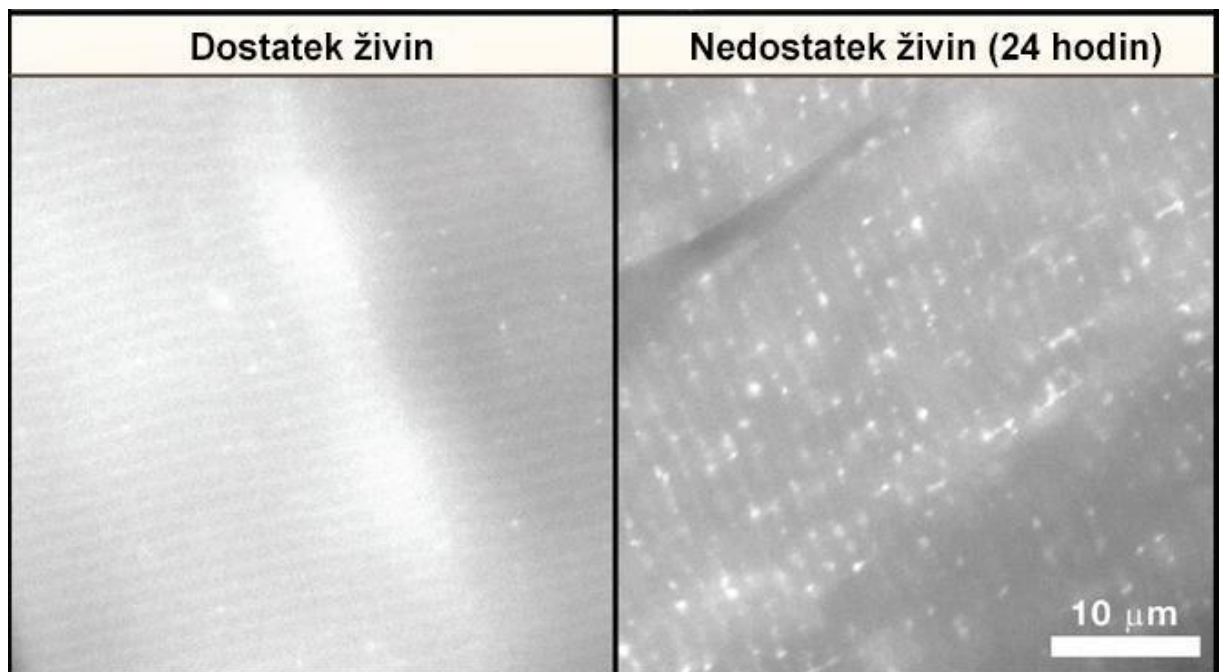
kromě počtu aktivních míst, využít volumetrickou analýzu. Samy o sobě takto získané údaje nejsou dostačující, protože autofagie je velmi dynamický proces. Autofagozomy se mohou přeměňovat velmi rychle, proto jejich velikost nekoreluje s počtem degradovaných proteinů. Získat tuto informaci by bylo možné pomocí kvantifikace autofagozomů v celé buňce pomocí fluorescenčních metod, které odrážejí změny v autofagických strukturách a následně kvalitativně ověřit TEM (Klionsky, 2016).

Již zmíněný autofagický protein LC3, marker autofagozomů, má 4 izoformy, z nich nejrozšířenější je LC3B. Produkce LC3 se liší u buněk s dostatečným příjmem živin a při jejich nedostatku. Když buňky strádá a aktivita autofagie je vyšší, pozorujeme tedy ve fluorescenčním mikroskopu vyšší počet fluorescenčních bodů (Obr. 21, 22). Po syntéze LC3 se připojením Atg4 mění v LC3-I, který má glycinový zbytek na svém C-konci. LC3-I je následně konjugován s fosfatidylethanolaminem (PE) a vzniká LC3-II (LC3-PE). LC3-II je lokalizován na vnější i vnitřní membráně autofagozomu. Po fúzi s lyzozomem je z vnější membrány odštěpen LC3 pomocí Atg4 a z vnitřní je degradován lyzozomálními enzymy. Ke zviditelnění endogenního LC3 nebo LC3 navázaného na zelený fluorescenční protein GFP (*Green Fluorescent Protein*) se používá fluorescenční mikroskopie.

