

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V
PRAZE
KATEDRA BIOCHEMIE

Bakalářská práce

Autofagie v srdci
Autophagy in the heart



Katarína Šprláková

Vedoucí: Mgr. Markéta Hlaváčková

2010

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Mgr. Markéty Hlaváčkové a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Místo a datum:

Podpis:

Na tomto místě bych chtěla upřímně poděkovat Mgr. Markétě Hlaváčkové za poskytnutí vědeckých článků a cenných rad při realizaci této práce.

Obsah

Abstract.....	4
Seznam použitých zkratk.....	5
1. Úvod.....	8
1.1. Cíl práce.....	9
2. Klasifikace autofagie.....	9
3. Molekulární mechanismus autofagie.....	11
3.1. Aktivace autofagie.....	12
3.2. Formace autofagosomů.....	12
3.2.1. Atg12-Atg5 konjugační systém.....	13
3.2.2. Atg8 konjugační systém.....	14
3.3. Fúze autofagosomu s lysosomem.....	15
3.4. Degradace autofagických objektů.....	15
4. Regulace autofagie.....	16
4.1. mTOR.....	17
4.2. Beclin1.....	19
5. Autofagie a hypoxie.....	21
5.1. HIF-1 a regulace autofagie.....	23
5.2. UPR a regulace autofagie.....	24
5.3. mTOR, autofagie a hypoxie.....	26
6. Autofagie a ischemie/reperfuse.....	28
6.1. Ischemie a reperfuse.....	28
6.2. Aktivace autofagie v srdci během ischemie a reperfuse.....	29
6.3. Spouštěče autofagie během ischemie a reperfuse.....	29
6.3.1. Hladina ATP a AMPK.....	29
6.3.2. BNIP3.....	30
6.3.3. Vápník.....	31
6.3.4. Reaktivní formy kyslíku a dusíku.....	31
6.3.5. Mitochondriální permeabilní tranzitní póry.....	32
6.3.6. Stres ER a UPR.....	33
7. Autofagie a kardioprotekce.....	33
7.1. Modulace autofagie pro terapeutické účely.....	35
8. Metody stanovení autofagie.....	37
8.1. Metody monitorování rovnovážného stavu autofagie.....	37
8.2. Metody monitorování toku autofagie.....	39
9. Závěr.....	41
Seznam použité literatury.....	43

Abstract

Currently, it is growing evidence that autophagy is involved in the prevention of various diseases, which of course also includes heart diseases. This thesis is therefore aimed at clarifying the role of autophagy in the heart, especially during ischemia and subsequent reperfusion. Autophagy is a physiological cellular process by which the cell maintains homeostasis by eliminating long-lived proteins and damaged organelles. The role of autophagy during ischemia/reperfusion in the heart is complex. Predominantly it functions as a pro-survival pathway, because it protects the heart from ischemia or hypoxia. However, when triggered over, which happens during reperfusion, it may lead to cell death. In the heart autophagy is activated in response to various stimuli, such as decrease in ATP and subsequent activation of AMPK, protein Bnip3, reactive oxygen and nitrogen species, the opening of mitochondrial permeability transition pore, endoplasmic reticulum stress or unfolded protein response. (In Czech)

Keywords: autophagy, mTOR, Beclin1, hypoxia, Bnip3, unfolded protein response, ischemia/reperfusion, cardioprotection

Seznam použitých zkratek

- AMP** - adenosine monophosphate - adenosinmonofosfát
- AMPK** - AMP-activated protein kinase - AMP-aktivovaná proteinkinasa
- ARNT/HIF-1 β** - aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/ hypoxia-inducible factor
1, beta subunit
- ATF6** - activating transcription factor 6 - aktivační transkripční faktor 6
- ATG** - autophagy-related genes - geny podílející se na procesu autofagie
- Atg** - produkty ATG genů
- ATP** - adenosine-5'-triphosphate - adenosin-5'-trifosfát
- Bcl-2** - B-cell lymphoma protein 2 - protein 2 lymfomu B-buněk
- BiP** - binding immunoglobulin protein - protein vázající imunoglobuliny
- BNIP3** - Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 - protein 3 interagující
s 19 kDa proteinem komplexu Bcl-2/adenovirus E1B
- CMA** - chaperone-mediated autophagy - chaperonem zprostředkovaná autofagie
- Cvt** - cytosol to vacuole targeting pathway - dráha směřující cytosol do vakuoly
- DEPTOR** - DEP domain-containing protein 6, DEPDC6 - protein 6 obsahující DEP
doménu
- eEF2** - eukaryotic elongation factor 2 - eukaryotický elongační faktor 2
- eEF2K** - eukaryotic elongation factor-2 kinase - kinasa eukaryotického elongačního
faktoru 2
- eIF2 α** - eukaryotic initiation factor 2 α - eukaryotický iniciační faktor 2 α
→ **eIF4E** - eukaryotický iniciační faktor 4E
→ **eIF4F** - eukaryotický iniciační faktor 4F
- 4E-BP** - eukaryotic initiation factor 4E binding protein - protein vázající eIF4E
- ER** - endoplasmic reticulum - endoplasmatické retikulum
- FOXO3** - Forkhead box O3
- GAP** - GTPase-Activating Protein - GTPasu aktivující protein
- G β L/mLST8** - G-protein β -subunit like protein/mammalian LST8 - komplex proteinu
podobného β -podjednotce G-proteinu a savčího LST8
- GFP** - green fluorescent protein - zelený fluorescenční protein
- GTP** - guanosine-5'-triphosphate - guanosin-5'-trifosfát
- HIF** - hypoxia inducible factor - hypoxií indukovaný faktor

H₂O₂ - peroxid vodíku

I/R - ischemia/reperfusion - ischemie/reperfuse

IRE1 - inositol requiring protein kinase 1 - proteinkinasa 1 vyžadující inositol

JNK - c-Jun N-terminal protein kinase - c-jun N-terminální proteinkinasa

LAMP-2a - lysosome-associated membrane protein type 2a - s lysosomem asociovaný
membránový protein typu 2a

LPS - lipopolysacharides - lipopolysacharidy

3-MA - 3-methyladenine - 3-methyladenin

MAP4K3 - mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3 - mitogenem aktivována
proteinkinasa 3

