

# Detekce autofagie pomocí průtokové cytometrie

Jana Moudrá

Ústav experimentální biologie,

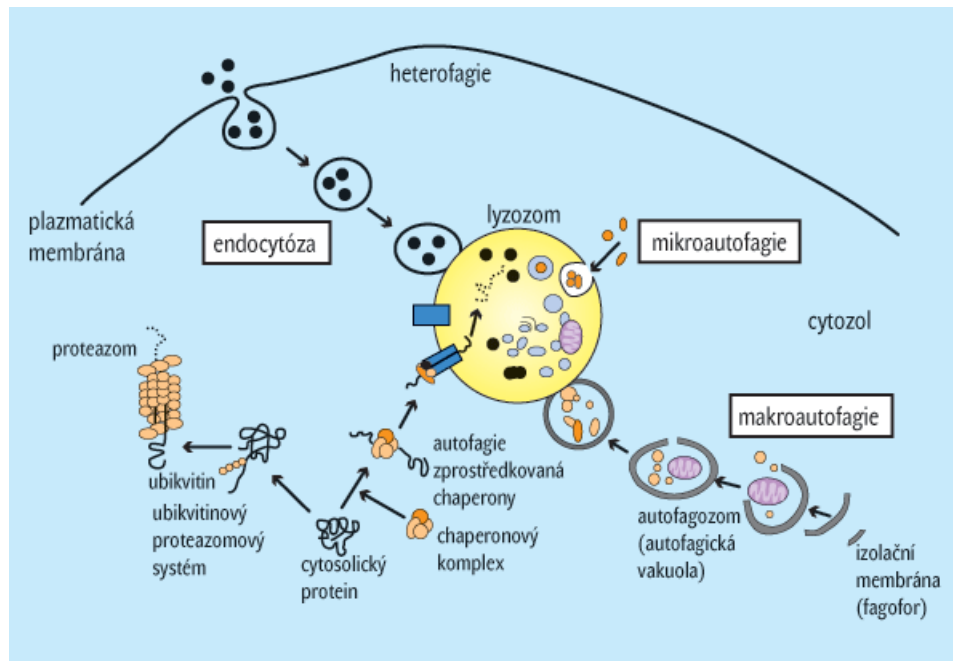
Oddělení fyziologie a imunologie živočichů

# Autofagie

- Katabolická dráha, která **degraduje makromolekuly a organely uvnitř lyzozomů**
- Mechanismus k udržení buněčné homeostázy
- Adaptační mechanismus nutný k přežívání za nepříznivých **podmínek**, extracelulárních (nedostatek živin, hypoxie, vysoká teplota) i intracelulárních (nahromadění poškozených nebo nadbytečných organel)
- Podílí se na různých fyziologických i patologických procesech

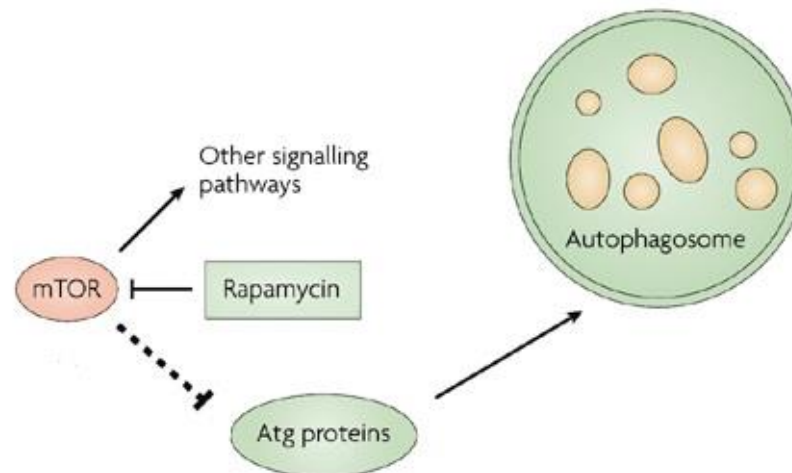
# Typy autofagie

- **Makroautofagie** – fúze autofagozomu s lyzozomem
- **Mikroautofagie** – uzavření degradovaného materiálu vychlípáním lyzozomální membrány
- **Autofagie zprostředkovaná chaperony** – bílkoviny určené k rozkladu obsahují specifický motiv, který je směřuje do lyzozomů



