【热点】研究自噬不得不说的关键分子

自噬的整个过程中, 时刻都受到不同的自噬相关基因(autophagy-related gene, ATG)的调控, 大约已有38个自噬相关基因被发现。这些基因在酵母和哺乳动物高度保守, 是自噬发生必不可少的分子，参与了自噬发生的不同阶段。

自噬是真核细胞维持内环境稳态的一种内在平衡机制。大量证据表明自噬通路在多种疾病与生理过程中起着重要作用，如：神经系统疾病、肿瘤、心血管疾病、感染、代谢性疾病、自身免疫性疾病等等，自噬通路也就成为是很多疾病潜在的靶向治疗通路。大隅良典因“對細胞自噬機制的發現”獲得2016年度的诺贝尔生理学或医学奖。

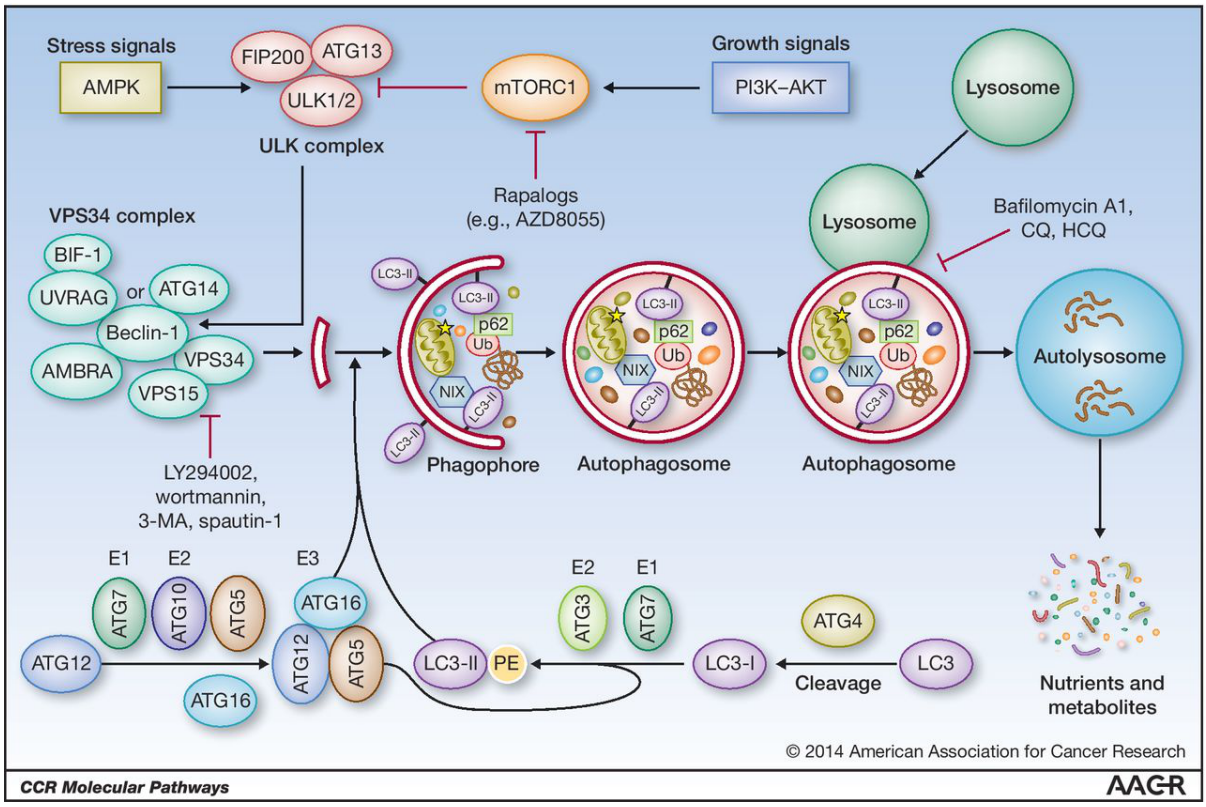
那么在自噬研究中有哪些经典热门靶点呢？今天我们就来说说大自噬Macroautophagy (也可以简称为自噬Autophagy)中的一些关键分子。

什么是自噬？

Autophagy（自噬）来自于希腊语，是auto=self和phagy=phagein=to eat的结合。细胞是怎么吃掉自己（self-eating）的呢？大致是一个通过膜将部分胞质和细胞内需降解的细胞器、蛋白质等组分包裹起来形成自噬体，后与溶酶体融合形成自噬溶酶体，最终降解其所包裹的内容物的过程。