MAP-LC3 (zkr. **LC3**) - microtubule-associated protein 1 light chain 3 - lehký řetězec 3
proteinu 1 asociovaného s mikrotubuly

mETC - mitochondrial electrons transfer chain - mitochondriální elektronový transportní
řetězec

mPTP - mitochondrial permeability transition pore - mitochondriální permeabilní tranzitní
pór

mTOR - mammalian target of rapamycin - savčí homolog TOR
→ mTOR vytváří 2 proteinové komplexy: **mTORC1** a **mTORC2**

PAS - pre-autophagosomal structure - pre-autofagosomální struktura

PCD - programmed cell death - programovaná buněčná smrt

PE - phosphatidyl-ethanolamin - fosfatidylethanolamin

PERK - PKR-like ER kinase - PKR-podobná ER kinasa

PI - phosphatidylinositol - fosfatidylinositol

PI3P - phosphatidylinositol-3-phosphate - fosfatidylinositol-3-fosfát

PI3K - phosphatidylinositol 3-kinase - fosfatidylinositol-3-kinasa
→ PI3K třídy I
→ PI3K třídy III = **hVps34** (u kvasinek Vps34) - Vps - vacuolar protein-
sorting - třídění proteinů ve vakuole

PIKK - phosphatidylinositol kinase-related kinase family - kinasová rodina příbuzná
s PI3K

PKB/Akt - protein kinase B - proteinkinasa B

PKCδ - protein kinase C δ - proteinkinasa C δ

PKR - protein kinase R - proteinkinasa R

PRAS40 - proline rich Akt 40 kDa substrate - 40 kDa substrát Akt bohatý na prolin

PRR5/protor - proline-rich protein 5 - protein 5 bohatý na prolin

p70S6K nebo **S6K** - ribosomal p70 S6 protein kinase - ribosomalní p70 S6 proteinkinasa

REDD1 - protein regulated in development and DNA damage response 1

Rheb - GTPase Ras homolog enriched in brain - homolog GTPasy Ras obohacený v mozku

RICTOR - rapamycin-insensitive companion of mTOR - součást mTOR nereagující na rapamycin

ROS - reactive oxygen species - reaktivní formy kyslíku

Sin1 - stress-activated MAP kinase-interacting protein 1 - protein 1 interagující s mitogeny aktivovanou proteinkinasou

SNARE - soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein receptors

TOR - target of rapamycin - proteinkinasa, která je cílem pro inhibitor rapamycin
→ TOR obsahuje 2 proteiny: **TOR1** a **TOR2**

TSC - tuberous sclerosis complex - komplex tuberosní sklerozy
→ TSC1/TSC2

UPR - unfolded protein response - reakce nesbaleného proteinu

UVRAG - ultraviolet irradiation resistance-associated gene - gen asociovaný s resistencí k UV záření

Vid - vacuolar import and degradation pathway - dráha vakuolárního importu a degradace

XBP1 - X-box binding protein1 - protein 1 vázající X-box

1. Úvod

Autofagie je hlavní buněčná dráha pro degradaci dlouho žijících proteinů a cytoplasmatických organel v eukaryotických buňkách.

Homeostáza buňky je udržována díky přesně regulované hladině mezi syntézou a degradací buněčných komponent. V eukaryotických buňkách existují dva hydrolytické mechanismy: proteasom a lysosom/vakuola. Pro lysosomální proteinovou degradaci existují nejméně 3 různé dráhy: Cvt (z angl. „cytosol to vacuole targeting pathway“, dráha směřující cytosol do vakuoly), Vid (z angl. „vacuolar import and degradation pathway“, dráha vakuolárního importu a degradace) a autofagie. Autofagie má důležitou roli ve fyziologii a patofyziologii všech buněčných typů. Kromě její úlohy při degradaci proteinů a organel, může také vyvolávat jistý typ programované buněčné smrti (PCD), odlišný od apoptosy, nazývá se PCD typu II¹. Od apoptosy se liší zejména v morfologickém kritériu, tj. přítomností autofagosomů v umírající buňce. Buňka umírá, pokud aktivace autofagie překročí přirozenou prahovou úroveň, což způsobí buněčnou atrofii, která vyústí v kolaps buněčných funkcí. Buněčná smrt s rysy autofagie může nastat, když v buňce chybí důležité součásti apoptotického aparátu. Zdá se, že autofagie může kompenzovat defektní apoptosu².

Autofagii vyvolávají různé stimuly jako například hypoxie, hladovění nebo chemická činidla, jako například rapamycin.

V buňkách savců je autofagie složitý proces. Je zapojená do tak rozmanitých buněčných procesů jako jsou přežívání buněk, buněčná smrt nebo odstraňování patogenů. Taktéž je spojená s patologickými procesy jako jsou progresse rakoviny, neurodegenerativní onemocnění, ale také různá srdeční onemocnění.

Pro geny spojené s autofagií se používá označení ATG (z angl. „autophagy-related genes“) a pro produkty genů označení Atg³. Objev těchto genů u kvasinek byl zásadní pro pochopení molekulární podstaty tohoto procesu.

Úloha autofagie v srdci je poměrně složitá. Převážně funguje jako „pro-survival“ dráha zejména proto, že chrání srdce před ischemií nebo hypoxií. Avšak, když je autofagie spuštěna nadměru, což se děje například během reperfuse, může vést až k buněčné smrti.

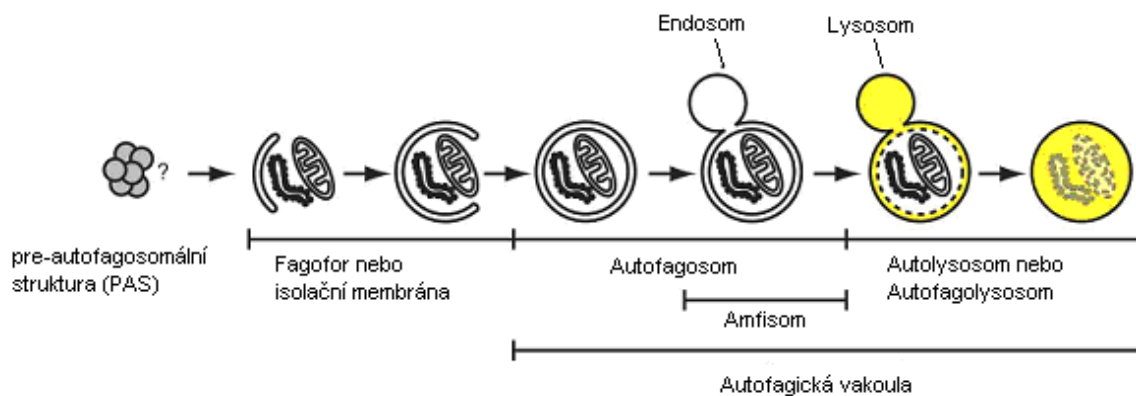
1.1. Cíl práce

Cílem této práce bylo popsat proces autofagie, signalizační dráhy vedoucích k její regulaci a shrnout dosavadní poznatky o úloze autofagie v srdci, zejména během ischemie a následné reperfuse, dále o jejím potenciálním využití v kardioprotekci a o možných metodických cestách, jak ji sledovat.