# Molekulární mechanismy autofagie

- Indukována po buněčném vyhladovění nebo po aplikaci rapamycinu
- Vznik, zrání a recyklace **autofagozomů** – regulace proteiny **ATG**, regulovány Ser/Thr kinázou **mTOR** (mammalian target of rapamycin)
- V případě, že zásoby živin jsou dostačující, signální dráha mTOR fosforyluje určité ATG proteiny, čímž inhibuje formaci fagoforu



# Detekce autofagie pomocí průtokové cytometrie

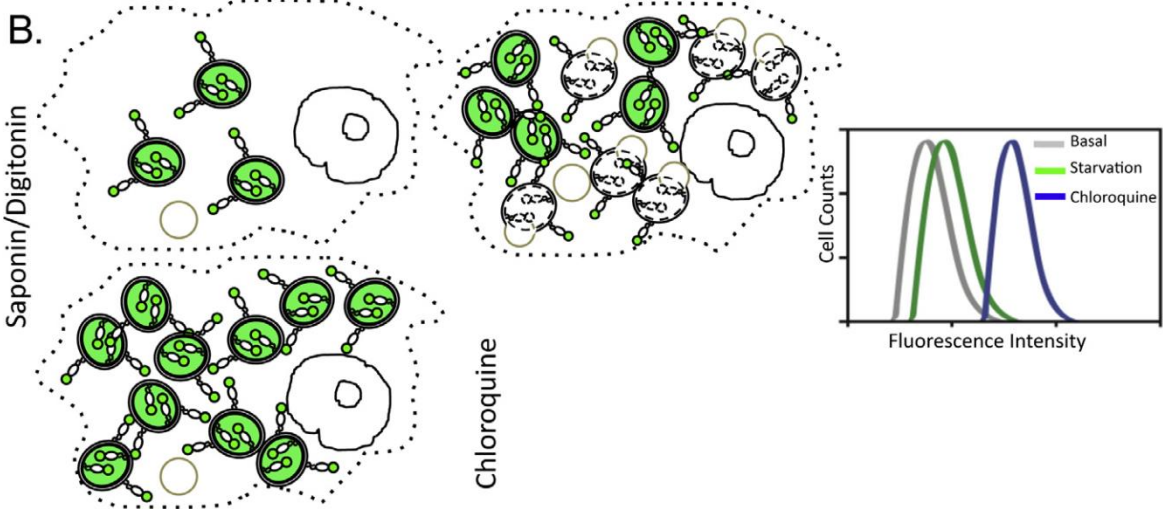
- Měří a analyzuje několik fyzikálních vlastností jednotlivých buněk současně
  - Umožňuje hodnocení autofagické aktivity jak ve fixovaných, tak i v živých buňkách a organismech
  - Dokáže měřit velké množství vzorků
- 
- Většina detekčních metod se spoléhá na měření hladiny proteinů LC3 exprimovaných na autofagozomech

# LC3 protein

- LC3 nebo MAP1LC3 (Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3) patří do genové rodiny Atg8 proteinů.
- LC3 konjuguje s fosfatidylethanolaminem, který je součástí fosfolipidové dvojvrstvy autofagozomu
- Degradace LC3 značeného fluorochromem (např. GFP-LC3) v autolyzozomu může být využita k měření autofagické aktivity  
→ měření poklesu fluorescence průtokovou cytometrií

