

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: **Speciální chemicko-biologické obory**

Studijní obor: **Molekulární biologie a biochemie organismů**



Romana Weissová

Dynamika mitochondrií v srdečním svalu

Mitochondrial dynamics in myocardium

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: Doc. RNDr. Olga Nováková, CSc.

Praha, 2011

Chtěla bych poděkovat mé školitelce Doc. RNDr. Olze Novákové, CSc. za cenné rady a čas, který mi věnovala.

Prohlášení:

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

V Praze, 05.05.2011

Romana Weissová

Obsah

Abstrakt a klíčová slova	4
Seznam zkratk.....	6
Úvod.....	7
1 Mitochondrie v myokardu.....	8
1.1 Myokard.....	8
1.2 Mitochondrie.....	8
1.2.1 Mitochondrie v kardiomyocytech	9
2 Dynamika mitochondrií.....	11
2.1 Fúze a dělení mitochondrií.....	11
2.2 Mitofágie.....	14
2.3 Biogeneze mitochondrií.....	17
2.4 Mitochondrie během apoptózy.....	18
2.5 Mitochondrie v procesu rané ontogeneze.....	19
2.6 Mitochondrie v průběhu stárnutí.....	20
3 Dynamika mitochondrií za patologických stavů	22
3.1 Ischemicko-reperfúzní poškození srdeční tkáně.....	22
3.2 Kardiomyopatie.....	24
3.2.1 Dilatační a hypertrofická kardiomyopatie.....	24
3.2.2 Diabetická kardiomyopatie.....	25
3.3 Srdeční selhání.....	25
4 Kardioprotekce.....	26
Závěr.....	28
Seznam použité literatury.....	29

Abstrakt

Srdce je životně důležitý orgán, který pro svou energeticky náročnou činnost vyžaduje dostatečné množství aktivních mitochondrií. Udržování funkční populace těchto organel je zajišťováno mitochondriálním obratem, kam řadíme mitofágii odstraňující poškozené mitochondrie a biogenezi mitochondrií zabezpečující vznik nových organel. Také dynamické procesy fúze a dělení mitochondrií mohou přispívat k udržování funkční mitochondriální populace. Ačkoli srdeční buňky obsahují základní proteiny potřebné pro tyto děje, fúze a dělení mitochondrií nebyly dosud v kardiomyocytech jasně prokázány. Významu však nabývají tyto procesy během patologických podmínek, kdy dochází ke změnám v množství proteinů uplatňujících se v mitochondriální dynamice, a tím ke změnám fenotypu mitochondrií a následnému poškození buněk. Pochopení úlohy dynamiky mitochondrií v srdečním svalu by mohlo přispět k vývoji nových přístupů při terapii kardiovaskulárních onemocnění.

Klíčová slova

mitochondrie, srdce, mitofágie, biogeneze mitochondrií, fúze mitochondrií, dělení mitochondrií, onemocnění srdce, kardioprotekce

Abstract

The heart is an absolutely vital body organ, which requires sufficient amount of active mitochondria for its energy demanding activity. The functionality of a mitochondrial population is maintained through mitochondrial turnover, encompassing mitophagy removing damaged mitochondria and mitochondrial biogenesis responsible for the emergence of new organelles. Dynamic processes of mitochondrial fusion and fission can also contribute to the maintenance of a healthy mitochondrial population. Mitochondrial fusion and fission have not yet been proven in cardiomyocytes, although these cells possess all the proteins required for these events. These processes, however, take on the importance during pathological conditions, when changes in the amount of protein applied in the mitochondrial dynamics occur. The modification in mitochondrial phenotype leads to the cell damage. Understanding the role of mitochondrial dynamics in myocardium may contribute to the development of new heart diseases treatments.

Keywords

mitochondria, heart, mitophagy, mitochondrial biogenesis, mitochondrial fusion, mitochondrial fission, heart diseases, cardioprotection

Seznam zkratek

ADP	adenosine diphosphate	adenosindifosfát
<i>ATG</i> genes, Atg proteins - autophagy related genes, proteins		<i>ATG</i> geny, Atg proteiny - s autofágií související geny, proteiny
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
DC	dilated cardiomyopathy	dilatační kardiomyopatie
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
Drp1	dynamain-related protein 1	dynaminu příbuzný protein 1
Fis1	fission protein 1	štěpící protein 1
GTP	guanosine triphosphate	guanosintrifosfát
HC	hypertrophic cardiomyopathy	hypertrofická kardiomyopatie
IFM	interfibrillar mitochondria	interfibrilární mitochondrie
IR	ischemia-reperfusion	ischemicko-reperfúzní
LC3	microtubule-associated protein 1 light chain 3	lehký řetězec 3 proteinu 1 asociovaného s mikrotubuly
Mfn1	mitofusin 1	mitofusin 1
Mfn2	mitofusin 2	mitofusin 2
MPTP	mitochondrial permeability transition pore	mitochondriální pór s přechodnou permeabilitou
mRNA	messenger ribonucleic acid	mediátorová ribonukleová kyselina
mtDNA	mitochondrial DNA	mitochondriální DNA
mTOR	mammalian target of rapamycin	cíl působení rapamycinu u savců
mtTFA	mitochondrial transcription factor A	mitochondriální transkripční faktor A
NRF 1	nuclear respiratory factor 1	jaderný respirační faktor 1
OPA1	optic atrophy 1	optická atrofie 1
PGC-1	peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1	koaktivátor 1 receptoru γ aktivujícího proliferaci peroxizómů
PPAR α	peroxisome proliferator-activated receptor α	receptor α aktivující proliferaci peroxizómů
ROS	reactive oxygen species	reaktivní kyslíkové molekuly
SSM	subsarcolemmal mitochondria	subsarkolemální mitochondrie

Úvod

Srdce je životně důležitý orgán, který ve spolupráci s cévním systémem zajišťuje dodávku živin a kyslíku po celém těle a zároveň odvádění odpadních látek. Kontrakce srdečního svalu je velmi energeticky náročný děj. energii pro svou funkci získávají srdeční buňky aerobním metabolismem probíhajícím v mitochondriích. Tyto buněčné organely proto zaujímají přibližně 40 % objemu cytoplazmy.

Stavba a složení mitochondrií souvisí s jejich funkcí. Mitochondrie se mohou v některých ohledech lišit mezi buňkami různých tkání, ale také v rámci jedné buňky. Rozdíly mezi mitochondriemi různých buněčných typů mohou souviset s tkáňově specifickými metabolickými drahami a s různými energetickými potřebami. Proto srdeční buňky obsahují více mitochondrií, které mají hustší kristy (větší povrch vnitřní mitochondriální membrány, a tím i větší produkci energie) ve srovnání např. s buňkami jaterními. V rámci jednoho buněčného typu se mitochondrie mohou lišit v závislosti na stadiu vývoje či v reakci na patologické podmínky. Pokud jde konkrétně o kardiomyocyty, nalézáme vzájemně se lišící subpopulace mitochondrií uvnitř jedné buňky. Kromě toho, jednotlivé mitochondrie prochází dynamickými změnami tvaru a velikosti během své existence. Poškozené mitochondrie zanikají a vznikají nové.

Dynamické změny provázející mitochondrie srdečních buněk za různých okolností jsou náplní této práce.

1 Mitochondrie v myokardu

1.1 Myokard

Srdce je dutý orgán, jehož stěna je tvořena na povrchu vazivovou tkání (epikard), vnitřek vystýlá vazivová blána (endokard) a mezi nimi se nachází srdeční svalovina (myokard) tvořící hlavní funkční část srdeční stěny.

Základní funkční jednotkou srdeční svaloviny je srdeční buňka (kardiomyocyt). Nacházíme zde však i buňky jiných typů např. endotelové buňky četných krevních kapilár či buňky vaziva tvořící mezibuněčnou hmotu.

Kardiomyocyty jsou cylindrické buňky vzájemně propojené do funkčního celku. Obsahují zpravidla jedno centrálně umístěné jádro, v některých buňkách však najdeme jádra dvě. V blízkosti jádra, a to zejména na jeho pólech, nalezneme většinu buněčných organel. V prostoru mezi jádrem a cytoplazmatickou membránou se nachází množství myofibril tvořících vlastní kontraktální aparát. Ten je tvořen tenkými aktinovými a silnými myozinovými vlákny, jejichž vzájemným pohybem dochází ke změně délky celého svalu, a tím ke stahu. Vzhledem k energetickým nárokům myofibril zde existuje mnoho velkých vymezených mitochondrií a glykogenových granul.

K pokrytí energetických potřeb využívají kardiomyocyty oxidační fosforylaci probíhající v mitochondriích, která je závislá na trvalém přísunu kyslíku zabezpečovaném věnčitými cévami přivádějícími do srdečního svalu okysličenou krev přímo z aorty. Hlavním energetickým substrátem v srdci jsou mastné kyseliny, dále sacharidy a při hladovění ketolátky.

Svalové buňky dospělého srdce se prakticky nedělí a neobnovují, proto srdeční sval špatně regeneruje. Poškozená srdeční svalovina se hojí vazivovou jizvou, která narušuje vzájemný kontakt kardiomyocytů, a tím i kontinuitu srdečního stahu.

1.2 Mitochondrie

Mitochondrie jsou buněčné organely obsažené téměř ve všech eukaryotických buňkách. Nacházejí se v cytoplazmě a jsou místem tvorby energie pro buněčné pochody. Není to však jejich jediná funkce. Mitochondrie se účastní také signalizace, buněčné diferenciaci, buněčné smrti, udržování homeostázy vápníku a dalších významných dějů.

Mitochondrie bývají popisovány jako elipsoidní útvary velikosti 1µm, jsou to však

útvary vysoce dynamické nestálého tvaru a velikosti. Mitochondrie jsou obaleny dvěma membránami. Obě tyto membrány sestávají z dvojvrstvy fosfolipidů a z proteinových komponent. Vnější mitochondriální membrána je hladká a svým složením podobná plazmatické membráně. Obsahuje protein porin, který ji činí dobře propustnou pro ionty a molekuly do 10 kDa. Vnitřní membrána mitochondrií obsahuje vysoké zastoupení membránových proteinů, je hojně zprohýbána do útvarů označovaných jako kristy a její propustnost je omezena na plyny (O_2 , CO_2) a vodu. Mezi těmito dvěma membránami se nachází tzv. mezimembránový prostor obsahující řadu specifických molekul (cytochrom c). Vnitřní membrána ohraničuje tzv. mitochondriální matrix, gelovitou hmotu vyplňující vnitřek mitochondrií. V této oblasti nalezneme mnoho důležitých enzymů (např. enzymy citrátového cyklu) a také několik kopií mitochondriální DNA (mtDNA).