Díky fluorescenční mikroskopii získáme počet fluoreskujících bodů, které odpovídají množství LC3 nebo GFP-LC3, respektive počtu autofagozomů. Počty se odečítají přímo vizuálně nebo pomocí softwarů. Je třeba brát v úvahu, že po indukci autofagii je počet LC3 nižší a určité množství LC3 je pozorováno i při normálních podmínkách. Pokud by tato metoda měla určit, zda je autofagie aktivní nebo neaktivní, je na místě vyjadřovat procenta buněk v dané populaci s takovým počtem fluoreskujících bodů, který přesahuje určitou danou hranici.



Obr. 21: **Expres LC3 v kultuře buněk NIH 3T3.** LC3 (protein podobný ubikvitinu asociovaný s mikrotubuly) (upraveno dle Mizushima, 2010).

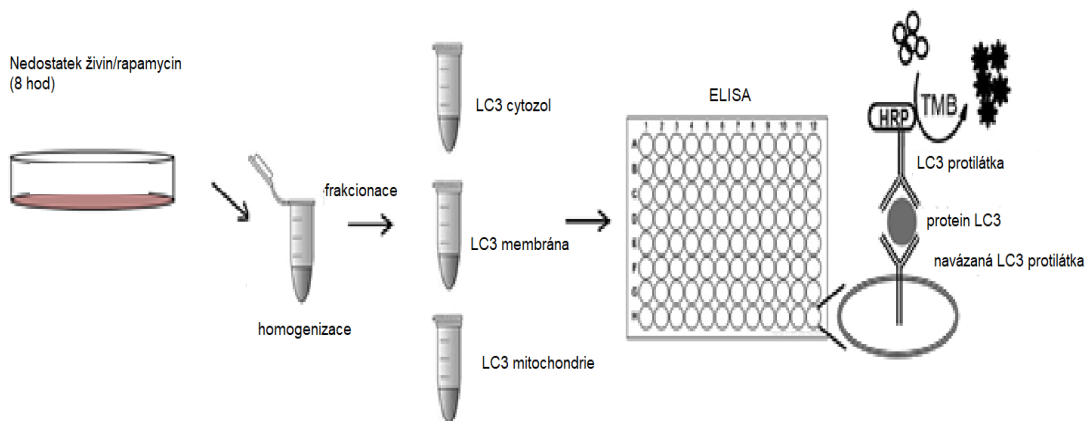


Obr. 22: **Expres LC3 v buňkách kosterního svalu.** LC3 (protein podobný ubikvitinu asociovaný s mikrotubuly) (upraveno dle Mizushima, 2010).

Mimo mikroskopie se využívá LC3 i v biochemických analýzách. Přeměny membránového LC3-I na cytozolový LC3-II a GFP-LC3-I na GFP-LC3-II mohou být detekovány imunoblotingem s protilátkami proti LC3 a GFP nebo metodou

ELISA. Imunoblot detekuje přeměnu LC3-I na LC3-II, což umožňuje určit aktivitu autofagie. Tato analytická metody detekuje specifický protein ve směsi proteinů a k jejich separaci využívá elektroforézu. LC3-II je velmi hydrofobní a jeho molekulová hmotnost je vyšší než LC3-I, proto v médiu migruje rychleji. I když množství LC3-II koreluje s počtem autofagozomů, může být LC3-II přítomen také v myších embryonálních fibroblastech při nedostatku FIP200 a Atg14, v embryonálních kmenových buňkách při nedostatku Beclin 1 a v buňkách, kde je potlačena exprese Beclin 1, Atg13, Atg 14 a Vps34, přestože je autofagie inhibována (Mizushima, 2010).

Buňky se inkubují a po následné frakcionaci se provádí enzymová imunoanalýza ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) (Obr. 23), která je technicky jednodušší než imunoblot. ELISA se využívá ke stanovení antigenů i protilátek. Po indukci autofagie nedostatkem živin nebo rapamycinem, se využívají protilátky proti LC3 a s avidin-biotin peroxidázou konjugované LC3 protilátky. Množství LC3, které se stanovuje spektrofotometricky nebo fluorescenčně, pak odpovídá počtu autofagozomů. Tato metoda se nepoužívá ke stanovení celkové aktivity a kinetiky autofagie, protože není možné najednou detekovat oba antigeny LC3-I i LC3-II, ale ke zjištění, jestli počet autofagozomů roste nebo klesá. Kromě LC3, je markerem autofagie p62, ale jeho použití je diskutabilní, protože se zapojuje také do tumorigeneze a oxidativního stresu. ELISA poskytuje pouze relativní informace o aktivitě autofagie na rozdíl od technik, které kvantifikují přeměnu LC3-I na LC3-II (Oh, 2017; Lequin, 2005).