2. Klasifikace autofagie

Autofagie je fyziologický proces vyskytující se u všech eukaryot od rostlin, přes kvasinky, po živočichy. Existují 3 základní formy autofagie: makroautofagie, mikroautofagie a chaperonem zprostředkovaná autofagie (CMA- z angl. „chaperone-mediated autophagy“).

Hlavním způsobem degradace cytoplasmatických složek je **makroautofagie**. Právě ona bývá většinou označována obecným výrazem autofagie a toto označení pro ni bude použito i dále v textu. Zahrnuje následující procesy: nejdříve se objevuje „C“ forma dvoumembránové struktury v cytoplasmě (*fagofor* nebo *isolační membrána*), pak na obou koncích tato membránová struktura roste a nakonec se uzavírá do formy vakuoly. Cytoplasmatický materiál a některé organely jsou zabalené do této vakuoly, čímž vzniká *autofagosom* s průměrem 0,5-1,5 μm^4 . Ten je pak nasměrovaný v savčích buňkách do endosomu (v tomto případě vzniká *amfisol*), následně do lysosomu nebo do vakuoly u kvasinek, kde jeho vnější membrána fúzuje s lysosomální membránou, přičemž vnitřní obsah autofagosomu je přijímán do lysosomu/vakuoly a vzniká *autolysosom* nebo *autofagolysosom*. Hydrolasy nacházející se v lysosomu pak degradují získaný cytoplasmatický materiál a ten může být následně recyklován⁵. U kvasinek jsou autofagosomy generovány z *pre-autofagosomální struktury (PAS)*, která ještě nebyla identifikována u savců (viz obr. 1, str. 10)⁶.



Obr. 1: Proces makroautofagie v savčích buňkách: U kvasinek jsou autofagosomy generovány z pre-autofagosomální struktury (PAS), u savců ještě nebyla identifikována. Složky cytoplasmy, které mají být odstraněny jsou uzavřeny pomocí fagoforu nebo isolační membrány, čímž vzniká autofagosom. Ten je v savčích buňkách nasměrovaný do endosomu (v tomto případě vzniká amfisol), následně do lysosomu nebo do vakuoly u kvasinek, kde jeho vnější membrána fúzuje s lysosomální membránou, přičemž vnitřní obsah autofagosomu je přijímán do lysosomu/vakuoly a vzniká autolysosom nebo autofagolysosom⁶.

Během **mikroautofagie** dochází k invaginaci lysosomální/vakuolární membrány, která se pak mění do tvaru vnitřního vakuolárního váčku, jenž obsahuje materiál z cytoplasmy, podobně jako je tomu při vytváření autofagického materiálu při makroautofagii. Důležitý rozdíl mezi makroautofagií a mikroautofagií je ten, že během mikroautofagie je cytoplazma přímo přijatá do lysosomu/vakuoly⁷.

CMA se liší od ostatních typů lysosomálních degradací, není zde zahrnuta přeprava vesikul. Cytosolické proteiny se speciálním pentapeptidovým sekvenčním motivem KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln), jsou rozpoznány komplexem molekulárních chaperonů, zejména hsp73. Pak se váží na receptor v membráně lysosomu, a to konkrétně na LAMP-2a, s lysosomem asociovaný membránový protein typu 2a (z angl. „lysosome-associated membrane protein (LAMP) type 2a“). Proteiny jsou tedy dopravovány do lysosomu pomocí molekulárních chaperonů a LAMP-2a⁸.

Autofagie je v podstatě neselektivní proces, ve kterém je cytoplasmatický materiál náhodně oddělen a začleněn do autofagosomu. Avšak v některých případech si může vybrat svůj cíl – může být selektivní. Například se mohou pomocí autofagie selektivně eliminovat některé organely, jako poškozené nebo přebytečné peroxisomy - pexofagie, endoplasmatické retikulum (ER) a mitochondrie – mitofagie.

3. Molekulární mechanismus autofagie

Molekulární základy autofagie byly nejprve charakterizovány u kvasinek. Byly identifikovány mnohé molekuly podílející se na těchto procesech. Nejméně 25 specifických kvasinkových genů (ATG geny) je zahrnutých výhradně v autofagii a více než 40 dalších kvasinkových genů je pro autofagii nepostradatelných, tyto geny se ale uplatňují i v jiných drahách⁴. U některých produktů ATG genů byly již identifikovány savčí homology (tabulka č. 1). Skutečnost, že kvasinkové geny mají savčí homology naznačuje, že základní mechanismus autofagie je evolučně konzervován. Proces autofagie se skládá z několika základních kroků: aktivace, formace autofagosomu, fúze autofagosomu s vakuolou/lysosomem a degradace autofagických objektů.

Kvasinkový homolog	Savčí homolog	Charakteristika
<i>Aktivace autofagie</i>		
Atg6	Beclin1	Součást komplexu PI3K
<i>Formace autofagosomů</i>		
Atg3	Atg3	E2 podobný enzym konjugující PE s Atg8
Atg4	Autophaginy Atg4A, Atg4B, Atg4C, Atg4D	Cysteinová proteasa štěpící C konec Atg8
Atg5	Atg5	Konjuguje s Atg12 prostřednictvím vnitřního lysinu
Atg7	mAtg7	E1 podobný enzym, aktivuje Atg8 a Atg12
Atg8	MAP-LC3 GABARAP GATE-16	Ubiquitinu podobný protein konjugující s PE
Atg10	mAtg10	E2 podobný enzym konjugující Atg12 s Atg5
Atg12	mAtg12	Ubiquitinu podobný protein konjugující s Atg5
Atg16	Atg16L	Složka komplexu Atg12-Atg5
<i>Fúze autofagosomu s lysosomem/vakuolou</i>		
Vam3 Vam7 Vti1 Ykt6	-	SNARE proteiny
NSF	-	