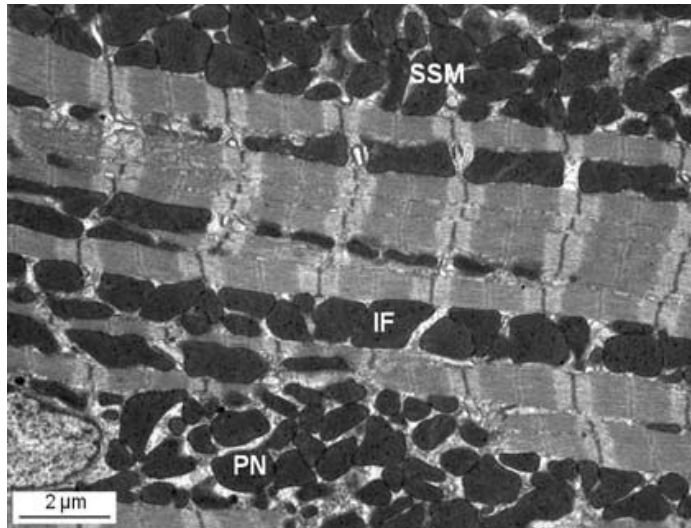
Mitochondrie jsou označovány jako semiautonomní organely, neboť obsahují vlastní genetickou informaci a také vlastní aparát pro její interpretaci. V dnešní době uznávanou teorií vzniku mitochondrií je tzv. endosymbiotická teorie považující za předchůdce mitochondrií bakterie, které pronikly v podobě endosymbiontů do dávných eukaryot. V procesu evoluce se část mitochondriálního genomu přesunula do jádra. Jádrem kódované mitochondriální proteiny se do těchto organel dopravují posttranslačně.

Mitochondrie jsou místem oxidační fosforylace. Probíhá zde aerobní odbourávání živin na CO_2 a H_2O za tvorby gradientu protonů přes vnitřní mitochondriální membránu. Tento gradient je následně využit F_0F_1 ATPázou pro tvorbu ATP. Plocha vnitřní mitochondriální membrány je regulovatelná a souvisí s energetickými potřebami buňky.

1.2.1 Mitochondrie v kardiomyocytech

V rámci kardiomyocytů rozlišujeme tři subpopulace mitochondrií: subsarkolemální (SSM), interfibrilární (IFM) a perinukleární mitochondrie (obr. 1), které se vzájemně liší lokalizací uvnitř buňky, stavbou a zřejmě i funkcí. Morfologické rozdíly mezi mitochondriemi v kardiomyocytech opic zkoumali Shimada et al (1984). Pozorovali zejména rozdíly ve tvaru mitochondrií. Zatímco perinukleární mitochondrie jsou kulovitého tvaru, IFM jsou spíše protažené a SSM mají různé tvary.

Byly zaznamenány také rozdíly mitochondriálních subpopulací na úrovni krist. Zatímco SSM obsahují převážně ploché a široké lameliforní kristy (Obr. 2), u IFM byly pozorovány v převážné většině kristy tubulární (Obr. 3) (Riva et al, 2005).

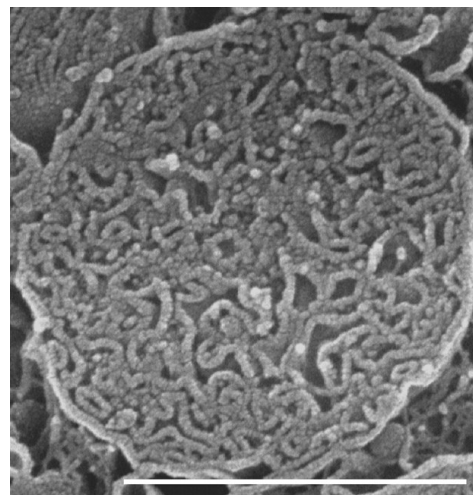


Obr. 1: Elektronoptický snímek řezů dospělého myšního srdce zobrazující tři subpopulace mitochondrií v kardiomyocytech; PN - perinukleární mitochondrie v okolí buněčného jádra; IF - interfibrilární mitochondrie natěsnané mezi myofibrilami; SSM - subsarkolemální mitochondrie umístěné pod plazmatickou membránou; (převzato z Ong & Hausenloy, 2010)

Subpopulace mitochondrií se liší také po funkční stránce. Palmer et al (1977) sledovali vyšší rychlost oxidativního metabolismu u IFM, což může patrně souviset s vysokými energetickými nároky myofibril. IFM byly také prokázány jako citlivější k působení reaktivních kyslíkových molekul (ROS) a následným apoptotickým stimulům (Kavazis et al, 2008).



Obr. 2: Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu; izolované krysí subsarkolemální mitochondrie s lamelifornními kristami; (převzato z Hoppel et al, 2009)



Obr. 3: Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu; izolované krysí interfibrilární mitochondrie s tubulárními kristami; (převzato z Hoppel et al, 2009)

2 Dynamika mitochondrií

Mitochondrie nejsou stabilní v čase ani prostoru. Tyto organely se pohybují po buňce za využití mikrotubulů, spojují se procesem fúze a opět rozdělují. Pro udržení funkčních mitochondrií je nutné odstraňovat poškozené a neaktivní mitochondrie a nahrazovat je mitochondriemi novými. K tomu slouží procesy mitofágie a biogeneze mitochondrií. Mitochondrie a jejich dynamika se významně uplatňují také při apoptotické signalizaci. Změny dynamiky mitochondrií provází srdeční sval v průběhu ontogeneze, od časného vývoje po stárnutí.

2.1 Fúze a dělení mitochondrií

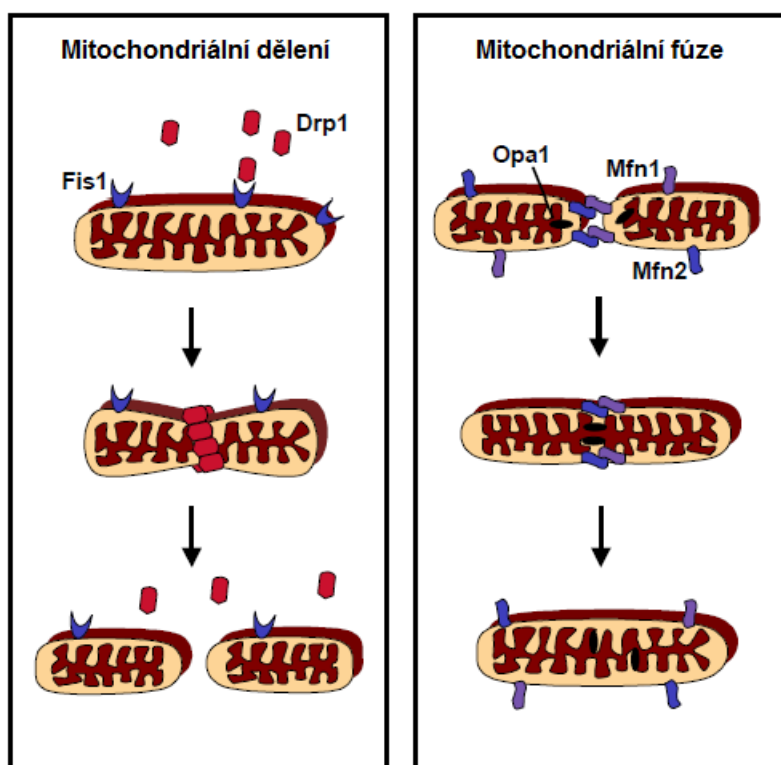
Procesy fúze a dělení mitochondrií mění velikost i tvar těchto organel a jsou pro buňku významné. Tyto děje souvisejí zejména s mísením mitochondriálního obsahu (včetně mtDNA). Dochází tak k eventuálnímu nahrazení poškozených částí jednotlivých mitochondrií, čímž se zabrání rozsáhlejším škodám (shrnuje v Kane & Youle, 2010). Fúze a dělení mitochondrií se však uplatňují i při buněčné diferenciaci, signalizaci či apoptóze.

Fúzi savčích mitochondrií zajišťují tři hlavní proteiny: mitofusin 1 (Mfn1), mitofusin 2 (Mfn2) a OPA1 („optic atrophy 1“ - mutace vede k optické atrofii typu 1 /Delettre et al, 2000/). Pro svou funkci vyžadují energii, kterou získávají hydrolýzou GTP. Mfn 1 a Mfn 2 jsou transmembránové proteiny nacházející se ve vnější mitochondriální membráně a zajišťující první krok mitochondriální fúze – fúzi vnějších membrán (Santel et al, 2003). Fúze vnitřních membrán, druhý krok při fúzi mitochondrií, je zajištěna pomocí proteinu OPA1. Je to GTPáza vyskytující se ve vnitřní mitochondriální membráně. Existuje mnoho izoform tohoto proteinu, vznikajících alternativním sestřihem mRNA (Song et al, 2007). To pravděpodobně umožňuje jemnou regulaci fúze mitochondrií v reakci na změny prostředí.

Na dělení mitochondrií se podílí zejména Drp1 („dynamamin-related protein 1“) spolu s Fis1 („fission protein 1“). Drp1 je cytozolická GTPáza, která se však přechodně váže na vnější mitochondriální membránu. Při této vazbě se pravděpodobně uplatňuje transmembránový protein Fis1 (Yoon et al, 2003). Schéma působení proteinů dělení a fúze mitochondrií je zobrazeno na obrázku 4.

Důležitost existence mitochondriální dynamiky byla potvrzena pozorováním, že myši bez Drp1 či Mfn umírají již během embryonálního vývoje (Chen et al, 2003; Ishihara et al, 2009). Neustálý koloběh fúzí a dělení by vedl k homogenitě mitochondrií, je však známo, že

mitochondrie si uchovávají funkční heterogenitu. To je možná důsledkem velmi rychlého průběhu fúze, pro niž byl navržen model „kiss and run“, tedy velmi rychlé splynutí a opětovné rozpojení (Twig et al, 2008). S touto teorií by mohlo souviset nestejněmírné mísení jednotlivých kompartmentů. Matrix, jakožto tekutá složka se mísí velmi dobře (Legros et al, 2002), zatímco u membrán by se dal očekávat pomalejší průběh. Navíc bylo zjištěno, že fúze jednotlivých membrán může probíhat odděleně (Malka et al, 2005).



Obr. 4: Schematické znázornění procesů dělení a fúze mitochondrií; Proteiny Drp1 a Fis1 se účastní dělení mitochondrií, během mitochondriální fúze hrají významnou roli zejména proteiny Opa1, Mfn1 a Mfn2; (převzato a upraveno z Sheridan & Martin, 2010)

Dynamika mitochondrií také úzce souvisí s heterogenitou membránového potenciálu udržovaného na vnitřní mitochondriální membráně. Bylo dokonce dokázáno, že potenciál vnitřní mitochondriální membrány je pro fúzi nezbytný (Legros et al, 2002). Po dělení mitochondrií vznikají dvě rozdílné dceřiné organely. Jedna z nich má vyšší membránový potenciál a vyšší pravděpodobnost fúze, zatímco druhá je depolarizovaná, a pokud svůj membránový potenciál neupraví, je vyloučena z dalších fúzí a je odkázána k odstranění mitofágií (Twig et al, 2008).