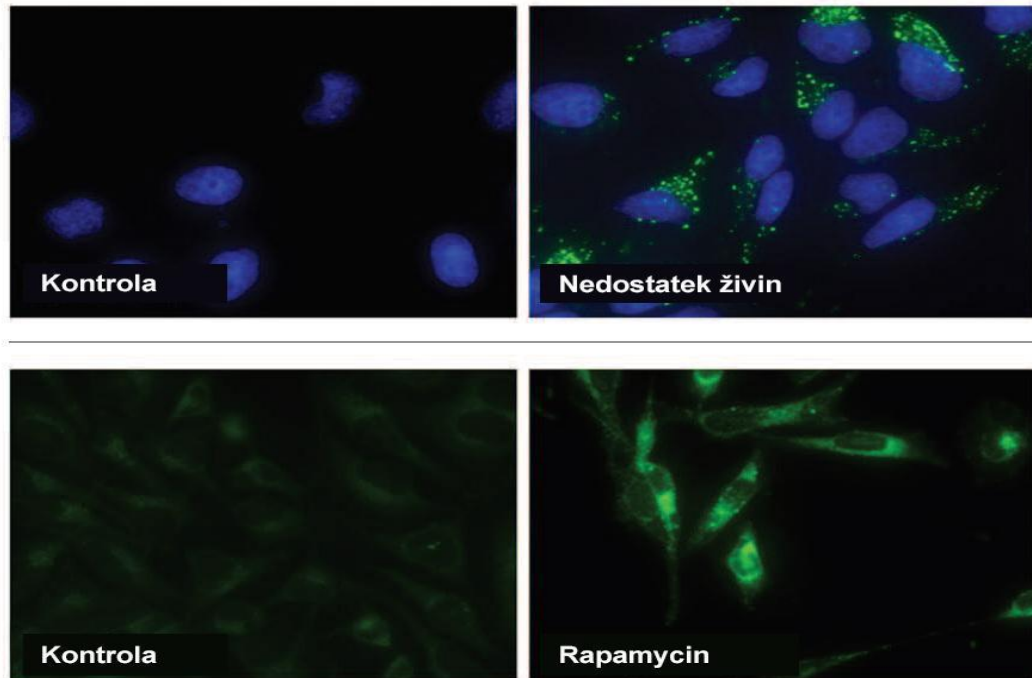
Obr. 23: **Schéma detekce autofagické aktivity metodou ELISA *in vitro*** (upraveno dle Oh, 2017).

Funkci protilátek využívá také imunoelektronová mikroskopie využívá specifických protilátek proti proteinovým markerům autofagosomů, což umožňuje přesnější detekci autofagie v porovnání s transmisní elektronovou mikroskopií, kde rozpoznání autofagických struktur není tak jednoznačné (Martinet, 2005).

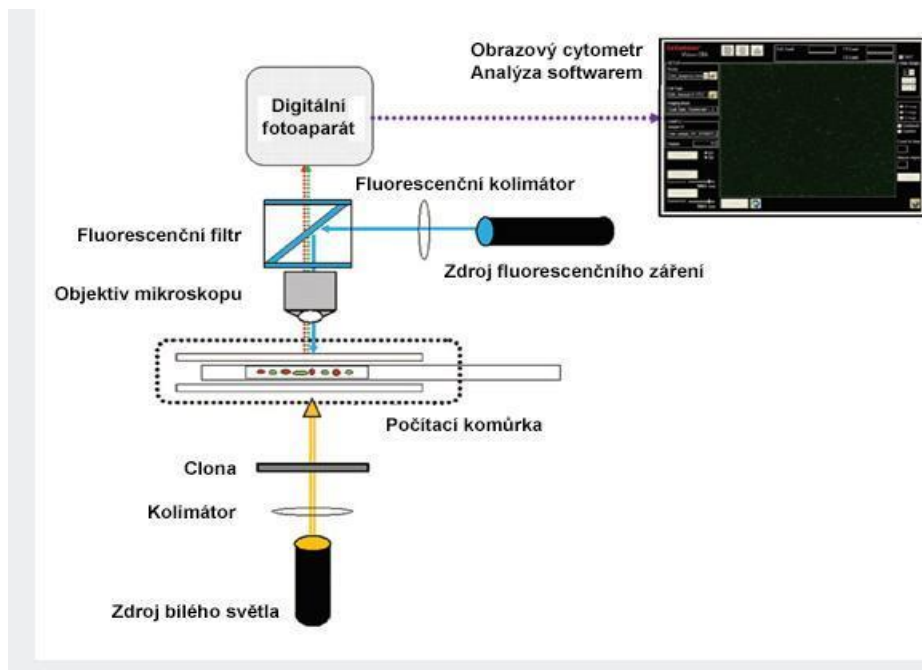
Fluorescenční obrazová cytometrie poskytuje rozsáhlou analýzu buněk na základě fluorescence. Fluorescence se využívá i při použití fluorescenčního mikroskopu. Nejčastěji se autofagie indukována rapamycinem a nedostatek živin, v těchto případech se začne uvnitř buněk zvyšovat počet autofagosomů, které mohou být značeny fluorescenčním barvivem (Obr. 24).