自噬发生可以大概总结为以下几个阶段：

- 自噬泡(phagophore)的发生
- 自噬体(autophagosome)的形成
- 自噬的运输融合(fusion)：自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体
- 自噬的降解(degradation)



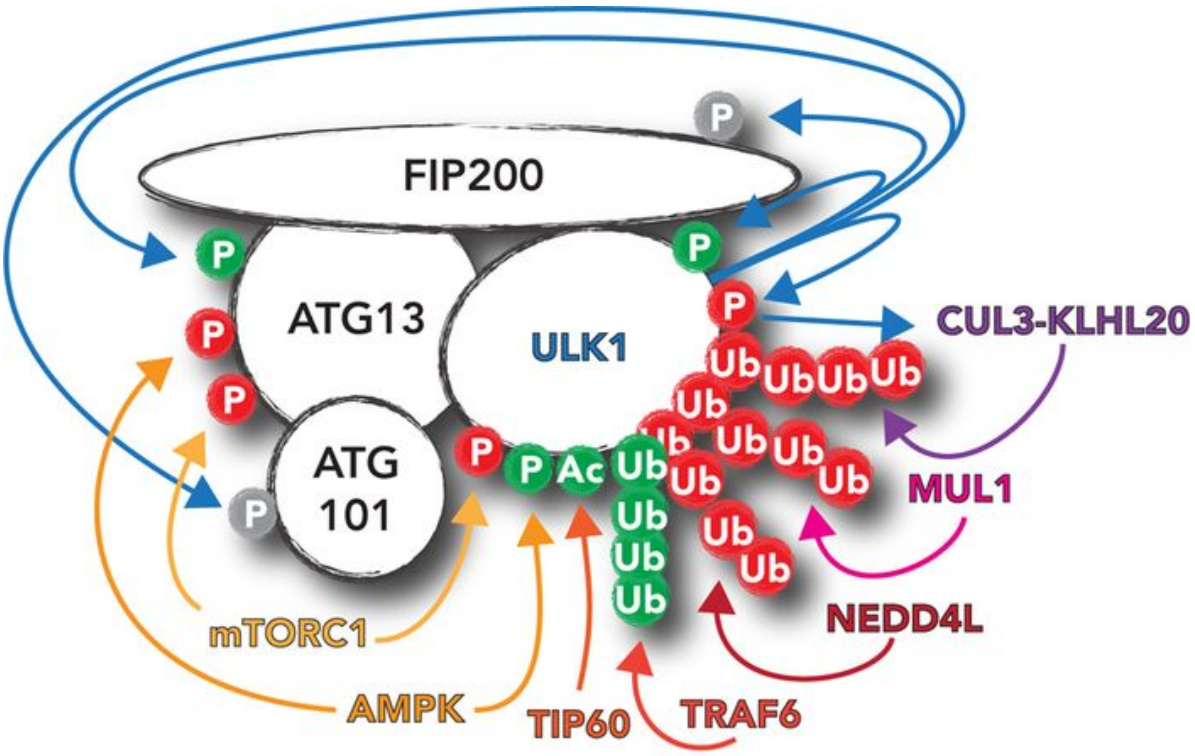
The autophagic process. (Michelle Cicchini, et al. 2015)

关键分子标志物

自噬的整个过程中，时刻都受到不同的自噬相关基因(autophagy-related gene, ATG)的调控，大约已有38个自噬相关基因被发现。这些基因在酵母和哺乳动物高度保守，是自噬发生必不可少的分子，参与了自噬发生的不同阶段。

Atg1(ULK1)蛋白激酶复合体

Atg1是第一个在酵母中被成功克隆的自噬基因,哺乳动物中的同源基因为ULK1 (unc-51-like kinase 1)。ULK1是自噬泡形成所必需的一种蛋白，以复合物的形式存在，与至少三种蛋白质组成复合物：ATG13，FIP200和ATG101。蛋白复合物的形成对维持ULK1的稳定性和激酶活性十分重要。在存在氨基酸的情况下，mTORC1具有活性并通过磷酸化ULK1和ATG13来抑制自噬。**而当营养物质缺乏时，溶酶体表面上的mTORC1活性被抑制，ULK1和ATG13快速去磷酸化，导致ULK1激酶的活化并诱导自噬发生。**在营养能量缺乏时，AMPK也可以通过磷酸化ULK1激活其活性，从而进一步促进自噬。