V srdci se nachází veliké množství mitochondrií, které můžeme dle umístění v buňce

dělit na SSM, IFM a perinukleární mitochondrie, jak je uvedeno výše. Zejména IFM jsou těsně napakovány mezi kontraktilní aparát, což omezuje možnost jejich pohybu a zároveň i možnost dynamiky mitochondrií v kardiomyocytech. Dynamika srdečních mitochondrií tedy pravděpodobně vykazuje určité odlišnosti, i když v srdci byly nalezeny všechny základní proteiny potřebné pro fúzi i dělení mitochondrií, některé dokonce ve zvýšené míře ve srovnání s ostatními tkáněmi (Akepati et al, 2008; Imoto et al, 1998; Santel et al, 2003; Stojanovski et al, 2004).

Ishihara et al (2009) pozorovali, že potlačení mitochondriální dynamiky vede ke zpomalení vývoje srdce. Je tedy pravděpodobné, že dynamika mitochondrií je velmi významná při přestavbě kmenových buněk v kardiomyocyty během embryonálního vývoje, kdy se fragmentované mitochondrie mění v prodloužené mitochondrie, které jsou přizpůsobeny vysokým potřebám oxidativního metabolismu v srdci (Chen et al, 2003).

Ke sledování dynamiky srdečních mitochondrií jsou často využívány buněčné kultury. Při použití nebijících HL-1 buněk, které mají fenotyp diferencovaných srdečních buněk, byla pozorována hojná dynamika mitochondrií (Beraud et al, 2009). Je však třeba dodat, že tyto buňky se liší od dospělých kardiomyocytů zejména strukturním uspořádáním. Pokud jde o dospělé kardiomyocyty, důkazy pro existenci fúze a dělení mitochondrií za klidových podmínek nejsou zatím přesvědčivé. Beraud et al (2009), kteří sledovali obarvené mitochondrie v dospělých krysích kardiomyocytech sice pozorovali drobné pohyby, ale důkazy probíhajících fúzí nebo dělení mitochondrií neobdrželi.

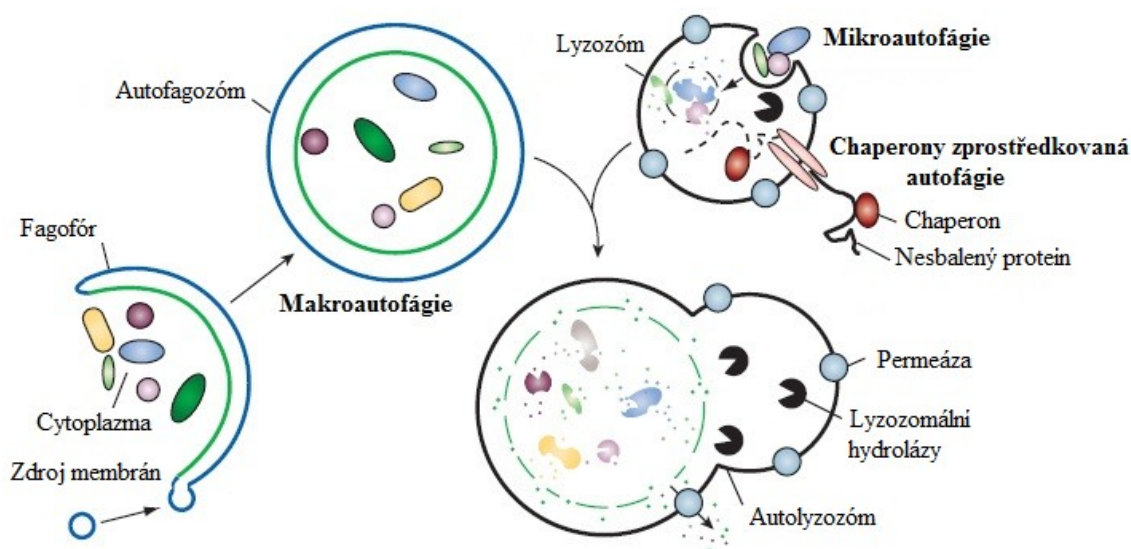
Dynamika mitochondrií v srdci však byla prokázána během změněných podmínek. Hom et al (2010) například ukázali, že zvýšená koncentrace vápenatých iontů může vést v kardiomyocytech k dělení mitochondrií. Změny hladiny proteinů mitochondriální dynamiky, a tedy změny fenotypu mitochondrií, lze pozorovat také při některých srdečních onemocněních. K fragmentaci mitochondrií dochází např. při ischemii a srdečním selhání (Chen et al, 2009; Ong et al, 2010). S abnormálně zvětšenými mitochondriemi se setkáváme zejména ve stárnoucím srdci (Terman et al, 2003).

Vzhledem k těmto patologickým změnám způsobeným porušením rovnováhy proteinů účastnících se mitochondriální dynamiky je pravděpodobné, že i během klidových podmínek hraje dynamika mitochondrií v kardiomyocytech svou roli. Je však také možné, že proteiny mitochondriální dynamiky přítomné v dospělých kardiomyocytech by se v těchto buňkách mohly uplatňovat i v jiných buněčných procesech, než je fúze a dělení mitochondrií.

2.2 Mitofágie

Autofágie je proces, při kterém sama buňka odstraňuje své komponenty. Autofágie může zachránit buňku (např. při hladovění), ale může také způsobit buněčnou smrt (např. při nadměrném odstranění esenciálních buněčných komponent). Autofágií lze dělit na mikroautofágií, makroautofágií a autofágií zprostředkovanou chaperony (Obr. 5). Během mikroautofágie dochází ke směrování složek cytozolu přímo do lyzozómu. Chaperony zprostředkovaná autofágie využívá chaperony k selektivnímu vychytávání zejména proteinů, které následně cílí do lyzozómů. Makroautofágie představuje proces, při kterém dochází ke vzniku membránového útvaru fagofóru, který obklopí odstraňovaný obsah za vzniku autofagozómu tvořeného dvojitou membránou, který následně splývá s lyzozómem (shrnutí v Mizushima et al, 2008). Touto cestou dochází nejčastěji k odstraňování organel, odstranění mitochondrií se nazývá mitofágie (shrnutí v Gottlieb & Carreira, 2010).

Za společný rys mitochondrií určených k degradaci pomocí mitofágie se považuje depolarizace. Zdá se, že mitofágie je úzce spojena s procesy fúze a dělení mitochondrií. Význam mitochondriální dynamiky během mitofágie podporuje i pozorování, že inhibice mitochondriálního dělení či zvýšená aktivace mitochondriální fúze vede ke snížení procesu mitofágie (Twig et al, 2008). Jak již bylo řečeno, po dělení mitochondrií vznikají dvě nestejně dceřiné organely, z nichž jedna má snížený membránový potenciál, a také sníženou



Obr. 5: Schematické znázornění tří druhů autofágie: makroautofágie vedoucí ke vzniku membránového útvaru - autofagozómu, mikroautofágie směřující odstraňovaný obsah přímo do lyzozómu a autofágie zprostředkovaná chaperony; (převzato a upraveno z Mizushima et al, 2008)

pravděpodobnost následující fúze (sníženou hladinu molekuly důležité pro fúzi mitochondrií OPA1) (Twig et al, 2008). Tyto mitochondrie se stávají cílem mitofágie.

Autofágie může být neselektivní, jak je tomu při pohlcování buněčných komponent během hladovění. Za těchto podmínek je autofágie projevem snahy o přežití, kdy jsou buněčné složky pohlcené autofagozómem recyklovány a využity jako zdroj stavebních kamenů pro další buněčné pochody. Neselektivní mitofágie byla pozorována i v srdci (Kanamori et al, 2009).

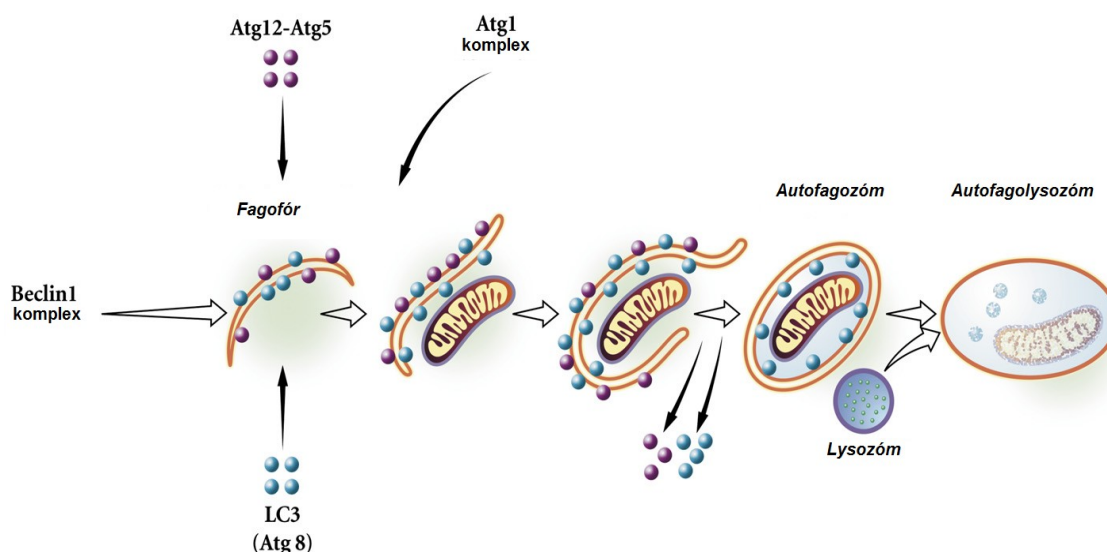
Carreira et al (2010) ukázali, že při mitofágii zprostředkované hladověním hraje klíčovou roli MPTP („mitochondrial permeability transition pore“). Otevření tohoto komplexu činí vnitřní mitochondriální membránu propustnou pro molekuly do velikosti 1500 Da, což vede k depolarizaci a ke ztrátě funkční oxidativní fosforylace. Depolarizace a případné uvolnění některých molekul z mitochondrií vede k mitofágii. Roli při otevírání MPTP by mohly hrát i ROS.

Autofágie může probíhat také selektivně. Konkrétně selektivní mitofágie odstraňuje poškozené či nadbytečné mitochondrie. Zejména dýchací řetězec mitochondrií produkuje ROS, čímž se tyto organely vystavují možnému poškození. ROS jsou velmi reaktivní částice, které mají fyziologickou úlohu např. jako signální molekuly (Nemoto et al, 2000), ale které mohou ve vysoké koncentraci vést k poškození proteinů, lipidů, ale také DNA. DNA mitochondrií je působení ROS přímo vystavena, navíc její schopnost se opravovat je nižší než u jaderné DNA, proto u ní dochází k častým mutacím (Yakes & VanHouten, 1997). Poškozené organely by mohly vést k aktivaci apoptózy, či dokonce nekrotické buněčné smrti, a proto musí být odstraněny. To zabezpečuje selektivní mitofágie.