Světelné pole obrazového cytometru (Cellometer) využívá bílou LED diodu a k fluorescenčnímu zobrazování dvě LED diody monochromatické. Tyto monochromatické diody se kombinují s excitačním nebo emisním filtrem. Většinou se vzorek s fluorescenčním značením pipetuje do počítačící komůrky. Fluorescenční signál je zachycován dvěma způsoby. Software analyzuje obrazy ke světelného pole i z obou polí fluorescenčních. Při určování počtu fluoreskujících bodů buď sečte všechny body a vyhodnotí tak celkovou fluorescenci, podobně jako u průtokové cytometrie, nebo sečte nejvyšší hodnoty fluorescence v rámci jedné buňky (Obr. 25). Software zachycuje obrazy a detekuje jednotlivé fluoreskující orgány uvnitř buňky, což je pro přesnou detekci autofagosomů výhodné. Cellometer kombinuje optické zvětšení a rozlišení kamery, z čehož vznikne digitální zobrazení. Tyto obrazy se exportují

do softwaru pro průtokovou cytometrii, kde jsou analyzovány díky značení zeleným barvivem Cyto-ID, která vstupuje do buněk pasivní difúzí.



Obr. 24: Porovnání kontrolních buněk a buněk, kde došlo k indukci autofagie nedostatkem živin nebo rapamycinem (upraveno dle Chan, 2012).



Obr. 25: Schéma fluorescenčního obrazového cytometru (upraveno dle Chan, 2012).

Cyto ID slouží ke specifickému barvení autofagických struktur v živých buňkách. Před samotnou analýzou jsou buňky resuspendovány v médiu, stimulovány rapamycinem, nechají se inkubovat a následně jsou obarveny barvivem Cyto ID. Dalším využívaným fluorescenčním barvivem je propidium jodid, který barví mrtvé buňky, protože snadno prostupuje porušenou membránou a váže se na báze DNA. Použití těchto dvou barviv umožňuje získat obrazy ze světelného i fluorescenčního pole, na kterých lze rozeznat živé a mrtvé buňky, tím pádem cytometr dokáže vyhodnotit množství autofagozomů pouze v živých buňkách.

Z dat získaných ze softwaru obrazového i průtokového cytometru se počítá faktor aktivity autofagie AAF (*Autophagy Activity Factor*) (Vzorec 1). AAF je bezrozměrná veličina, která charakterizuje množství barviva Cyto ID v buňkách za přítomnosti nebo absence induktoru autofagie. Analýza v tomto obrazovém cytometru trvá méně než 2 minuty (Chan, 2012).

$$AAF = 100 \times \left(\frac{MFI_{treated} - MFI_{control}}{MFI_{treated}} \right)$$

Vzorec 1: **Vztah faktoru aktivity autofagie a střední intenzity fluorescence.** AAF (faktor aktivity autofagie), MFI treated (střední intenzita fluorescence vzorku), MFI control (střední intenzita fluorescence kontroly) (Chan, 2012).

4 Neurodegenerativní onemocnění

Pokud dojde k abnormalitám ve struktuře proteinů, proteopatii, kumulují se v jádře a cytoplazmě buněk nebo extracelulárně v tkáních. Abnormální proteiny jsou degradovány ubikvitin-proteazomovým systémem a procesem autofagie. Pokud nejsou tyto děje v rovnováze nebo jsou narušeny, dochází k poškození buněk a dysfunkci nervového systému.

4.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba AD (*Alzheimer's Disease*) byla poprvé popsána před více než 100 lety jako progresivní neurodegenerativní onemocnění,

způsobené nahromaděním nesprávně uspořádaných proteinů, zánětlivými změnami a oxidativním poškozením mozku. Následkem toho je ztráta synaptických spojení a smrt neuronů. Alzheimerova choroba může být způsobena například mutací genů kódujícího amyloidový prekurzorový protein (APP), presenilin 1 (PSEN1) a presenilin 2 (PSEN2).