SNAP	-	
Sec17 Sec18 Sec19	-	GDI homology
Ccz1 Mon1	-	tvoří spolu komplex
Ypt7 Rab7 Rab22 Rab24	-	Rab proteiny GTPasy
<i>Degradace a recyklace</i>		
Prb1	-	Hydrolasa
Atg15/Cvt17	-	Lipasa
Atg9	Atg9	Intergální membránový protein
Atg18	WIPI-1	Periferní membránový protein, váže se s PI3P

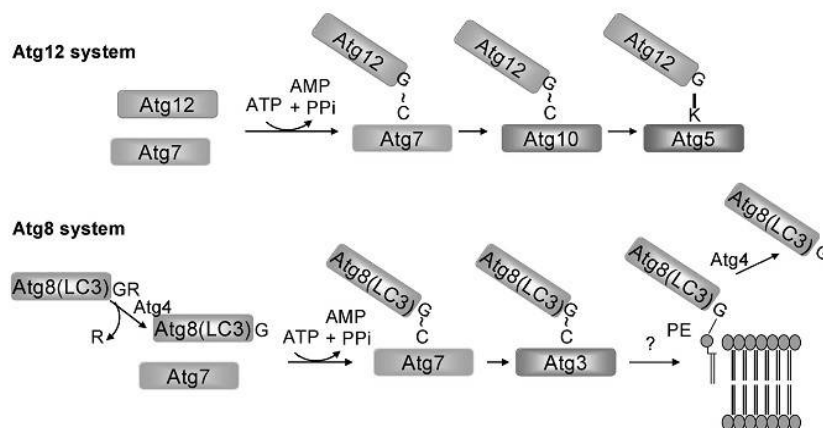
Tabulka 1: Přehled Atg proteinů zapojených do procesu autofagie^{3,9}

3.1. Aktivace autofagie

Velmi důležitou roli během iniciační fáze formace autofagosomů hraje protein Beclin1 (u kvasinek Atg6), který je součástí komplexu fosfatidylinositol 3-kinasy (PI3K) třídy III (též znám jako hVps34, u kvasinek Vps34), lokalizovaném především na trans-Golgiho aparátu¹⁰. Další důležitou složkou tohoto komplexu je myristylovaná kinasa p150 (u kvasinek Vps15), která pomáhá upevnit komplex k membráně. Komplex PI3K katalyzuje fosforylaci fosfatidylinositolu (PI) na fosfatidylinositol-3-fosfát (PI3P) a tento molekulární signál pak podporuje shromáždění proteinů Atg4, Atg7 a Atg10 na isolační membráně. Do tohoto komplexu patří i další proteiny jako např. Bcl-2, který může interakcí s Beclin1 negativně regulovat aktivaci autofagie¹¹ (více viz. kapitola 4.).

3.2. Formace autofagosomů

Jedním z nejpozoruhodnějších zjištění týkajících se Atg proteinů byl objev dvou konjugačních systémů, **Atg12-Atg5** a **Atg8-fosfatidylethanolamin(Atg8-PE)**, které spolu úzce souvisejí^{12,13} (obr. 2, str. 13)¹³.



Obr. 2: Ve formaci autofagosomů jsou zahrnuty dva ubiquitinu podobné konjugační systémy:

Atg12-Atg5 konjugační systém - za spotřeby ATP se Atg12 nejdříve aktivuje enzymem Atg7, a to vznikem thioesterové vazby mezi C-terminálním glycinem v Atg12 a cysteinovým zbytkem v Atg7. C-terminální glycin v Atg12 je pak přenesen na cystein v Atg10, vytváří se nová thioesterová vazba a Atg7 je uvolněn. Nakonec Atg12 vytváří isopeptidovou vazbu s ε-aminokupinou lysinu Atg5, přičemž se Atg10 uvolní.

Atg8 konjugační systém - nejdříve musí být Atg8 (u kvasinek, u savců LC3) proteolyticky rozštěpen pomocí cysteinové proteasy, Atg4, tím je odhalen jeho C-terminální glycin. Atg7 pak ATP-dependentním způsobem aktivuje Atg8 a přidělí mu enzym Atg3. V konečném kroku Atg8 již nevytváří konjugát s dalšími proteiny, ale interaguje s membránovým fosfolipidem - fosfatidylethanolaminem (PE). Komplex Atg8-PE je pak dekonjugován Atg4, čímž poskytuje nový zdroj cytoplasmatického Atg8¹³.

Mechanismus těchto dvou systémů se velmi podobá konjugaci ubiquitinu k proteinům. Pro konjugaci ubiquitinu k cílovému proteinu jsou nezbytné tři enzymy: E1 aktivační enzym, E2 konjugační enzym a E3 ligasa. Obdobou E1 aktivačního enzymu je při autofagii protein Atg7 a obdobou E2 konjugačního enzymu jsou proteiny Atg10 a Atg3. Žádný E3 podobný enzym se neúčastní autofagického procesu.

3.2.1. Atg12-Atg5 konjugační systém

Atg12, hydrofilní protein obsahující 186 aminokyselin, se může kovalentně a ireverzibilně vázat k unikátnímu cílovému proteinu Atg5. Vytvářejí spolu konjugát okamžitě po jejich syntéze, jejich volné formy jsou tedy velice obtížně pozorovatelné¹⁴. Za spotřeby ATP se Atg12 nejdříve aktivuje E1 podobným enzymem Atg7, a to vznikem thioesterové vazby mezi C-terminálním glycinem v Atg12 a cysteinovým zbytkem v Atg7. C-terminální glycin v Atg12 je pak přenesen na cystein v Atg10 (E2 podobný protein), vytváří se nová thioesterová vazba a Atg7 je uvolněn. Nakonec C-terminální glycin Atg12

vytváří isopeptidovou vazbu s ϵ -aminoskupinou lysinu Atg5, přičemž se Atg10 uvolní. Zdá se, že tento proces je konstitutivní, protože vytvoření konjugátu Atg12-Atg5 není závislé na hladovění nebo dalších podmínkách spouštějících autofagii¹⁵. Poté se na konjugát Atg12-Atg5 váže Atg16L (u kvasinek Atg16; předcházející konjugační kroky jsou u kvasinek a savců shodné) prostřednictvím homooligomerizace, za kterou je zodpovědná C-terminální *coiled-coil* oblast na Atg16L¹⁶. Tím se vytváří makromolekulární komplex Atg12-Atg5•Atg16L o velikosti 800 kDa (u kvasinek 350 kDa). Je potřeba poznamenat, že Atg16L se váže jenom na Atg5 a ne na Atg12^{16,17}. Tento komplex je nezbytný pro formaci autofagosomů, je asociován s vnější stranou vznikajícího autofagosomu a disociuje od membrány ještě předtím, než je autofagosom zcela dokončen, tedy není přítomen ve zralém autofagosomu.