Bylo prokázáno, že geny účastníci se autofágie, tzv. *ATG* („autophagy-related“) geny, jsou vysoce konzervovány od kvasinky až k člověku, což naznačuje význam tohoto děje. Pro vytváření autofágní membrány, tedy i pro mitofágii, byl jako nezbytný označen Beclin 1 (Atg6) spolu s třídou III fosfatidylinositol-3-kináz. Beclin 1 byl první objevenou molekulou aktivující autofágii u savců (Liang et al, 1999). Význam proteinu Beclin 1 dokazuje pokus na myších postrádajících funkční gen pro tuto molekulu, které umírají již ve formě embrya (Yue et al, 2003). Dalším důležitým regulátorem je Atg1 komplex aktivovaný inhibicí protein kinázy mTOR („mammalian target of rapamycin“) (Kamada et al, 2000). Ve vývoji autofagozómu hraje roli LC3 („microtubule-associated protein 1 light chain 3“, Atg8), jehož solubilní forma (LC3-I) se působením jiných Atg proteinů mění v membránově vázanou

formu LC3-II. Schéma utváření autofagozómu a průběhu mitofágie je znázorněno na obrázku 6.

Autofágií mitochondrií mohou zřejmě spouštět také proteiny Bnip3 a Nix, které mohou depolarizovat mitochondrie. Tyto proteiny se uplatňují také při aktivaci buněčné smrti, což naznačuje souvislost mezi těmito dvěma ději. Aktivace mitofágie přes Bnip3 byla prokázána v srdci jako reakce na ischemicko-reperfúzní (IR) poškození (Hamacher-Brady et al, 2007). Molekula Nix může vést k odstraňování mitochondrií jak přes autofágií, tak na autofagozómu nezávislou cestou (Novak et al, 2010).



Obr. 6: Schematické znázornění průběhu mitofágie s nejdůležitějšími Atg proteiny; Beclin 1 v komplexu s dalšími molekulami dává signál ke spuštění mitofágie, začíná se tvořit fagofór, který za pomoci Atg molekul roste a obklopuje pohlcovaný objekt, po vytvoření kompletního autofagozómu je většina Atg molekul recyklována, autofagozóm splývá s lysozómem za vzniku autofagolysozómu; (převzato a upraveno z Pattingre et al, 2008)

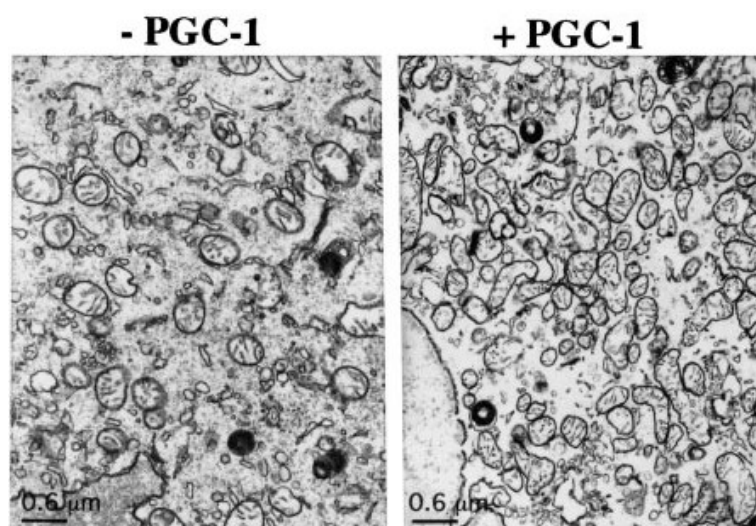
Problematika odstraňování poškozených a potenciálně nebezpečných mitochondrií se nejvíce týká dlouhověkých tkání, které musí být funkční po celý život jedince. Příkladem je srdeční tkáň, která navíc obsahuje veliké množství mitochondrií. Hromadění poškozených mitochondrií a neustálá produkce ROS by byla letální pro jednotlivé buňky a v konečném důsledku i pro celý organismus. Je tedy zřejmé, že mitofágie je pro funkci kardiomyocytů nezbytná. Význam mitofágie v kardiomyocytech dokazuje zjištění, že blokováním autofágie v srdci lze docílit apoptotické i nekrotické buněčné smrti (Terman et al, 2003).

Jak již bylo řečeno, mitofágie hraje v srdci důležitou roli. Tento fakt se silně projevuje

zejména za stresových podmínek, kdy může docházet k narušení procesu mitofágie. Zvýšenou mitofágií pozorujeme např. při hladovění, IR poškození nebo při srdečním selhání. Naopak, s věkem mitofágie klesá a neplní již tak dobře svou funkci, což by mohlo mít souvislost s procesem stárnutí.

2.3 Biogeneze mitochondrií

Pro pokrytí energetických potřeb buňky je nutné udržovat určité množství mitochondrií. Jak již bylo řečeno, mitochondrie neustále mění tvar, dělí se a zanikají. Je tedy důležité zajistit jejich doplňování vznikem nových mitochondrií. Tyto organely nejsou v buňce tvořeny *de novo*, ale vznikají růstem a následným dělením existujících mitochondrií (shrnuto v Iglewski et al, 2010). Jedná se o velmi složitý proces, během kterého musí dojít k replikaci mtDNA, syntéze mitochondriálních membrán, expresi mitochondriálních proteinů a to jak z mtDNA, tak z jaderné DNA (shrnuto v Gottlieb & Carreira, 2010).



Obr. 7: Snímky z transmisního elektronového mikroskopu zobrazující kontrolní buňky a myoblasty exprimující PGC-1, což je molekula aktivující biogenezi mitochondrií; jak je vidět, buňky s vyšším množstvím PGC-1 obsahují více mitochondrií; (převzato z Wu et al, 1999)

Hlavním aktivátorem biogeneze mitochondrií je PGC-1 („peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1“). Zmnožení mitochondrií v reakci na PGC-1 bylo pozorováno mikroskopem (obr. 7). PGC-1 zvýšil hladinu mtDNA téměř na dvojnásobek. Byla také prokázána souvislost mezi zvýšenou hladinou PGC-1 a zvýšenou respirací (Wu et al, 1999). PGC-1 interaguje s dalšími molekulami, často transkripčními faktory, jako je NRF-1

(„nuclear respiratory factor 1“) (Wu et al, 1999), který aktivuje expresi mitochondriálního transkripčního faktoru A (mtTFA) kódovaného jaderným genomem (Virbasius & Scarpulla, 1994). Tento transkripční faktor pak spouští transkripci a replikaci mtDNA. Současně PGC-1 ve spolupráci s PPAR α („peroxisome proliferator-activated receptor α “) vede ke zvýšení exprese jaderných genů kódujících mitochondriální enzymy beta oxidace mastných kyselin (Vega et al, 2000).

Funkce PGC-1 byla prokázána i v srdečním svalu. Bylo ukázáno, že zvýšená hladina PGC-1 v kardiomyocytech je odpovědí na nedostatek živin. Fyziologicky roste koncentrace PGC-1 v prvních dnech po narození, patrně v souvislosti s přestavbami kardiomyocytů. Umělé zvýšení hladiny PGC-1 vede k nekontrolovatelnému množení mitochondrií (Lehman et al, 2000).

Změny úrovně biogeneze mitochondrií mohou souviset s projevy některých srdečních onemocnění. Zvýšení hladiny PGC-1, zvýšené množství mtDNA a zvýšené množství mitochondrií bylo pozorováno během kardiomyopatie plynoucí z poškození mitochondrií a s tím související nedostatečnou produkcí energie. Jedná se patrně o snahu kompenzovat energetickou nedostatečnost, ve skutečnosti však proliferace mitochondrií v kardiomyocytech vede k dalšímu poškození a ke zhoršení kontraktility. Snížení hladiny PGC-1 a s tím související snížení mitochondriální biogeneze bylo pozorováno např. během srdečního selhání, IR poškození i dilatační kardiomyopatie (DC) (Sebastiani et al, 2007).

Deregulace mitochondriální biogeneze během některých patologických stavů poukazuje na význam tohoto děje pro kardiomyocyty, jejichž energetická náročnost vyžaduje přísnou kontrolu množství mitochondrií.

2.4 Mitochondrie během apoptózy

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je způsob odstranění poškozených, napadených či nepotřebných buněk. Na rozdíl od nekrotické buněčné smrti je tento proces přísně řízený a vede k odstranění buňky bez ovlivnění buněk sousedních a bez vzniku zánětlivé reakce. Během apoptotické signalizace hrají mitochondrie významnou roli.

V důsledku stresových událostí dochází k aktivaci proapoptotických molekul, které aktivují molekuly Bak a Bax. Ty následně tvoří oligomery ve vnější mitochondriální membráně (Kim et al, 2009), a umožní tak uvolnění molekul mezimembránového prostoru do cytozolu, což vede k aktivaci proteáz kaspáz a ke vzniku apoptotických tělísek (shrnuto v

Thornberry & Lazebnik, 1998). Během apoptózy byla pozorována fragmentace mitochondrií z velkých zesíťovaných organel na malé samostatné jednotky, což napovídá propojení mezi apoptózou a mitochondriální dynamikou (Frank et al, 2001).

Apoptóza je důležitá pro regulaci počtu buněk, k odstranění poškozených či napadených buněk a je součástí běžného vývoje většiny tkání. V postmitotických tkáních, jakou je srdeční svalovina, však dochází zřídka k nahrazování buněk, a proto zde není proces odstraňování buněk žádoucí. V kardiomyocytech byla apoptóza zaznamenána pouze během postnatálního vývoje (Kajstura et al, 1995), v dospělém srdečním svalu se nicméně apoptóza vyskytuje za určitých patologických stavů (např. IR poškození, srdeční selhání).