APP je transmembránový protein, který ovlivňuje β -katenin kotvící proteiny k cytoskeletu a hraje tak významnou roli v adhezi buněk na sebe. APP je štěpen γ -sekretázou na neurotoxický peptid amyloid- β . Součástí γ -sekretázového komplexu je presenilin-1 a presenilin-2. β -amyloidové proteiny se pak hromadí extracelulárně ve formě plaků a intracelulárně jako agregáty proteinu tau, což je protein produkováný neurony. V některých případech může být funkce γ -sekretázy nahrazena apolipoproteinem E. Na degradaci amyloid- β se může podílet také enzym degradující insulin a ubikvilin-1 (Ghavami, 2014).

Řízení činnosti insulinu, která je zodpovědná za energetický metabolismus mozku, cestou fosfatidylinositol 3-kinázový komplex/proteinová kináza B PIK3/Akt je u osob s Alzheimerovou chorobou velmi snížena. Snížení této signalizace vede ke zvýšené aktivaci glykogenová kináza beta GSK-3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 Beta*), která je zodpovědná za zvýšenou fosforylaci tau proteinu a ukládání amyloidu- β . Do této cesty řízení spadají také komplexy mTOR, protože jsou aktivovány PI3K/Akt. Bylo zjištěno, že zvýšené množství amyloidu- β koreluje se sníženým výskytem mTOR. Z toho vyplývá, že zvýšená aktivace mTOR by mohla znamenat zlepšení přenosu vzruchu mezi synapsemi a zlepšení paměti u pacientů s Alzheimerovou chorobou.

Pozastavit neurodegenerativní onemocnění lze provést nepřímou aktivací nukleárního faktoru NRF2 přes AMPK nebo PI3K/AKT. Navíc aktivovaná AMPK inhibuje serin/threoninovou kinázu GSK-3 β a zvyšuje aktivitu autofagie (Akhtar, 2020).

V porovnání s neurodegenerativními onemocněními, které jsou spojeny se stářím, se při Alzheimerově chorobě v mozku více akumulují autofagické vakuoly a nacházíme také vyšší počty dystrofických neuritů, které tyto vakuoly obsahují. Množství nestrávených proteinů představuje velkou zátěž pro mozek, protože způsobuje axonální dystrofii a přispívá tak k rozvoji Alzheimerovy choroby. Těchto autofagických vakuol stále přibývá, i když je indukována autofagie

rapamycinem a exprese lysozomálních hydroláz. Lysozomy v dystrofických neuritech jsou schopné s akumulujícími se autofagickými vakuolami fúzovat, ale selhávají při degradaci jejich obsahu.

Již zmíněný transmembránový protein presenilin-1 je katalytickou podjednotkou γ -sekretázy, ale také hraje roli při okyselení lysozomů, které je nezbytné pro aktivaci lysozomálních proteáz během autofagie. Tuto funkci znemožňuje abnormálně zvýšená hladina autofagických substrátů, narušené zrání a snížená aktivita katepsinu. Vzhledem k tomu, že autofagie je esenciální pro přežití neuronů, lysozomální poruchy vedou k patologii neuronů a urychlují jejich smrt.

Kromě dysfunkce lysozomů, může k narušení autofagie vést i zvýšená exprese APP, což vede k akumulaci autofagozomů, které obsahují částečně natrávený materiál. O selhání autofagie svědčí výskyt LC3-II, ubikvitinovaných proteinů a β -amyloidový peptidů v autofagozomech. Tento stav se může zlepšit zvýšením účinnosti lysozomálních proteolytických enzymů, expresí katepsinu B a cytotstatinu C (Nixon, 2011).

4.2 Huntingtonova choroba

Huntingtonova choroba je progresivní, autosomální neurodegenerativní onemocnění způsobené opakováním tripletu CAG v genu kódující glutamin v proteinu, který se nazývá huntingtin. Tato mutace způsobuje hromadění glutaminu na N-konci huntingtinu. Po štěpení huntingtinu mohou právě tyto tvořit oligomery a následně agregáty, které jsou toxické pro nervovou tkáň. Fosforylace proteinů, které způsobují neurodegeneraci, neovlivňuje přímo proces autofagie, ale může usnadnit autofagickou degradaci těchto proteinů. Mutantní huntingtin je substrát pro autofagii, tudíž léčba rapamycinem úspěšně zvýšila huntingtinovou clearance. Huntingtin je autofagicky degradován v celé své délce a jeho odstraňování je na autofagii plně závislé.