3.2.2. Atg8 konjugační systém

Atg7 je jedinečný E1 enzym, který podobně jak tomu bylo u Atg12-Atg5 konjugačního systému, ATP-dependentním způsobem aktivuje ubiquitinu podobný protein Atg8 (u kvasinek) a přidělí mu jeho vlastní E2 enzym, Atg3. Ještě předtím však musí být Atg8 proteolyticky rozštěpen pomocí cysteinové proteasy, Atg4. Tím je odhalen jeho C-terminální glycin. V konečném kroku Atg8 již nevytváří konjugát s dalšími proteiny, neboť interakcí s membránovým fosfolipidem PE dochází k jeho konformační změně¹⁸. Navíc Atg8-PE je dekonjugován Atg4, který štěpí vazbu lipid-protein a poskytuje tak nový zdroj cytoplasmatického Atg8. Cyklus konjugace a dekonjugace je důležitý pro normální rozvoj autofagie¹⁵.

U savců je tento proces velice podobný. Místo Atg8 však vystupuje jeho savčí homolog MAP-LC3, tedy lehký řetězec 3 proteinu asociovaného s mikrotubuly (dále jen LC3). Atg8 má kromě LC3 ještě nejméně dva další savčí homology: GABARAP a GATE-16¹⁹. LC3 existuje ve dvou formách: LC3-I (18 kDa) a LC3-II (16 kDa)²⁰. 22 aminokyselin na C-terminálním konci LC3 je okamžitě štěpených savčím homologem kvasinkové cysteinové proteasy Atg4, autophaginem a vytváří aktivní cytosolickou formu LC3-I, která může vstoupit do konjugačního procesu¹⁹, až nakonec být kovalentně připojena k PE a měnit se tak na LC3-II²¹. LC3-I je lokalizován v cytoplasmě, zatímco LC3-II je pevně se vážající membránový protein a je připojen k PAS a autofagosomům. Relativní množství

membránově navázaných LC3-II odráží poměr autofagosomů, což může být monitorováno prostřednictvím imunologických testů (viz. kapitola 8.)²⁰.

3.3. Fúze autofagosomu s lysosomem

U kvasinek fúze autofagosomu s vakuolou vyžaduje několik faktorů, které jsou zahrnuty také v dalších typech vesikulárního transportu. Studium molekulární genetiky ukázalo, že mechanismus fúze autofagosomu s vakuolou je podobný mechanismu homotypické vakuolární fúze¹⁴. Tento mechanismus zahrnuje: SNARE proteiny Vam3, Vam7, Vti1 a Ykt6; NSF, SNAP a GDI homology Sec17, Sec18 a Sec19; Rab protein Ypt7; členy třídy C komplexu Vps/HOPS; a ještě Ccz1 a Mon1²². Když proces fúze začíná ještě před dokončením dvojité membrány autofagosomu, jeho obsah může zůstat v cytosolu. Je tedy potřebné přesně regulovat načasování fúze autofagosomu s lysosomem/vakuolou. Atg8-PE, umístěn na vnějším povrchu autofagosomu, je odstraněn ještě před fúzí jako výsledek druhého štěpení Atg4. Odstranění Atg8-PE z autofagosomu může zabránit předčasné fúzi s lysosomem. Atg12-Atg5•Atg16 může mít tu samou funkci¹⁴.

U savců je fúze autofagosomu s lysosomem složitější proces, v kterém je před samotnou fúzí potřebná série maturačních kroků autofagosomu. Podobně jako u kvasinek, jsou pro správné zrání, resp. maturaci autofagosomů potřebné aktivní monomerní GTPasy (Rab22, Rab24) a savčí homology proteinů SNARE a NSF²³. Ještě před samotnou fúzí s lysosomem, fúzuje autofagosom s endosomem, čímž vzniká amfiosom. Do správné maturace autofagosomu je zapojená taky GTPasa Rab7, která je asociována s autofagickou vakuolou. Overexprese dominantně negativního mutantu Rab7 brzdí fúzi autofagosomu s pozdním endosomem/lysosomem, což vede k nahromadění autofagosomů a následně poklesu degradace dlouho žijících proteinů²⁴. Kromě těchto různých proteinů se maturace autofagosomů nebo fúze autofagosomu s lysosomem účastní i prvky cytoskeletu¹⁴.

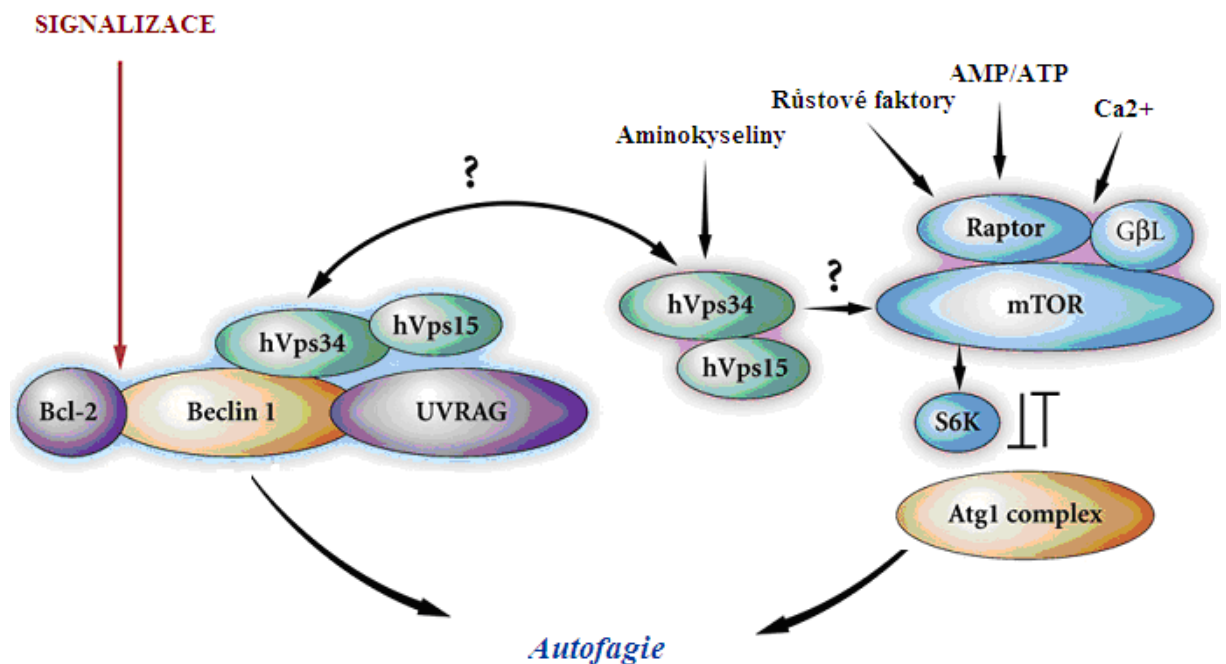
3.4. Degradace autofagických objektů

Hlavním cílem autofagie u kvasinek i savců je degradace cytoplasmatického materiálu a následná recyklace vzniklých monomerních jednotek pro jejich použití při syntéze základních makromolekul při nedostatku živin¹⁴. Po fúzi s lysosomem nebo