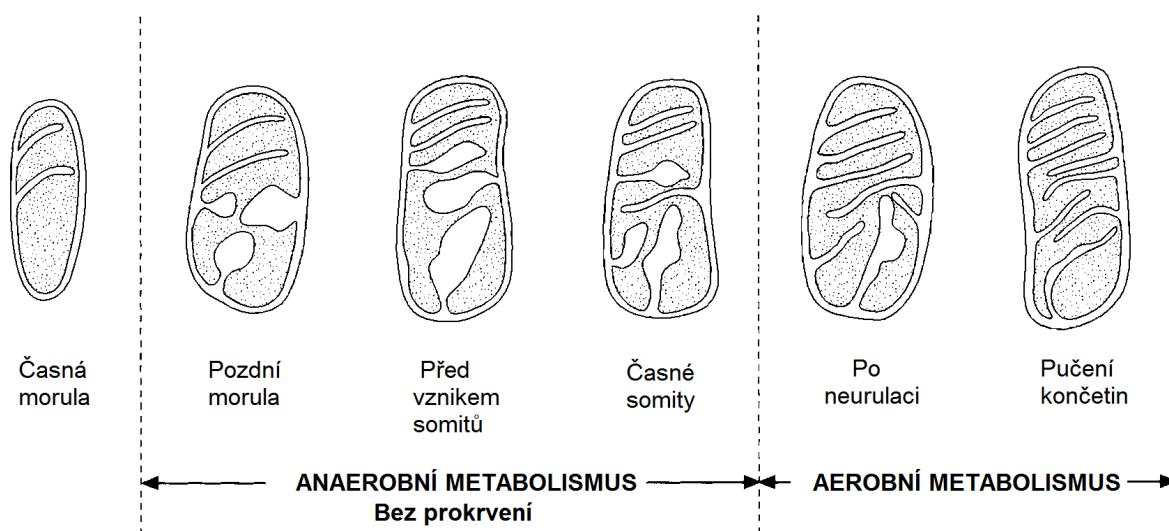
2.5 Mitochondrie v procesu rané ontogeneze

Během diferenciacie embryonálních buněk v kardiomyocyty dochází k mnoha změnám. Utváří se kontraktilní aparát, prodlužují se myofibrily i celé buňky a dochází k maturaci interkalačních disků (spojení kardiomyocytů propojující jednotlivé buňky strukturně i funkčně) (Hirschy et al, 2006). Spolu s těmito změnami dochází také k přestavbám mitochondrií a jejich krist. Množství krist se zvyšuje a jejich morfologie se posouvá od tubulárních k lameliforním (Shepard et al, 1998) (Obr. 8).

Pro srdeční sval, který je silně závislý na aerobním metabolismu, je důležitou vývojovou etapou perinatální období, kdy dochází ke změně přístupu buněk ke kyslíku, což s sebou nese posun od glykolytické k téměř výhradně aerobní tvorbě energie v mitochondriích. To bylo potvrzeno pokusy *in vitro*, kdy během prvních 63 dní postnatálního vývoje myši došlo k výraznému zvýšení spotřeby kyslíku a to zejména v přítomnosti ADP (Piquereau et al, 2010). V tomto období dochází k dalším přestavbám kardiomyocytů, které zahrnují zmnožení mitochondrií.

Postnatální růst myšího srdce rozdělili Leu et al (2001) do tří fází: hyperplazie (4 dny po narození), rychlá hypertrofie (5. až 14. den) a zpomalení hypertrofie až po fázi plató (15. - 61. den). Zatímco během hyperplazie se zvyšuje počet buněk, hypertrofický růst spočívá ve zvětšování objemu existujících buněk. Piquereau et al (2010) sledovali změny v buněčné stavbě kardiomyocytů novorozených myší. Zatímco u myší starých 3 dny bylo pozorováno velké množství cytoplazmy, myofibrily na periferii a mitochondrie zejména v okolí jádra nebo rozptýlené nepravidelně v okolí myofibril, u sedmidenních myší již bylo možno pozorovat buňky převážně naplněné myofibrilami s vmezeřenými IFM. To může mít souvislost

i s energetickými změnami, kterými musí myokard novorozence projít. Díky těsnému spojení mitochondrií a myofibril vznikajícímu během vývoje může docházet k snadnějšímu a rychlejšímu přenosu energie mezi organelami tvořícími ATP a strukturami potřebujícími ATP pro svou činnost.



Obr. 8: Znázornění vývoje srdečních mitochondrií, během kterého dochází ke zvyšování množství převážně lamelifornních krist; (převzato a upraveno z Shepard et al, 1998)

Během časně ontogeneze dochází ke vzniku srdečních mitochondrií tak, jak je známe. Roste množství mitochondrií a jejich krist, což spolu s přechodem k plně aerobnímu metabolismu zabezpečí výkonnost srdečního svalu po celý budoucí život jedince.

2.6 Mitochondrie v průběhu stárnutí

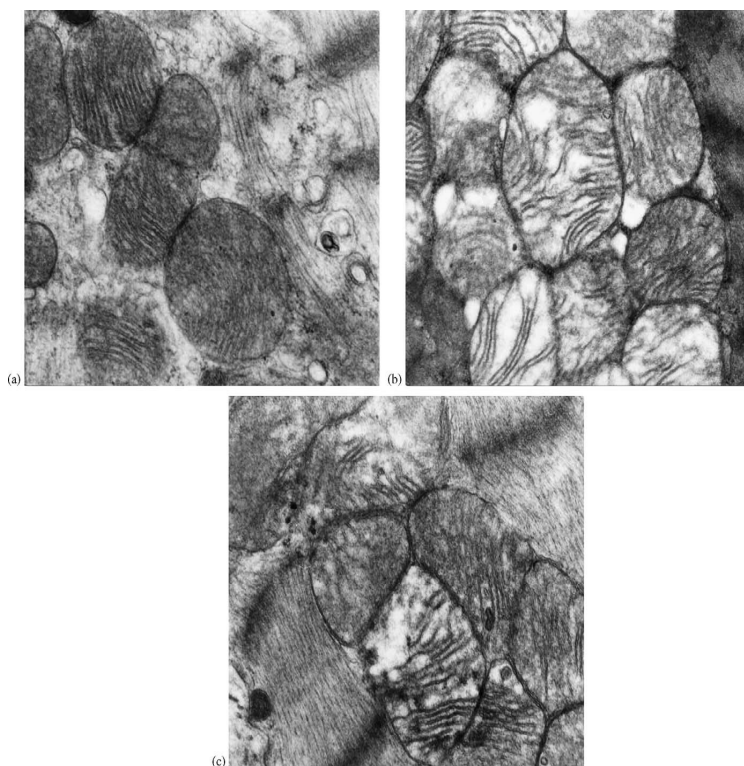
Stárnutí je proces, při kterém dochází k poškození buněk, ztrátě biologických funkcí a následně ke spuštění buněčné smrti. Tyto změny na buněčné úrovni se pak projeví poškozením celého organismu.

Možnou příčinou změn, které provázejí stárnutí, je hromadění poškozených makromolekul nezbytných pro buněčné děje, což může být následkem škodlivého vlivu ROS, jak navrhl Harman (1956). ROS vznikají v největší míře v mitochondriích jako vedlejší produkt reakcí dýchacího řetězce a poškozují proteiny, lipidy nebo např. DNA. Buňka se proti působení ROS brání pomocí antioxidantů, mezi které patří řada vitamínů, ale i enzymů jako např. superoxid-dismutáza, kataláza a glutathion-peroxidáza. Bylo zjištěno, že účinnost ochrany pomocí antioxidantů i antioxidantních enzymů se s věkem snižuje (Savitha et al,

2005).

Ve stárnoucích buňkách byly pozorovány změněné mitochondrie, které mají snížený membránový potenciál, sníženou fluiditu vnitřní mitochondriální membrány a mohou přispívat k další produkci ROS (Savitha & Panneerselvam, 2006). Během stárnutí se objevují také zvětšené mitochondrie, což patrně souvisí s poškozením mitochondriální dynamiky (Terman et al, 2003). Dochází pravděpodobně zejména k omezení mitochondriálního dělení pomocí proteinu Fis1, neboť Lee et al (2007) ukázali, že mitochondrie organismů postrádajících protein Fis1 vykazují fenotyp podobný fenotypu stárnoucích buněk. Tyto zvětšené mitochondrie jsou hůře odstraňovány mitofágií, čímž dochází k jejich akumulaci.

Během stárnutí bylo v buňkách pozorováno také hromadění lipofuscinu (Nakano et al, 1995). Lipofuscin je nedegradovatelný pigment hromadící se v lyzozómech jako produkt poškozených proteinových a lipidových zbytků po působení ROS. Zdá se, že úroveň lipofuscinu rostoucí s věkem může negativně ovlivňovat schopnost autofágie mitochondrií, a tím mitochondriální obrat (Terman et al, 1999).



Obr. 9: Snímek z elektronového mikroskopu A) srdeční mitochondrie z mladých potkanů B) srdeční mitochondrie ze stárnoucích potkanů C) stárnoucí mitochondrie po působení karnitinu a kyseliny lipoové; (převzato z Savitha & Panneerselvam, 2006)

Srdce tvořené dlouhověkými buňkami s velkým počtem mitochondrií a velkými energetickými nároky je citlivější k mitochondriálnímu poškození. Ve stárnoucích srdečních buňkách dochází k degenerativním změnám v mitochondriích pozorovatelným zejména jako ztráta krist a hromadění vakuol uvnitř těchto organel (obr. 9). Tyto změny lze omezit působením karnitinu a kyseliny lipové, které působí jako antioxidanty a snižují hladinu ROS (Savitha & Panneerselvam, 2006).

Zajímavé je zjištění, že stárnutí má odlišný vliv na subpopulace mitochondrií v srdečním svalu. Zatímco IFM vykazují významné snížení oxidační fosforylace (Fannin et al, 1999), snížení antioxidantní kapacity a s tím související zvýšenou hladinu ROS (Suh et al, 2003), v SSM nebyly zaznamenány žádné změny.

Stárnutí srdečních buněk je úzce spojeno s kardiovaskulárními nemocemi. Změny provázející stárnutí činí srdce náchylnější k vnějším i vnitřním stresům. Stárnutí srdce tak může vést k častějšímu výskytu některých onemocnění. Na druhou stranu některá onemocnění, jako diabetes nebo hypertenze, mohou stárnutí srdce zrychlovat (shrnuto v Dai & Rabinovitch, 2009).

Mitochondrie jsou jak zdrojem, tak i cílem působení ROS. Vzhledem k energetické náročnosti srdeční tkáně a počtu mitochondrií je množství ROS vyprodukované touto tkání velmi vysoké. Poškození buněk ROS se s věkem stupňuje a vede k projevům stárnutí.

3 Dynamika mitochondrií za patologických stavů

Extracelulární i intracelulární vlivy mohou způsobit změny na úrovni mitochondrií, které pak mohou vyvolávat fenotyp určitého onemocnění. Naopak některá onemocnění mohou měnit poměry v buňce, které pak mohou zpětně ovlivnit mitochondrie.