Bylo zjištěno, že v agregátech huntingtinu se objevuje mTOR, což zabraňuje jeho aktivitě v procesu autofagie, je tedy inhibován. I když agregáty indukují autofagii, tento proces dokáže degradovat pouze oligomerní prekurzory huntingtinových agregátů, protože agregáty jako takové jsou větší než samotný autofagozom. Jako léčba se inhibice mTOR použít nedá, protože

hraje důležitou roli i v translaci mRNA, transkripci, při vzniku ribozomů a při buněčném růstu (Sarkar, 2008).

4.3 Amyotrofická laterální skleróza

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je neurodegenerativní onemocnění asociované s akumulací a agregací chybně složených proteinů, jako je superoxid dismutáza 1 (SOD 1), TAR vázající se na DNA protein 43 (TDP-43) a gen C9ORF72. Proteiny, které jsou kódované geny asociované s touto chorobou, se chovají jako receptory pro proces autofagie, což zlepšuje pohlcení autofagických substrátů do autofagozomu. Pokud dojde k mutaci v genu pro sequestrozom 1 SQSTM/p62, který kóduje protein, který dopravuje proteiny k selektivní autofagii, naruší se autofagická degradaci mutantních SOD1 a TDP-43. Mutace proteinu optineurinu (OPTN) snižuje aktivitu autofagie a inhibuje schopnost OPTN vázat LC3 a myozin VI, čehož se využívá k přesunu autofagozomů. Spolu s kinázou TBK1 (*TANK-binding Kinase 1*) OPTN hraje roli v mitofagii, pokud jsou mutantní, mitofagie je nefunkční. Tyto mutace také narušují navázání LC3 na autofagozom, tím se snižuje aktivita autofagie a clearance mutantních proteinů. Nejčastěji je však ALS způsobena mutací genu C9ORF72. Tento gen tvoří komplexy, které se chovají jako faktor přeměny guanosindifosfátu na guanosintrifosfát, čímž se aktivuje Rab8 a Rab39 a ty následně figurují v maturaci autofagozomu a interagují s autofagickými receptory. Dále C9ORF72 může interagovat s kinázou ULK1, která se podílí na tvorbě autofagozomu (D'Amico, 2020; Menzies, 2017).

5 ZÁVĚR

V této bakalářské práci je formou rešerše shrnut proces autofagie, jsou definovány jeho jednotlivé typy, charakterizovány proteiny a molekuly, které se do procesu zapojují a v neposlední řadě jsou zmíněny možnosti její indukce a detekce *in vitro*.

Do procesu autofagie se zapojuje celá řada proteinů a proteinových kináz, které řídí celý proces od vytvoření autofagozomu přes splynutí s lysozomem po samotnou degradaci autofagozomálního obsahu. Nejdůležitějším proteinovým komplexem pro signalizaci autofagie je mTOR. Pokud je tento komplex z nějakého důvodu vyřazen, spuštění autofagie může probíhat přes signalizační molekulu AMPK.

Za fyziologických podmínek i patologických stavů může být autofagie indukována uměle látkami, které působí na tyto signalizační kaskády, například metformin, trehalóza nebo lithium.

V práci jsou zároveň shrnuty i metody využitelné k detekci autofagie. Nejčastěji se jedná o imunoanalytické metody, obrazovou cytometrii nebo transmisní a fluorescenční mikroskopii.

Narušení procesu autofagie je spojeno s celou řadou onemocnění. Zejména se jedná o onemocnění nervové soustavy, která jsou způsobena hromaděním nežádoucích toxických proteinů určených k autofagické degradaci.