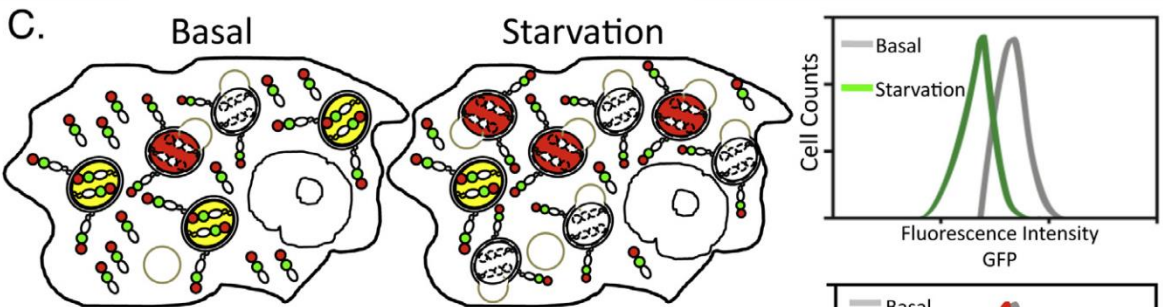


## Využití GFP k monitorování autofagické aktivity

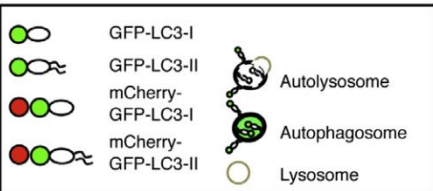


LC3-I – cytosolová forma  
LC3-II – forma asociovaná s autofagozomem

- Inkubace s inhibitory lyzozomových proteáz (Chloroquine)

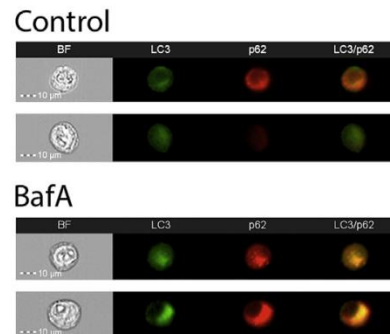
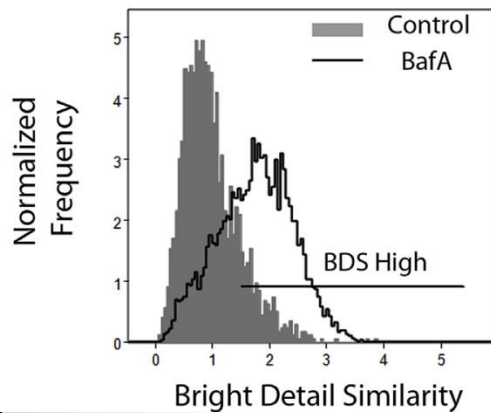
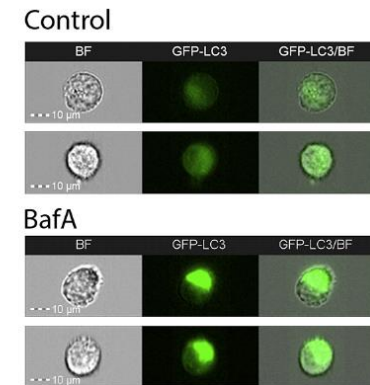
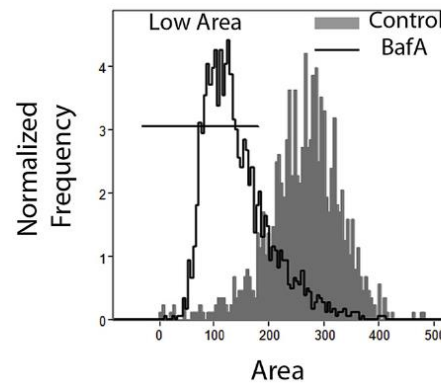


- RFP (mCherry) – méně citlivý na pH



# Zobrazovací průtoková cytometrie

- Kombinace FC a fluorescenční mikroskopie s analýzou obrazu
- ImageStream – zobrazovací průtokový cytometr
  - Umožňuje analyzovat velké množství buněk (až 5000/s)
  - Umožňuje statistické hodnocení na základě morfometrických parametrů
- BDI (bright detail intensity)
- BDS (bright detail similarity)





# Přednosti detekce autofagie pomocí průtokové cytometrie

- Možnost sledování autofagie v živých buňkách a organismech
  - Analýza obrovského množství vzorků
  - Adekvátní morfologická analýza pomocí zobrazovací průtokové cytometrie
  - Negativa: Nutnost použití ektopicky exprimovaného proteinu
- ➔ Rostoucí počet detekčních metod autofagie pomocí průtokové cytometrie

Děkuji za pozornost