3.1 Ischemicko-reperfúzní poškození srdeční tkáně

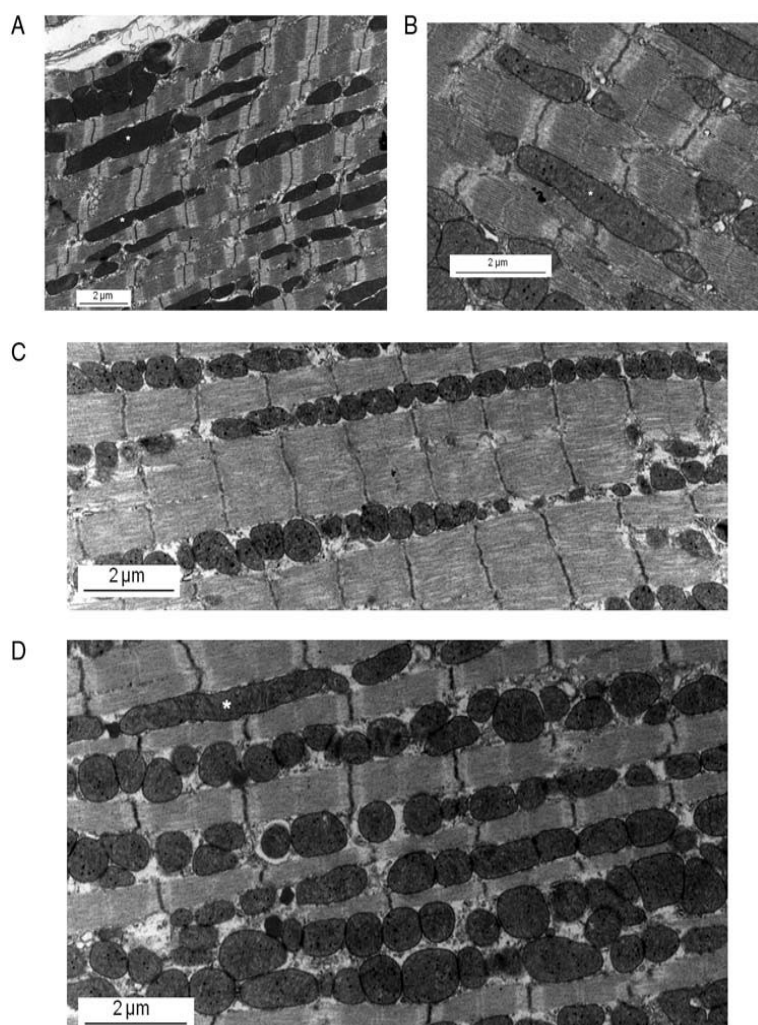
Ischemie je definována jako omezené prokrvení srdeční tkáně související se sníženým přísunem kyslíku a živin a zároveň sníženým odstraňováním zplodin metabolických pochodů. Zatímco krátká ischemie vede k cytoprotektivnímu ovlivnění, čehož se zřejmě účastní ATP dependentní K^+ kanál (Liu et al, 1998), ale i MPTP a ROS (Hausenloy et al, 2004), delší působení ischemických podmínek vede ke zvýšení hladiny vápenatých iontů a oxidačního stresu v buňce. Reperfúze neboli obnova prokrvení srdeční tkáně s sebou nese další poškození

kardiomyocytů.

Mitochondrie se významně podílejí na IR poškození ztrátou funkce a zvýšenou produkcí ROS (Zweier et al, 1987). Bylo pozorováno, že během simulované ischemie dochází k fragmentaci mitochondrií (obr. 10), která zřejmě souvisí se zvýšeným mitochondriálním dělením, kterého se účastní Drp1 molekuly (Ong et al, 2010).

Během IR podmínek se zvyšuje autofágie. Zatímco zvýšení autofágie během ischemie je reakcí na nedostatečný přísun živin a má kardioprotektivní účinky, během reperfúze je tento děj patrně spjat s buněčnou smrtí (Matsui et al, 2007).

Jednotlivé subpopulace mitochondrií se liší v citlivosti k IR poškození. SSM vykazují



Obr. 10: Elektronoptické snímky tkáňových řezů myšího srdce - A,B protažené mitochondrie myšího srdce (označeny hvězdičkou); C,D myší srdce po mírné ischemii (20 min) s většinou fragmentovanými mitochondriemi (zbylé protažené mitochondrie označeny hvězdičkou); (Ong & Hausenloy, 2010)

vyšší produkci ROS během ischemických podmínek (Ueta et al, 1990). Fragmentace mitochondrií jako odpověď na ischemii však byla prokázána na IFM (Ong et al, 2010). Chen et al (2008) pozorovali změny na úrovni elektron transportního řetězce u obou mitochondriálních populací.

Pouze aerobní produkce energie v mitochondriích, která je mnohem účinnější než anaerobní, poskytuje dostatek energie pro funkci srdce. Zabránění tomuto ději nedostatečným zásobením srdeční tkáně kyslíkem vede k energetické nedostatečnosti a k poškození buněk.

3.2 Kardiomyopatie

Existuje mnoho typů kardiomyopatií neboli onemocnění srdečního svalu. Mezi nejznámější z nich patří dilatační (DC) a hypertrofická kardiomyopatie (HC). Jiným příkladem je diabetická kardiomyopatie, která vzniká sekundárně jako následek onemocnění diabetes mellitus.

3.2.1 Dilatační a hypertrofická kardiomyopatie

U obou těchto onemocnění se snižuje kontraktilní funkce srdce. Zatímco během HC je tento problém kompenzován zesílením stěny zejména levé komory, během DC dochází spíše ke zvětšování objemu srdce. Příčiny těchto onemocnění jsou různé.

U části pacientů s DC bylo pozorováno zvýšené množství velkých mitochondrií s pozměněnými kristami a s inkluzními tělísky (Arbustini et al, 1998). Dále byly u DC pozorovány změny na úrovni molekul mitochondriální dynamiky. Zatímco hladina OPA1 a Fis1 zůstala nezměněna, Mfn1, Mfn2 a Drp1 vykazovaly zvýšenou koncentraci (Chen et al, 2009). Zároveň však bylo popsáno, že myši s mutantním proteinem Drp1 vykazují znaky DC (Ashrafian et al, 2010). Změny mitochondriální dynamiky s sebou nese také hypertrofie kardiomyocytů. Lucas et al (2003) sledovali na myším modelu HC snížený počet mitochondrií, které jsou však asi 1,5x větší než ve zdravé buňce.

Specifická inhibice autofágie v srdečních buňkách vedla k poškození kontraktility a k projevům HC (Nakai et al, 2007), což naznačuje, že během HC dochází pravděpodobně k blokování autofágie. Naopak během DC byla autofágie pozorována ve zvýšené míře (Shimomura et al, 2001).

V konečných stádiích obou typů kardiomyopatií byl sledován vysoký obsah cytochromu c v cytozolu a zvýšení aktivity kaspázy 3, což koreluje s pozorovanou apoptózou

(Narula et al, 1999). Miyata et al (2006) však spíše než apoptózu sledovali zvýšenou autofágií přecházející v buněčnou smrt. Ztráta buněk během kardiomyopatií souvisí s přechodem k srdečnímu selhání.

3.2.2 Diabetická kardiomyopatie

Onemocnění diabetes mellitus s sebou nese mnoho problémů. Jedním z nich je i tzv. diabetická kardiomyopatie (Regan et al, 1977). Diabetes činí srdeční sval náchylnější k poškození. Toto pozorování patrně souvisí se zvýšenou produkcí ROS plynoucí z vysoké hladiny glukózy v krvi. Během diabetu totiž dochází ke snížení účinnosti srdečního svalu (How et al, 2006), což má pravděpodobně za následek zrychlení buněčné respirace (Yu et al, 2006), které vede ke zvýšené produkci ROS.

Během hyperglykemických podmínek byla pozorována fragmentace mitochondrií. Vysoká koncentrace glukózy vedla ke zvýšení množství mitochondrií a zmenšení jejich velikosti. Pozorovaná fragmentace mitochondrií je závislá na proteinu Drp1 a dá se jí předcházet inhibicí jeho funkce (Yu et al, 2008). Během diabetu dochází také ke snižování počtu krist a objevují se viditelné skvrny v matrix (Shen et al, 2004). V časných stádiích diabetu byla pozorována také zvýšená biogeneze mitochondrií, což může být reakcí na poškození stávajících mitochondrií (Duncan et al, 2007; Shen et al, 2004).

Vysoká hladina ROS plynoucí z diabetických podmínek může vést k otevření MPTP a k následné buněčné smrti (Yu et al, 2008). Buněčná smrt nastává pravděpodobně apoptózou, neboť byla pozorována zvýšená aktivita kaspáz. Frustaci et al (2000) však v diabetickém srdci pozorovali jak apoptózu, tak nekrotickou buněčnou smrt. Význam ROS v poškození srdeční tkáně plynoucí z diabetických podmínek podporuje pozorování, že u myši se zvýšenou produkcí katalázy (antioxidační enzym) nedochází k poškození kardiomyotů ani mitochondrií (Ye et al, 2004).

Změny na úrovni mitochondrií jako odpověď na hyperglykemické podmínky byly pozorovány ve zvýšené míře v IFM (Dabkowski et al, 2009; Williamson et al, 2010). Příčinou změn právě u této subpopulace mitochondrií může být jejich významný podíl na zajišťování energie pro srdeční stahy, jejichž účinnost se právě při diabetu snižuje.

3.3 Srdeční selhání

Chronická onemocnění srdečního svalu, která se projevují snížením kontraktility,

změnami vápníkové homeostázy, ztrátou kardiomyocytů a jejich náhradou vazivovou tkání, mohou vést až k srdečnímu selhání. To má pak za následek selhání celého organismu v důsledku poruchy funkce srdce.

Vznik srdečního selhání je spojován s nedostatečným energetickým zásobením. U selhávajícího srdce byla pozorována jak snížená rychlost mitochondriální respirace (Sharov et al, 1998), tak i snížená hladina ATP (Shen et al, 1999).

Možný mechanismus, kterým se buňky snaží přežít za podmínek energetického omezení, je hypertrofie buněk a proliferace mitochondrií. Bylo zjištěno, že srdeční selhání vede k hromadění velkého počtu malých mitochondrií (bylo zde pozorováno snížení hladiny proteinu mitochondriální fúze OPA1) (Chen et al, 2009).

Během srdečního selhání dochází k postupné ztrátě kardiomyocytů. Otázkou však zůstává, kterou cestou k tomu dochází. Narula et al (1996) sledovali apoptózu v konečných stádiích některých srdečních onemocnění, což naznačuje, že apoptóza hraje roli i během srdečního selhání. Zajímavé je, že Akyurek et al (2001) pozorovali vyšší poměr proapoptotických ku antiapoptotickým molekulám v prvních fázích srdečního selhání oproti pozdějším stádiím. Nicméně Knaapen et al (2001) popsali spíše než apoptózu buněčnou smrt spojenou se zvýšenou autofágií. Nakayama et al (2007) předpokládali i podíl nekrotické buněčné smrti spouštěné vysokou cytozolicou hladinou vápenatých iontů.

V případech srdečního selhání bylo pozorováno poškození obou subpopulací srdečních mitochondrií na rozdíl od jiných onemocnění, jak je uvedeno výše.

4 Kardioprotekce

Jak bylo popsáno výše, mitochondrie prodělávají morfologické i funkční změny v reakci na stresové podmínky, jako je například stárnutí či některá srdeční onemocnění. Zamezení těmto změnám by mohlo zmírnit negativní dopady stárnutí či nemoci.