6 POUŽITÁ LITERATURA

1. Akhtar A., Sah S. P.: **Insulin Signaling Pathway and Related Molecules: Role in Neurodegeneration and Alzheimer's Disease.** *Neurochemistry International.* 2020, 135, 1-11
2. Bareja A., Lee D. E., White J. P.: **Maximizing Longevity and Healthspan: Multiple Approaches All Converging on Autophagy.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2019, 7, 1-8
3. D'Amico A. G., Maugeri G., Saccone S., Federico C. et al: **PACAP Modulates the Autophagy Process in an In Vitro Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis.** *International Journal of Molecular Sciences.* 2020, 21, 1-16
4. Dash S., Aydin Y., Moroz K.: **Chaperone-Mediated Autophagy in the Liver: Good or Bad?.** *Cells.* 2019, 8, 1-31
5. Dawaliby R., Mayer A.: **Microautophagy of the Nucleus Coincides with a Vacuolar Diffusion Barrier at Nuclear-Vacuolar Junctions.** *Molecular Biology of the Cell.* 2010, 21, 4173-4183
6. Dossou S. A., Basu A.: **The Emerging Roles of mTORC1 in Macromanaging Autophagy.** *Cancers.* 2019, 11, 1-17
7. Funasaka T., Tsuka E., Wong R. W.: **Regulation of Autophagy by Nucleoporin Tpr.** *Scientific Reports.* 2012, 2, 1-9
8. Galluzzi L., Baehrecke E. H., Ballabio A., Boya P. et al: **Molecular Definitions of Autophagy and Related Processes.** *The Embo Journal.* 2017, 36, 1811-1836
9. Ghavami S., Shojaei S., Yeganeh B., Ande S. R. et al: **Autophagy and Apoptosis Dysfunction in Neurodegenerative Disorders.** *Progress in Neurobiology.* 2014, 112, 24-49

10. Hara T., Takamura A., Kishi C., Uemura S.: **FIP200, a ULK1-interacting Protein, is Required for Autophagosome Formation in Mammalian Cells.** *The Journal of Cell Biology*. 2008, 181, 497-510
11. Hönscheid P., Datta K., Muders M.H.: **Autophagy: Detection, Regulation and its Role in Cancer and Therapy Response.** *International Journal of Radiation Biology*. 2014, 90, 628-635
12. Hosseinpour-Moghaddam K., Caraglia M., Sahekbabar A.: **Autophagy Induction by Trehalose: Molecular Mechanisms and Therapeutic Impacts.** *Journal of Cellular physiology*. 2017, 233, 6524-6543
13. Chan L. L., Shen D., Wilkinson A. R., Patton W. et al: **A Novel Image-based Cytometry Method for Autophagy Detection in Living Cells.** *Autophagy*. 2012, 8, 1371-1382
14. Chen Q., Kang J., Fu C.: **The Independence of and Associations among Apoptosis, Autophagy, and Necrosis.** *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2018, 3, 1-11
15. Juste Y. R., Cuervo A. M.: **Analysis of Chaperone-Mediated Autophagy.** *Methods in Molecular Biology*. 2019, 1880, 703-727
16. Kang R., Zeh H. J., Lotze M.T., Tang D.: **The Beclin 1 Network Regulates Autophagy and Apoptosis.** *Cell death and Differentiation*. 2011, 18, 571-580
17. Karaniasios E., Stapleton E., Manifava M., Kaizuka T. et al: **Dynamic Association of the ULK1 Complex with Omegasomes During Autophagy Induction.** *Journal of the Cell Science*. 2013, 126, 5224-5238
18. Kaushal G. P., Shah S. V.: **Autophagy in Acute Kidney Injury.** *Kidney Int*. 2016, 89, 779-791
19. Khan M. I., Mohammad A., Patil G., Naqvi S.A.H. et al.: **Induction of ROS, Mitochondrial Damage and Autophagy in Lung Epithelial Cancer Cells by Iron Oxide Nanoparticles.** *Biomaterials*. 2012, 33, 1477-1488

20. Klionsky D.J., Abdelmohsen K., Abe A., Abedin M.J. et al.: **Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy.** *Autophagy.* 2016, 12, 1-222
21. Kongara S., Karantza V.: **The Interplay Between Autophagy and ROS in Tumorigenesis.** *Frontiers in Oncology.* 2012, 2, 1-13
22. Lemasters J.J., Zhong Z.: **Mitophagy in Hepatocytes: Types, Initiators and Role in Adaptive Ethanol Metabolism.** *Liver Res.* 2018, 2, 125-132
23. Lequin R. M.: **Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).** *Clinical Chemistry.* 2005, 51, 2415-2418
24. Li B., Zhou P., Xu K., Chen T. et al.: **Metformin Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis and Autophagy through ROS/JNK Signaling Pathway in Human Osteosarcoma.** *International Journal of Biological Sciences.* 2020, 16, 74-84
25. Lilienbaum A.: **Relationship between the Proteasomal System and Autophagy.** *Int J Biochem Mol Biol.* 2013, 4, 1-26
26. Liu G., Bi Y., Wang R., Wang X.: **Self-eating and Self-defense: Autophagy Controls Innate Immunity and Adaptive Immunity.** *Journal of Leukocyte Biology.* 2013, 93, 511-519
27. Lyamzaev K. G., Tokarchuk A.V., Panteleeva A. A., Milkidjanian A. Y. et al.: **Induction of Autophagy by Depolarization of Mitochondria.** *Autophagy.* 2018, 14, 921-924
28. Martinet W., De Meyer, G. R. Y., Andries L., Herman A. G. et al: **Detection of Autophagy in Tissue by Standard Immunohistochemistry: Possibilities and Limitations.** *Autophagy.* 2005, 2, 55-57
29. Menikdiwela K. R., Ramalingam L., Rasha F., Wang S. et al: **Autophagy in Metabolic Syndrome: Breaking the Wheel by Targeting the Renin-angiotensin System.** *Cell Death and Disease.* 2020, 11, 1-17