vakuolou je cytoplasmatický materiál, který byl autofagosomem oddělen od okolí, vypuštěn do lumen lysosomu a postupně rozštěpen hydrolasami. Degradace autofagických objektů vyžaduje nízké pH²⁵, proteinasu B (Prb1) a Atg15/Cvt17²⁶. Atg15/Cvt17 je lipasa a Prb1 je hydrolasa, obě se podílí na aktivaci mnohých dalších vakuolárních proenzymů. Další proteiny, Atg9 a Atg18 jsou taktéž zapletené v tomto posledním kroku, konkrétně během recyklace PAS. Atg9 je integrální membránový protein a Atg18 (savčí WIPI-1) je periferní membránový protein, který se váže s PI3P³.

4. Regulace autofagie

Nejdůležitějšími regulátory autofagie jsou komplexy proteinkinasy mTOR (z angl. „mammalian target of rapamycin“) a proteinu Beclin1 (obr. 3).

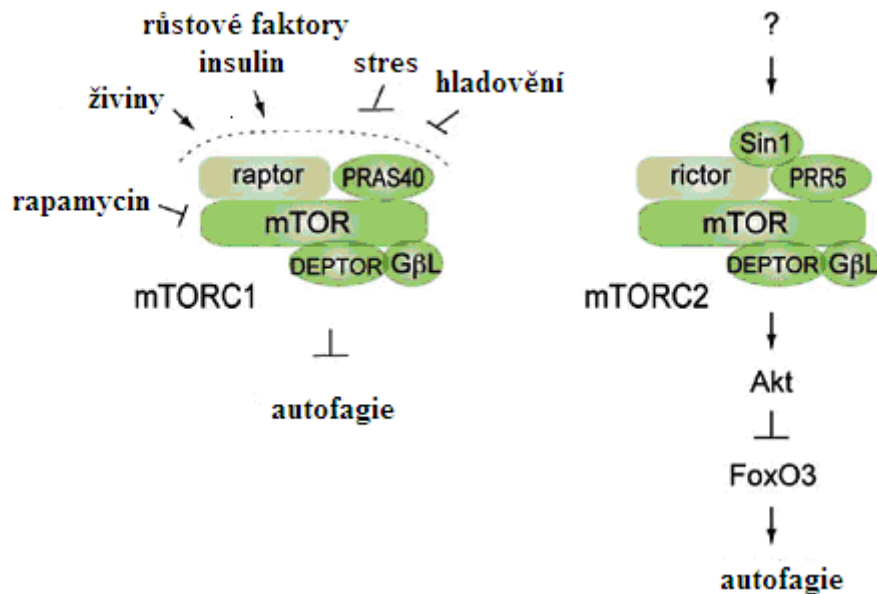


Obr. 3: Signalizační dráhy kontrolující proces autofagie: Autofagii kontrolují 2 hlavní regulační proteiny, mTOR a Beclin1. Oba proteiny přijímají stimuly jak z intra- tak z extracelulárního prostředí. Aktivace mTOR závisí na růstových faktorech, energii (AMP/ATP), hladině vápníku a také na hladině aminokyselin prostřednictvím signalizace hVps34. Aktivace mTOR pak působí inhibičně na autofagii, a to prostřednictvím proteinkinasy Atg1 nebo proteinu S6K. Komplex Beclin1/hVps34/UVRAG podporuje autofagii tím, že umožňuje přijímání Atg proteinů, potřebných pro tvorbu autofagosomů, do PAS. Tento komplex může být inhibován proteinem Bcl-2, který se naváže na BH3 doménu Beclin1¹⁰.

4.1. mTOR

mTOR je serin/threoninová kinasa, která reguluje buněčný růst, progresi buněčného cyklu, nutriční podmínky, proteosyntézu a autofagii^{27,28}. Patří do rodiny kinas, příbuzných fosfatidylinositolkinase, PIKK (z angl. „phosphatidylinositol kinase-related kinase family“)²⁸. Během hladovění je aktivita mTOR inhibována, což je rozhodujícím krokem vedoucím k indukci autofagie²⁹. Aktivita mTOR je v savčích buňkách regulována především hladinou aminokyselin a glukosy³⁰.

Kvasinky obsahují dva TOR proteiny, TOR1 a TOR2^{28,31}. Savčí mTOR váže několik proteinů a vytváří tak dva rozdílné proteinové komplexy, mTORC1 a mTORC2. mTORC1 obsahuje raptor, GβL/mLST8, PRAS40 a DEPTOR, zatím co mTORC2 obsahuje součást nereagující na rapamycin - rictor, GβL/mLST8, Sin1, PRR5/protor a DEPTOR³⁰ (Obr. 4).



Obr. 4: Proteinové komplexy mTOR: *mTORC1* obsahuje raptor, GβL/mLST8, PRAS40 a DEPTOR. Je to proteinový komplex důležitý při indukci autofagie. Dostatečný přísun živin nebo růstových faktorů tento komplex aktivuje, naopak komplex může inhibovat stres, hladovění nebo rapamycin. *mTORC2* obsahuje rictor, GβL/mLST8, Sin1, PRR5/protor a DEPTOR. Indukce autofagie způsobena inhibicí mTORC2 je regulována především transkripčním faktorem FOXO3, jehož funkce je regulována pomocí Akt³⁰.