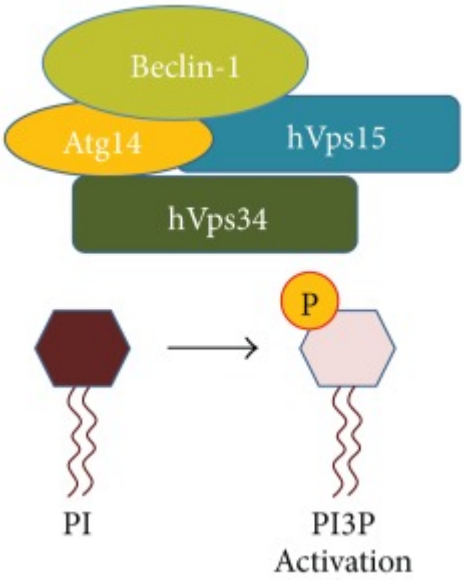


The ULK1 complex undergoes multiple modifications: phosphorylation (P), acetylation (Ac) and ubiquitylation (Ub). Modifications coloured in green suggest activation, whereas in red inhibition, of the ULK1 complex and autophagy. (Maria Zachari, et al. 2017)

Vps34（PIK3C3）-Beclin1（BECN1）复合物PI3K

Vps34是哺乳动物中的第III类PI3 Kinase（PIK3C3），磷酸化磷脂酰肌醇（PI）产生磷脂酰肌醇三磷酸（PI3P），这对于自噬泡膜的延伸和ATG蛋白向自噬泡的招募至关重要。Vps34因结合Vps15而被激活，并进一步结合Beclin-1形成Vps34-Vps15-Beclin1复合物。

Beclin1（BECN1）是酵母Atg6在哺乳动物中的同源基因。由于Beclin1与肿瘤的密切关系，成为了自噬与肿瘤关联的重要纽带。**Beclin1被ULK1磷酸化，并作为PI3K复合物的整体支架，促进自噬蛋白定位到自噬泡**。当PI3K复合物与其他不同的调节蛋白结合时，选择性地参与自噬的不同阶过程，如：与Atg14结合参与自噬泡的形成；与UVRAG结合参与自噬泡的成熟和运输等。



Phosphatidylinositol 3-kinase complex and Phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3-P) generation from phosphatidylinositol (PI).