Vzhledem k popsaným poškozujícím účinkům ROS se nabízí možnost ochrany kardiomyocytů pomocí antioxidantů. Bylo popsáno několik pokusů, které prokázaly účast antioxidantních enzymů při zmírnění negativních projevů onemocnění. Například Shen et al (2006) ukázali, že zvýšená exprese manganové superoxid-dismutázy v myších mitochondriích vede k ochraně srdce před diabetickou kardiomyopatií. Snížení apoptotické smrti kardiomyocytů během diabetu bylo pozorováno také po podání kyseliny lipoové (Bojunga et

al, 2004). Antioxidační látka probucol potlačila apoptózu vyvolanou v důsledku IR poškození (Oskarsson et al, 2000).

Bylo prokázáno, že zabránění změnám mitochondriální dynamiky srdečního svalu, které jsou následkem některých onemocnění, by mohlo vést k jeho ochraně před následujícími poškozeními. Ong et al (2010) například ukázali, že potlačením mitochondriálního dělení během IR podmínek je možné předejít buněčné smrti.

Nedávno bylo prokázáno, že autofágie je nezbytný proces účastnící se protektivního účinku krátkých opakovaných ischemií („preconditioning“). Huang et al (2010) popsali zvýšenou autofágii jako následek „preconditioningu“ a zároveň pozorovali, že inhibice autofágie jeho protektivní účinky odstranila. Předpokládá se, že při zvýšené autofágii během „preconditioningu“ by se mohlo uplatňovat přechodné otevírání K_{ATP} či MPTP, kdy se snižuje membránový potenciál, což je jedna z předpokládaných příčin autofágie (shrnuto v Gottlieb & Gustaffson, 2010). Aktivace autofágie se tedy jeví jako další možnost stimulace kardioprotekce. Hamacher-Brady et al (2006) ukázali, že zvýšenou expresí molekuly Beclin1, která stimuluje autofágii, je možné ochránit buňky proti IR poškození. Srdeční sval může před IR poškozením ochránit také nízká hladina aktivátoru autofágie resveratrolu (Gurusamy et al, 2010). Nicméně Matsui et al (2007) ukázali, že zvýšená autofágie je protektivní pouze během ischemie, zatímco během reperfúze je spíše škodlivá. Inhibice autofágie totiž měla při reperfúzi protektivní charakter. Bylo také popsáno, že zvýšená autofágie může vést až k buněčné smrti. To potvrzuje pozorování, že působení 3-methyladeninu potlačuje autofágii a zároveň buněčnou smrt během IR poškození. Jako vhodný kardioprotektivní činitel se jeví urocortin, který potlačuje nekrózu, apoptózu i autofágii (Valentim et al, 2006).

Jak bylo popsáno výše, stárnutí i srdeční onemocnění s sebou nesou mnoho změn v dynamice mitochondrií, které společně vedou k poškození srdečních buněk. Tyto změny se týkají zejména narušení jemné rovnováhy esenciálních dějů. Není tedy jednoduché zasáhnout takovým způsobem, aby nedošlo k dalšímu rozvrácení rovnováhy a k poškození okolních buněk. Kardioprotekce založená na ovlivnění mitochondriálních dějů tedy zatím zůstává z velké části otázkou budoucnosti.

Závěr

Dynamické děje fúze, dělení, mitofágie a biogeneze mitochondrií provází život každé buňky obsahující tyto organely. Udržování funkční populace mitochondrií pomocí mitofágie a biogeneze je v srdci extrémně důležité vzhledem k významu mitochondrií pro srdeční sval. Fúze a dělení mitochondrií však v srdci nebyly dosud potvrzeny. To může být způsobeno obtížnou kultivací kardiomyocytů a problematickým pozorováním těchto buněk *in vivo*. Je však také možné, že komplikovaná organizace kardiomyocytů a speciální uspořádání mitochondrií v těchto buňkách neumožňuje splývání mitochondrií, a tím mísení jejich obsahu. Vzhledem k výskytu proteinů účastnících se fúze i dělení v dospělých kardiomyocytech a vzhledem k významu změn poměru těchto proteinů za patologických podmínek však není existence těchto dějů v kardiomyocytech vyloučena.

Během stárnutí a patologických stavů prodělává dynamika mitochondrií řadu významných změn, které mohou vést až k poškození buněk. Studium procesů souvisejících se změnami dynamiky mitochondrií během patologických stavů by mohlo vést k porozumění regulaci dynamiky v klidových kardiomyocytech a zároveň rozšířit možnosti účinné kardioprotekce. Proto je výzkum v této oblasti velmi žádoucí.

Seznam použité literatury

- Akepati VR, Muller EC, Otto A, Strauss HM, Portwich M, Alexander C (2008) Characterization of OPA1 isoforms isolated from mouse tissues. *Journal of Neurochemistry* **106**: 372-383
- Akyurek O, Akyurek N, Sayin T, Dincer I, Berkalp B, Akyol G, Ozenci M, Oral D (2001) Association between the severity of heart failure and the susceptibility of myocytes to apoptosis in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology* **80**: 29-36
- Arbustini E, Diegoli M, Fasani R, Grasso M, Morbini P, Banchieri N, Bellini O, Dal Bello B, Pilotto A, Magrini G, Campana C, Fortina P, Gavazzi A, Narula J, Vigano M (1998) Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial abnormalities in dilated cardiomyopathy. *American Journal of Pathology* **153**: 1501-1510
- Ashrafian H, Docherty L, Leo V, Towlson C, Neilan M, Steeples V, Lygate CA, Hough T, Townsend S, Williams D, Wells S, Norris D, Glyn-Jones S, Land J, Barbaric I, Lalanne Z, Denny P, Szumska D, Bhattacharya S, Griffin JL, Hargreaves I, Fernandez-Fuentes N, Cheeseman M, Watkins H, Dear TN (2010) A Mutation in the Mitochondrial Fission Gene Dnm1l Leads to Cardiomyopathy. *Plos Genetics* **6**
- Beraud N, Pelloux S, Usson Y, Kuznetsov AV, Ronot X, Tourneur Y, Saks V (2009) Mitochondrial dynamics in heart cells: Very low amplitude high frequency fluctuations in adult cardiomyocytes and flow motion in non beating HL-1 cells. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **41**: 195-214
- Bojunga J, Nowak D, Mitrou PS, Hoelzer D, Zeuzem S, Chow KU (2004) Antioxidative treatment prevents activation of death-receptor- and mitochondrion-dependent apoptosis in the hearts of diabetic rats. *Diabetologia* **47**: 2072-2080
- Carreira RS, Lee Y, Ghochani M, Gustafsson AB, Gottlieb RA (2010) Cyclophilin D is required for mitochondrial removal by autophagy in cardiac cells. *Autophagy* **6**: 462-472
- Chen HC, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *Journal of Cell Biology* **160**: 189-200
- Chen L, Gong QZ, Stice JP, Knowlton AA (2009) Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. *Cardiovascular Research* **84**: 91-99
- Chen Q, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ (2008) Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **294**: C460-C466
- Dabkowski ER, Williamson CL, Bukowski VC, Chapman RS, Leonard SS, Peer CJ, Callery PS, Hollander JM (2009) Diabetic cardiomyopathy-associated dysfunction in spatially distinct mitochondrial subpopulations. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **296**: H359-H369
- Dai DF, Rabinovitch PS (2009) Cardiac Aging in Mice and Humans: The Role of Mitochondrial Oxidative Stress. *Trends in Cardiovascular Medicine* **19**: 213-220
- Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquellec L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP (2000) Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nature Genetics* **26**: 207-210

- Duncan JG, Fong JL, Medeiros DM, Finck BN, Kelly DP (2007) Insulin-resistant heart exhibits a mitochondrial biogenic response driven by the peroxisome proliferator-activated receptor- α /PGC-1 α gene regulatory pathway. *Circulation* **115**: 909-917
- Fannin SW, Lesnefsky EJ, Slabe TJ, Hassan MO, Hoppel CL (1999) Aging selectively decreases oxidative capacity in rat heart interfibrillar mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **372**: 399-407
- Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ (2001) The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Developmental Cell* **1**: 515-525
- Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, Nadal-Ginard B, Anversa P (2000) Myocardial cell death in human diabetes. *Circulation Research* **87**: 1123-1132
- Gottlieb RA, Carreira RS (2010) Autophagy in health and disease. 5. Mitophagy as a way of life. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **299**: C203-C210
- Gottlieb RA, Gustafsson AB (2010) Mitochondrial turnover in the heart. *Biochimica et Biophysica Acta* 10.1016/j.bbamcr.2010.11.017
- Gurusamy N, Lekli I, Mukherjee S, Ray D, Ahsan MK, Gherghiceanu M, Popescu LM, Das DK (2010) Cardioprotection by resveratrol: a novel mechanism via autophagy involving the mTORC2 pathway. *Cardiovascular Research* **86**: 103-112
- Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA (2006) Enhancing Macroautophagy Protects against Ischemia/Reperfusion Injury in Cardiac Myocytes. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 29776–29787
- Hamacher-Brady A, Brady NR, Logue SE, Sayen MR, Jinno M, Kirshenbaum LA, Gottlieb RA, Gustafsson AB (2007) Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death and Differentiation* **14**: 146-157
- Harman D (1956) Aging - A theory based on free-radical and radiation-chemistry. *Journals of Gerontology* **11**: 298-300
- Hausenloy D, Wynne A, Duchon M, Yellon D (2004) Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection. *Circulation* **109**: 1714-1717
- Hirschy A, Schatzmann F, Ehler E, Perriard JC (2006) Establishment of cardiac cytoarchitecture in the developing mouse heart. *Developmental Biology* **289**: 430-441
- Hom J, Yu TZ, Yoon Y, Porter G, Sheu SS (2010) Regulation of mitochondrial fission by intracellular Ca²⁺ in rat ventricular myocytes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1797**: 913-921
- Hoppel CL, Tandler B, Fujioka H, Riva A (2009) Dynamic organization of mitochondria in human heart and in myocardial disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41**: 1949-1956
- How OJ, Aasum E, Severson DL, Chan WYA, Essop MF, Larsen TS (2006) Increased myocardial oxygen consumption reduces cardiac efficiency in diabetic mice. *Diabetes* **55**: 466-473
- Huang CQ, Yitzhaki S, Perry CN, Liu WN, Giricz Z, Mentzer RM, Gottlieb RA (2010) Autophagy induced by ischemic preconditioning is essential for cardioprotection. *Journal of Cardiovascular Translational Research* **3**: 365-373