Savčí mTORC1 je cílem pro rapamycin, obsahuje regulační protein, tzv. raptor a je klíčovým regulátorem translace a ribosomální biogenese a je také zodpovědný za indukci autofagie v reakci na hladovění. Savčí mTORC2 je pravděpodobně také cílem pro

rapamycin, i když na něj není citlivý (obsahuje rictor), je zapojen do regulace fosforylace a aktivace komplexu Akt/PKB, což je serin/threoninová proteinkinasa^{30,32}. Protože Akt pozitivně reguluje mTORC1, tak je velice pravděpodobné, že mTORC2 negativně reguluje autofagii. Avšak mnohem důležitějším regulátorem autofagie je právě mTORC1. Indukce autofagie způsobena inhibicí mTORC2 je regulována především transkripčním faktorem FOXO3 (z angl. „Forkhead box O3“)³⁰ (obr. 4, str. 17).

Aktivita mTORC1 je stimulována malým G-proteinem, Rheb. Rheb je regulovaný komplexem tuberosní sklerozy TSC1/TSC2, který na něj působí inhibičně^{33,34}.

mTOR signální dráhu ovlivňují také insulin a růstové faktory, a to prostřednictvím signální dráhy PI3K třídy I/Akt, což vede k inhibici TSC2 a aktivaci mTORC1^{33,34}.

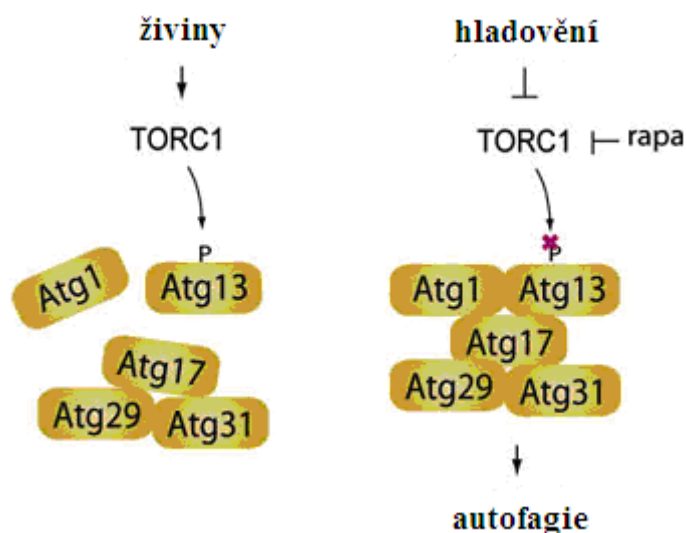
Nedostatek glukosy má také jistý vliv, snižuje poměr ATP/AMP a tím aktivuje AMP-aktivovanou proteinkinazu, AMPK. Aktivovaná AMPK inhibuje mTORC1 prostřednictvím fosforylace a aktivace TSC2³⁵. Aktivace tumor supresorového genu p53 a signalizace vápníkem mohou také inhibovat mTOR prostřednictvím aktivace AMPK^{36,37}. Aktivita mTORC1 je regulována i redoxním stavem buňky³⁸ nebo buněčným stresem³⁹. Hypoxie reguluje mTORC1 pomocí REDD1, který má vliv na komplex TSC1/TSC2³⁹ (viz kapitola 5.3.).

Také nedostatek aminokyselin v buňce reguluje aktivitu mTOR. Aminokyselinová signalizace je u savců zprostředkována rodinou malých GTP-as, RagA^{30,40} nebo kinasovou aktivitou MAP4K3, což je proteinkinasa aktivována mitogeny a patří do rodiny proteinkinas Ste20^{30,41}. Hladina aminokyselin, zejména leucinu aktivuje hVps34 (PI3K třídy III), která působí neznámým mechanismem jako regulátor mTORC1 a je asociována s dalším důležitým regulátorem autofagie, Beclin1^{30,42}. Tato dráha je dosud jedinou známou cestou, která spojuje oba hlavní regulátory autofagie, mTOR a Beclin1.

Je-li mTOR aktivován, inhibuje autofagii působením na komplex Atg1 kinasy a také na protein S6K.

Atg1 je evolučně konzervovaná serin/threoninová kinasa, která je velice důležitá v iničiálních krocích indukce autofagie, zejména v procesu formace PAS³⁰.

Kinasovou aktivitu Atg1 zvyšuje hladovění i rapamycin⁴³. Atg1 interaguje s několika autofagickými proteiny: Atg13, Atg17, Atg29 a Atg31 a to způsobem závislejícím na nutričním stavu a aktivitě TOR⁴³⁻⁴⁵ (obr. 5, str. 19).



Obr. 5: Regulace Atg1 prostřednictvím TOR: Když má buňka dostatek živin, TOR fosforyluje Atg13, ten ztrácí afinitu k Atg1 a autofagie je potlačena. Naopak, během hladovění je aktivita TOR inhibována a fosforylace Atg13 je potlačena. Následně hypofosforylovaná forma Atg13 interaguje s Atg1, Atg17, Atg29 a Atg31, čímž se zvýší kinasová aktivita Atg1, která indukuje proces autofagie³⁰.

Za normálních okolností, kdy je přísun živin dostatečný, TOR fosforyluje Atg13, čímž dochází k snížení jeho afinity k Atg1 a následně k represii autofagie^{43,44,46}. Během hladovění, když je TOR neaktivní, je potlačena fosforylace Atg13. Na hypofosforylovanou formu Atg13 se váže Atg1, Atg17 a ostatní důležité faktory autofagie, tím se zvyšuje kinasová aktivita Atg1, která je důležitá pro tvorbu autofagosomů³⁰. Atg17 tedy během hladovění interaguje s Atg1, Atg13, Atg29 a Atg31, přičemž pro Atg1 kinasovou aktivitu a tvorbu autofagosomů je nepostradatelná právě interakce mezi Atg13 a Atg17⁴⁶.

Dalším regulačním cílem mTOR je kinaso S6K nebo p70S6K (ribosomální p70S6 proteinkinasa, regulátor iniciace translace), která je také zapojena do regulace autofagie. V savčích buňkách může S6K přispívat k bazální aktivitě autofagie a to inhibicí insulinové signální dráhy závislé na PI3K třídy I mechanismem zpětné vazby⁴⁷. Kromě toho se ještě zjistilo, že Atg1 může snižovat účinky regulace S6K na autofagii a tím inhibovat buněčný růst v savčích buňkách⁴⁸.

4.2. Beclin1

Beclin1 je 60 kDa protein obsahující 450 aminokyselin. Sestává ze 4 specifických domén: BH3 vazební doména, *coiled-coil* doména, evolučně konzervovaná doména a

jaderný exportní signál. Tato poslední doména je zodpovědná za transport Beclin1 z jádra do cytosolu. Beclin1 byl identifikován v trans-Golgiho aparátu, v ER, v mitochondriích a perinukleární membráně¹⁰.