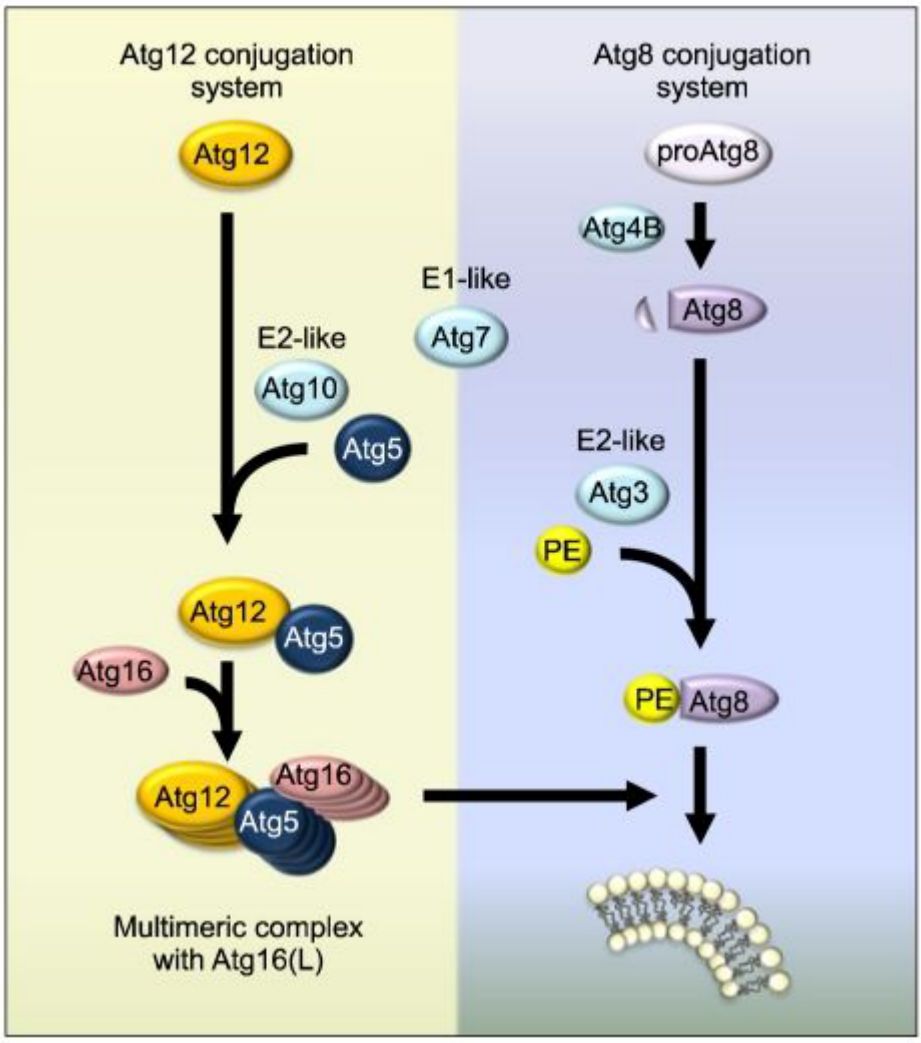
Atg12-Atg5复合物

自噬泡的延伸会形成自噬体，一般为双层膜细胞器。自噬发生过程中有两个类泛素化修饰过程, 分别发生在Atg5-Atg12系统和LC3系统中，对于自噬泡的延伸与自噬体的成熟非常重要。

Atg5是参与自噬泡中吞噬细胞膜延伸的关键蛋白，它与Atg12形成组成型的复合物。在此过程中，首先Atg7作为类E1泛素活化酶激活Atg12；然后Atg12被传递给类E2泛素转移酶Atg10；最后Atg12与Atg5结合形成复合物。之后Atg12-Atg5复合物又进一步与Atg16L结合形成Atg12-Atg5-Atg16L复合物，定位于自噬体的外膜上。Atg5-Atg12-Atg16L复合物具有类E3连接酶活性, 主要通过激活Atg3酶活性, 促进LC3（也就是Atg8）从Atg3转移到底物磷脂酰乙醇胺(PE)上。一旦自噬体形成后，Atg5-Atg12-Atg16L复合物就从膜上解离下来。

LC3-PE复合物

LC3也叫微管相关蛋白1轻链3 (microtubule- associated protein1 light chain 3，MAP1LC3)，是Atg8在哺乳动物中的同源物。包括两种可相互转化的形式即LC3-I和LC3-II，参与了自噬体膜的形成。Atg4切割早期合成的pro-LC3暴露C端甘氨酸形成胞浆可溶形式的LC3-I。诱导自噬后，LC3-I在类E1酶Atg7、类E2酶Atg3以及类E3酶Atg5-Atg12-Atg16L复合物的共同作用下与自噬体膜表面的底物PE偶联，形成膜结合形式的LC3-II。LC3-II是自噬体的重要标志分子, 随自噬体膜的增多而增加。



Atg5-Atg12 complex conjugation system and LC3-PE conjugation system. (Jong-Ok Pyo, et al. 2012)

基于LC3的自噬流检测方法

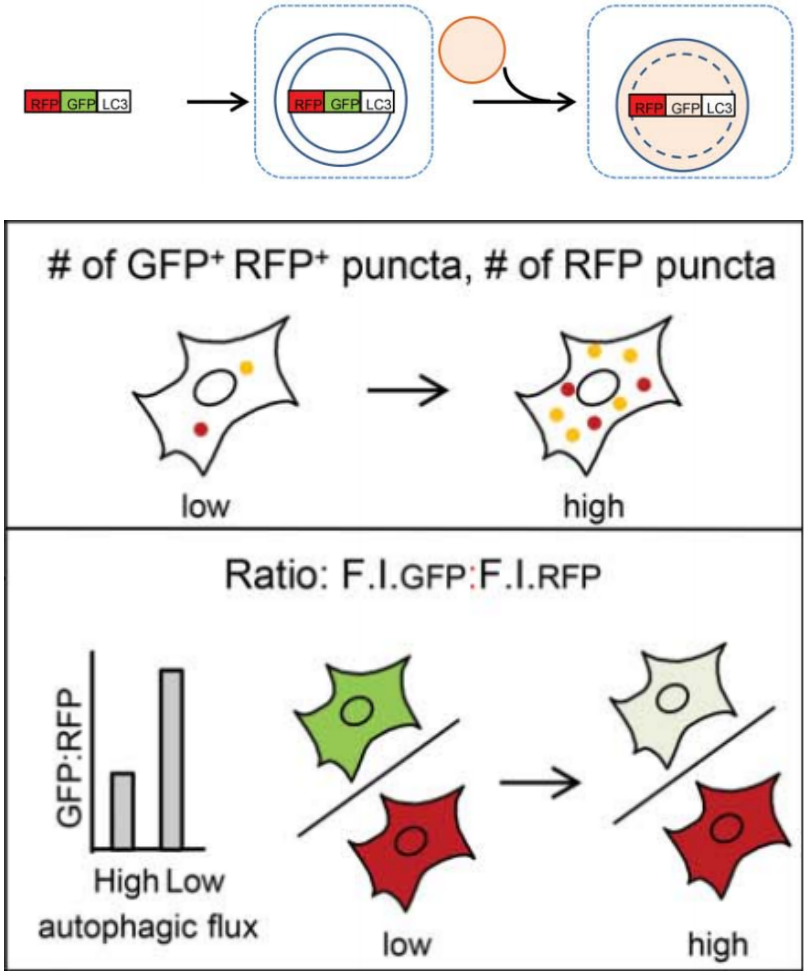
超微电镜是观察自噬现象的最直接的方法。不过，超微电镜只能提供静态信息，不能检测自噬流，也不能区分自噬体的积累是由于自噬的诱导还是下游自噬过程的阻塞。而Atg蛋白的免疫印迹分析或免疫荧光染色也存在着无法检测自噬流或不能判断自噬改变的原因的局限性。