- Iglewski M, Hill JA, Lavandero S, Rothermel BA (2010) Mitochondrial Fission and Autophagy in the normal and diseased heart. *Current Hypertension Reports* **12**: 418-425
- Imoto M, Tachibana I, Urrutia R (1998) Identification and functional characterization of a novel human protein highly related to the yeast dynamin-like GTPase Vps1p. *Journal of Cell Science* **111**: 1341-1349
- Ishihara N, Nomura M, Jofuku A, Kato H, Suzuki SO, Masuda K, Otera H, Nakanishi Y, Nonaka I, Goto YI, Taguchi N, Morinaga H, Maeda M, Takayanagi R, Yokota S, Mihara K (2009) Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nature Cell Biology* **11**: 958-U114
- Kajstura J, Mansukhani M, Cheng W, Reiss K, Krajewski S, Reed JC, Quaini F, Sonneblich EH, Anversa P (1995) Programmed cell death and expression of the protooncogene bcl-2 in myocytes during postnatal maturation of the heart. *Experimental Cell Research* **219**: 110-121
- Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *Journal of Cell Biology* **150**: 1507-1513
- Kanamori H, Takemura G, Maruyama R, Goto K, Tsujimoto A, Ogino A, Li L, Kawamura I, Takeyama T, Kawaguchi T, Nagashima K, Fujiwara T, Fujiwara H, Seishima M, Minatoguchi S (2009) Functional Significance and Morphological Characterization of Starvation-Induced Autophagy in the Adult Heart. *American Journal of Pathology* **174**: 1705-1714
- Kane LA, Youle RJ (2010) Mitochondrial fission and fusion and their roles in the heart. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* **88**: 971-979
- Kavazis AN, McClung JM, Hood DA, Powers SK (2008) Exercise induces a cardiac mitochondrial phenotype that resists apoptotic stimuli. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **294**: H928-H935
- Kim H, Tu HC, Ren DR, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJD, Cheng EHY (2009) Stepwise Activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA Initiates Mitochondrial Apoptosis. *Molecular Cell* **36**: 487-499
- Knaapen MWM, Davies MJ, De Bie M, Haven AJ, Martinet W, Kockx MM (2001) Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure. *Cardiovascular Research* **51**: 304-312
- Lee S, Jeong SY, Lim WC, Kim S, Park YY, Sun X, Youle RJ, Cho H (2007) Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 22977-22983
- Legros F, Lombes A, Frachon P, Rojo M (2002) Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Molecular Biology of the Cell* **13**: 4343-4354
- Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *Journal of Clinical Investigation* **106**: 847-856
- Leu M, Ehler E, Perriard JC (2001) Characterisation of postnatal growth of the murine heart. *Anatomy and Embryology* **204**: 217-224
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**: 672-676
- Liu YG, Sato T, O'Rourke B, Marban E (1998) Mitochondrial ATP-dependent potassium channels - Novel effectors of cardioprotection? *Circulation* **97**: 2463-2469

- Lucas DT, Aryal P, Szweda LI, Koch WJ, Leinwand LA (2003) Alterations in mitochondrial function in a mouse model of hypertrophic cardiomyopathy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **284**: H575-H583
- Malka F, Guillery O, Cifuentes-Diaz C, Guillou E, Belenguer P, Lombes A, Rojo M (2005) Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *Embo Reports* **6**: 853-859
- Matsui Y, Takagi H, Qu XP, Abdellatif M, Sakoda H, Asano T, Levine B, Sadoshima J (2007) Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion - Roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circulation Research* **100**: 914-922
- Miyata S, Takemura G, Kawase Y, Li YW, Okada H, Maruyama R, Ushikoshi H, Esaki M, Kanamori H, Li LH, Misao Y, Tezuka A, Toyo-Oka T, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H (2006) Autophagic cardiomyocyte death in cardiomyopathic hamsters and its prevention by granulocyte colony-stimulating factor. *American Journal of Pathology* **168**: 386-397
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**: 1069-1075
- Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Horii M, Mizushima N, Otsu K (2007) The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nature Medicine* **13**: 619-624
- Nakano M, Oenzil F, Mizuno T, Gotoh S (1995) Age-related changes in the lipofuscin accumulation of brain and heart. *Gerontology* **41**: 69-77
- Nakayama H, Chen X, Baines CP, Klevitsky R, Zhang X, Zhang H, Jaleel N, Chua BHL, Hewett TE, Robbins J, Houser SR, Molkenstein JD (2007) Ca²⁺- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *Journal of Clinical Investigation* **117**: 2431-2444
- Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA (1996) Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *New England Journal of Medicine* **335**: 1182-1189
- Narula J, Pandey P, Arbustini E, Haider N, Narula N, Kolodgie FD, Dal Bello B, Semigran MJ, Bielsa-Masdeu A, Dec GW, Israels S, Ballester M, Virmani R, Saxena S, Kharbanda S (1999) Apoptosis in heart failure: Release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 8144-8149
- Nemoto S, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Finkel T (2000) Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 7311-7318
- Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, Rogov V, Lohr F, Popovic D, Occhipinti A, Reichert AS, Terzic J, Dotsch V, Ney PA, Dikic I (2010) Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *Embo Reports* **11**: 45-51
- Ong SB, Hausenloy DJ (2010) Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research* **88**: 16-29
- Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM, Hausenloy DJ (2010) Inhibiting Mitochondrial Fission Protects the Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation* **121**: 2012-U2107
- Oskarsson HJ, Coppey L, Weiss RM, Li WG (2000) Antioxidants attenuate myocyte apoptosis in the remote non-infarcted myocardium following large myocardial infarction.

Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL (1977) Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *Journal of Biological Chemistry* **252**: 8731-8739

Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, Codogno P (2008) Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie* **90**: 313-323

Piquereau J, Novotova M, Fortin D, Garnier A, Ventura-Clapier R, Veksler V, Joubert F (2010) Postnatal development of mouse heart: formation of energetic microdomains. *Journal of Physiology-London* **588**: 2443-2454

Regan TJ, Lyons MM, Ahmed SS, Levinson GE, Oldewurtel HA, Ahmad MR, Haider B (1977) Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation* **60**: 885-899

Riva A, Tandler B, Loffredo F, Vazquez E, Hoppel C (2005) Structural differences in two biochemically defined populations of cardiac mitochondria. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **289**: H868-H872

Santel A, Frank S, Gaume B, Herrier M, Youle RJ, Fuller MT (2003) Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *Journal of Cell Science* **116**: 2763-2774

Savitha S, Panneerselvam C (2006) Mitochondrial membrane damage during aging process in rat heart: Potential efficacy of L-carnitine and DL alpha lipoic acid. *Mechanisms of Ageing and Development* **127**: 349-355

Savitha S, Tamilselvan J, Anusuyadevi M, Panneerselvam C (2005) Oxidative stress on mitochondrial antioxidant defense system in the aging process: Role of DL-alpha-lipoic acid and L-carnitine. *Clinica Chimica Acta* **355**: 173-180

Sebastiani M, Giordano C, Nediani C, Travaglini C, Borchi E, Zani M, Feccia M, Mancini M, Petrozza V, Cossarizza A, Gallo P, Taylor RW, d'Amati G (2007) Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. *Journal of the American College of Cardiology* **50**: 1362-1369

Sharov VG, Goussev A, Lesch H, Goldstein S, Sabbah HN (1998) Abnormal mitochondrial function in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **30**: 1757-1762

Shen WQ, Asai K, Uechi M, Mathier MA, Shannon RP, Vatner SF, Ingwall JS (1999) Progressive loss of myocardial ATP due to a loss of total purines during the development of heart failure in dogs - A compensatory role for the parallel loss of creatine. *Circulation* **100**: 2113-2118

Shen X, Zheng SR, Metreveli NS, Epstein PN (2006) Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* **55**: 798-805

Shen X, Zheng SR, Thongboonkerd V, Xu M, Pierce WM, Klein JB, Epstein PN (2004) Cardiac mitochondrial damage and biogenesis in a chronic model of type 1 diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **287**: E896-E905

Shepard TH, Muffley LA, Smith LT (1998) Ultrastructural study of mitochondria and their cristae in embryonic rats and primate (*N-nemistrina*). *Anatomical Record* **252**: 383-392

Sheridan C, Martin SJ (2010) Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion* **10**: 640-648

- Shimada T, Horita K, Murakami M, Ogura R (1984) Morphological studies of different mitochondrial populations in monkey myocardial cells. *Cell and Tissue Research* **238**: 577-582
- Shimomura H, Terasaki F, Hayashi T, Kitaura Y, Isomura T, Suma H (2001) Autophagic degeneration as a possible mechanism of myocardial cell death in dilated cardiomyopathy. *Japanese Circulation Journal-English Edition* **65**: 965-968
- Song ZY, Chen HC, Fiket M, Alexander C, Chan DC (2007) OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *Journal of Cell Biology* **178**: 749-755
- Stojanovski D, Koutsopoulos OS, Okamoto K, Ryan MT (2004) Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *Journal of Cell Science* **117**: 1201-1210
- Suh JH, Heath SH, Hagen TM (2003) Two subpopulations of mitochondria in the aging rat heart display heterogenous levels of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* **35**: 1064-1072
- Terman A, Dalen H, Brunk UT (1999) Ceroid/lipofuscin-loaded human fibroblasts show decreased survival time and diminished autophagocytosis during amino acid starvation. *Experimental Gerontology* **34**: 943-957
- Terman A, Dalen H, Eaton JW, Neuzil J, Brunk UT (2003) Mitochondrial recycling and aging of cardiac myocytes: the role of autophagocytosis. *Experimental Gerontology* **38**: 863-876
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: Enemies within. *Science* **281**: 1312-1316
- Twig G, Elorza A, Molina AJA, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *Embo Journal* **27**: 433-446
- Ueta H, Ogura R, Sugiyama M, Kagiya A, Shin G (1990) O₂⁻ spin trapping on cardiac submitochondrial particles isolated from ischemic and non-ischemic myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **22**: 893-899
- Valentim L, Lawrence KM, Townsend PA, Carroll CJ, Soond S, Scarabelli TM, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A (2006) Urocortin inhibits Beclin1-mediated autophagic cell death in cardiac myocytes exposed to ischaemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **40**: 846-852
- Vega RB, Huss JM, Kelly DP (2000) The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 1868-1876
- Virbasius JV, Scarpulla RC (1994) Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: A potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 1309-1313
- Williamson CL, Dabkowski ER, Baseler WA, Croston TL, Alway SE, Hollander JM (2010) Enhanced apoptotic propensity in diabetic cardiac mitochondria: influence of subcellular spatial location. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **298**: H633-H642
- Wu ZD, Puigserver P, Andersson U, Zhang CY, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S,

- Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**: 115-124
- Yakes FM, VanHouten B (1997) Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 514-519
- Ye G, Metreveli NS, Donthi RV, Xia S, Xu M, Carlson EC, Epstein PN (2004) Catalase protects cardiomyocyte function in models of type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes* **53**: 1336-1343
- Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA (2003) The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Molecular and Cellular Biology* **23**: 5409-5420
- Yu TZ, Robotham JL, Yoon Y (2006) Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 2653-2658
- Yu TZ, Sheu SS, Robotham JL, Yoon YS (2008) Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovascular Research* **79**: 341-351
- Yue ZY, Jin SK, Yang CW, Levine AJ, Heintz N (2003) Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 15077-15082
- Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML (1987) Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 1404-1407