30. Menzies F. M., Fleming A., Caricasole A., Bento C. F. et al: **Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities.** *Neuron.* 2017, 93, 1015-1034
31. Mizushima N., Yoshimori T., Levine B.: **Methods in Mammalian Autophagy Research.** *Cell.* 2010, 140, 313-326
32. Nixon R. A., Yang D. S.: **Autophagy failure in Alzheimer's disease – locating the primary defect.** *Neurobiology of Disease.* 2011, 43, 38-45
33. Oh S., Choi Y., Kim J., Wehl C. C. et al: **Quantification of Autophagy Flux Using LC3 ELISA.** *Analytical Biochemistry.* 2017, 530, 57-67
34. Palhegyj A. M., Seranova E., Dimova S., Hoque S. et al.: **Biomedical Implications of Autophagy in Macromolecule Storage Disorders.** *Cell and Developmental Biology.* 2019, 7, 1-17
35. Park J., Lim C. S., Park C. A., Kaang B. K. et al: **Pain Perception in Acute Model Mice of Parkinson's Disease Induced by 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP).** *Molecular Pain.* 2015, 11, 1-12
36. Rambold A. S., Lippincott-Schwartz J.: **Mechanisms of Mitochondria and Autophagy Crosstalk.** *Cell Cycle.* 2011, 10, 4032-4038
37. Ravanan P., Srikumar I.F., Talwar P.: **Autophagy: The Spotlight for Cellular Stress Responses.** *Life Sciences.* 2017, 188, 53–67
38. Sarkar S., Floto A., Berger Z., Imarisio S.: **Lithium Induces Autophagy by Inhibiting Inositol Monophosphatase.** *The Journal of Cell Biology.* 2005, 170, 1101-1111
39. Sarkar S., Rubinsztein D. C.: **Huntington's Disease: Degradation of Mutant Huntingtin by Autophagy.** *The FEBS Journal.* 2008, 275, 1-8
40. Sarkar S., Rubinsztein D. C.: **Inositol and IP3 Levels Regulate Autophagy.** *Autophagy.* 2006, 2, 132-134
41. Tasset I., Cuervo A. M.: **Role of Chaperone-mediated Autophagy in Metabolism.** *FEBS J.* 2014, 283, 2403-2413.

42. Tavakol S., Ashrafizadeh M., Deng S., Azarian M. et al.: **Autophagy Modulators: Mechanistic Aspects and Drug Delivery Systems.** *Biomolecules.* 2019, 9, 1-41
43. Tsai H. H., Lai H. Y., Chen Y. C., Li C. F.: **Metformin Promotes Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma through the CEBPD-induced Autophagy Pathway.** *Oncotarget.* 2017, 8, 13832-13845
44. Verlhac P., Reggiori F.: **Sorting the Trash: Micronucleophagy Gets Selective.** *Journal of Cell Biology.* 2018, 217, 2605-2607
45. Vistro W. A., Zhang Y. Bai Z., Yang P. et al: **In Vivo Autophagy Up-Regulation of Small Intestine Enterocytes in Chinese Soft-Shelled Turtles during hibernation.** *Biomolecules.* 2019, 9, 1-17
46. Wang J., Yu Y., Lu K., Yang M. et al: **Silica Nanoparticles Induce Autophagy Dysfunction via Lysosomal Impairment and Inhibition of Autophagosome Degradation in Hepatocytes.** *International Journal of Nanomedicine.* 2017, 12, 809-825
47. Xin Y., Jiang F., Yang C., Yan C. et al: **Role of Autophagy in Regulating the Radiosensitivity of Tumor Cells.** *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.* 2017, 143, 2147-2157