目前用于观察自噬流变化的主流方法是LC3双荧光标记法，即细胞中同时带有RFP和GFP两种不同颜色的荧光蛋白与LC3蛋白融合，从而可以实时监测自噬体到自噬溶酶体的变化过程，监控自噬流。

其原理是：自噬体内腔pH值约为7，而溶酶体pH值约为4。自噬体与溶酶体融合后，腔室内pH降为4。利用GFP在酸性环境中淬灭、RFP则可以稳定发光的特点，来观察细胞自噬体的成熟或自噬流的变化。

当自噬发生时，自噬体被RFP与GFP同时标记，可见明亮黄色光斑（RFP+GFP+）。当自噬体成熟、自噬体和溶酶体融合时，自噬溶酶体内的pH值降低，使GFP荧光淬灭，因此只可观测到红色RFP+光斑，指示自噬溶酶体。如果自噬体与溶酶体可正常融合，那么红色RFP+光斑数量大于黄色RFP+GFP+光斑；如果自噬降解受阻，自噬体与溶酶体不能正常融合，那么仅黄色RFP+GFP+光斑增加，主要为黄色荧光。LC3双荧光基因

敲入小鼠可以用在体内实时监测自噬过程。



Mice express RFP-EGFP-LC3 or mCherry-EGFP-LC3 for measuring autophagy flux. The numbers of GFPC RFPC puncta (yellow) and RFP puncta (red) are counted. Yellow puncta represent phagophores and autophagosomes, and red puncta represent autolysosomes.（Akiko Kuma, et al. 2017）

利用自噬缺陷小鼠模型研究自噬

对Atg基因敲除小鼠的分析有助于理解体内自噬的生理作用。关键Atg基因全身性敲除纯合子小鼠往往是胚胎或新生致死的，例如：Becn1-/-小鼠在E8.5天死亡，Atg5-/-和Atg7-/-小鼠大约在出生后1天死亡。

可以利用条件性Atg基因敲除小鼠，在特定组织或特定时期阻断自噬的形成。例如：Becn1f/f; Pcp2-Cre在Purkinje细胞中敲除Becn1基因，用于研究神经退行性病变。Atg7f/f;UBC-CreERT2在他莫昔芬给药后诱导广泛性Atg7基因缺失，避免纯合子小鼠新生致死，可用于研究成年小鼠自噬缺失后的病理与生理变化，如：神经退行性病变或免疫异常等等。

或者可以将Atg基因敲除小鼠与组织特异性启动子驱动Atg基因表达的转基因小鼠交配，在特定组织中恢

复Atg基因的表达，例如：Atg5-/-;Eno2-Atg5在神经元中表达外源Atg5基因，可以挽救Atg5缺失小鼠的神经元损伤和新生致死，使大多数小鼠存活8周至8个月。

南模生物可提供的小鼠品系

Becn1-KO

Becn1-CKO

Atg5-KO

R26-(CAG-LSL-mCherry-EGFP-LC3-pA)

参考文献

Cicchini M, Karantza V, Xia B. Molecular pathways: autophagy in cancer--a matter of timing and context. Clin Cancer Res. 2015 Feb 1;21(3):498-504.

Zachari M, Ganley IG. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. Essays Biochem. 2017 Dec 12;61(6):585-596.

Pyo JO, Nah J, Jung YK. Molecules and their functions in autophagy. Exp Mol Med. 2012 Feb 29;44(2):73-80.

Kuma A, Komatsu M, Mizushima N. Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice. Autophagy. 2017 Oct 3;13(10):1619-1628.

Li L, Wang ZV, Hill JA, et al. New autophagy reporter mice reveal dynamics of proximal tubular autophagy. J Am Soc Nephrol. 2014 Feb;25(2):305-15.

Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. J Pathol. 2010 May;221(1):3-12.