Atg6 je kvasinkový homolog savčího Beclin1 a je identický s Vps30, tedy proteinem zapojeným v dráze třídění vakuolárních proteinů⁴⁹. Atg6/Vps30 tvoří komplex s Vps34 a s jejím adaptorem Vps15. Tento komplex může regulovat autofagii jenom pokud se váže s Atg14. Pak se podílí na formaci autofagosomů tím, že umožňuje dalším Atg proteinům přemístit se do PAS¹².

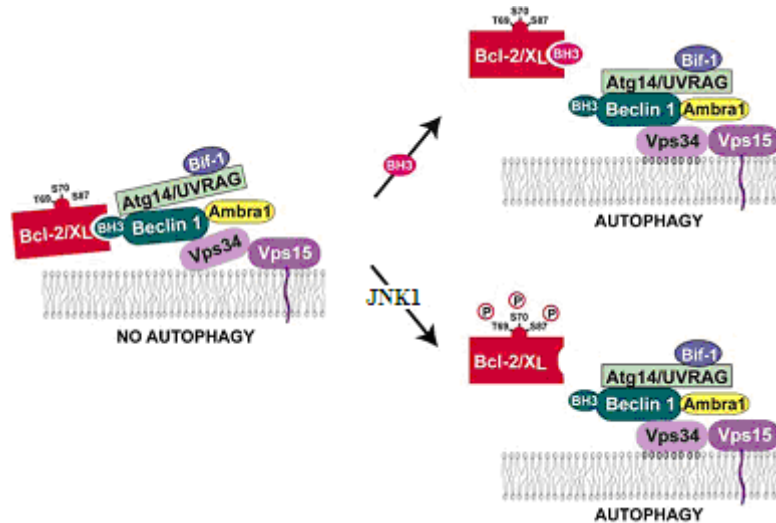
U savců se Beclin1 svou evolučně konzervovanou doménou váže k hVps34 (PI3K třídy III). Interakce Beclin1/hVps34 může být narušena pomocí Bcl-2 (z angl. „B-cell lymphoma 2“), negativního inhibitoru autofagie. Inhibitor Bcl-2 se přitom váže na BH3 doménu Beclin1. Je zajímavé, že Bcl-2 a hVps34 interagují se dvěma odlišnými doménami Beclin1. Inhibice je závislá jenom na interakci Beclin1/Bcl-2. Během hladovění, když probíhá autofagie naplno, je interakce mezi nimi slabá. Naopak, při dostatku živin, když je autofagie inhibována, interakce mezi Beclin1 a Bcl-2 je silná⁵⁰. To naznačuje, že Bcl-2 může podle potřeby spustit nebo vypnout autofagii. Poslední výzkumy ukazují, že je pro tuto inhibici důležitá fosforylace Bcl-2 pomocí kinasy JNK1 (c-jun N-terminální proteinkinasa 1). Během hladovění JNK1 fosforyluje Bcl-2, tím inhibuje jeho interakci s Beclin1 a stimuluje se autofagie (obr. 6, str. 21)⁵¹.

Hladina aminokyselin, podobně jak tomu bylo v případě mTOR, má vliv také na aktivitu hVps34, která je vázána s Beclin1. Tento vliv je však velice diskutabilní, protože bylo zjištěno, že nedostatek aminokyselin aktivitu hVps34 v některých buňkách inhibuje a v jiných naopak zvyšuje⁵².

Další protein nepostradatelný pro regulační funkci Beclin1 je UVRAG (z angl. „ultraviolet irradiation resistance-associated gene“), který je také součástí komplexu Beclin1. UVRAG stimuluje autofagii prostřednictvím přímé interakce s *coiled-coil* doménou Beclin1. Jeho funkce spočívá v zesílení interakce mezi Beclin1 a hVps34. Komplex UVRAG/Beclin1/hVps34 podporuje autofagii, potlačuje proliferaci a karcinogenesi buněk⁵³.

Přesný mechanismus, kterým komplex Beclin1/hVps34 reguluje autofagii je stále nejasný. Zatím je jasné, že je tento komplex zapojen v tvorbě autofagosomů a je nepostradatelný pro přijímání Atg proteinů do PAS a také pro tvorbu PI3P, což je produkt hVps34. Lokalizace PI3P na PAS reguluje přítomnost Atg14. Kromě toho byl

identifikován i savčí homolog Atg18, hWIPI-1 α , obsahující fosfolipidovou doménu, která se váže s PI3P a má také svou roli v tvorbě PAS¹⁰.



Obr. 6: Beclin1 a regulace autofagie: Beclin1 tvoří komplex s hVps34 (PI3K třídy III) a s jejím adaptorem Vps15. Tohoto komplexu se účastní také další aktivátory, jako Ambra1, Bif-1 a UVRAG nebo Atg14. Interakce Beclin1/hVps34 může být narušena pomocí Bcl-2, negativního inhibitoru autofagie. Inhibitor Bcl-2 se váže na BH3 doménu Beclin1. Inhibice autofagie je závislá pouze na interakci Beclin1/Bcl-2. Pro tuto inhibici je důležitá fosforylace Bcl-2 pomocí kinasy JNK1, čímž se inhibuje jeho interakce s Beclin1 a stimuluje se autofagie. Druhým případem je narušení interakce Beclin1/Bcl-2 přítomností dalšího proteinu obsahujícího BH3 doménu jeho vazbou na Bcl-2⁵⁰.

5. Hypoxie a regulace autofagie

Během hypoxie, nedostatku kyslíku, je v buňkách ohrožena energetická homeostasa, a to především pro neschopnost buněk účinně vytvářet ATP prostřednictvím oxidativní fosforylace. Vzniká velký metabolický stres, protože hypoxické buňky se spoléhají na anaerobní glykolysu nebo na další způsoby produkce ATP, které však vedou k nadměrné tvorbě laktátu a laktátové acidose, což může vést ke snížení efektivity orgánů nebo až k těžkému poškození orgánů a jejich funkcí.

Studie zabývající se spojením mezi signálními drahami hypoxie a aktivací autofagie ukázaly, že existují tři hlavní signální dráhy (viz dále), které ovlivňují proces autofagie za účelem podpořit přežívání hypoxických buněk⁵⁴. V buňkách savců vystavených hypoxii dochází k aktivaci autofagie^{55,56} a toxicita způsobená hypoxií může

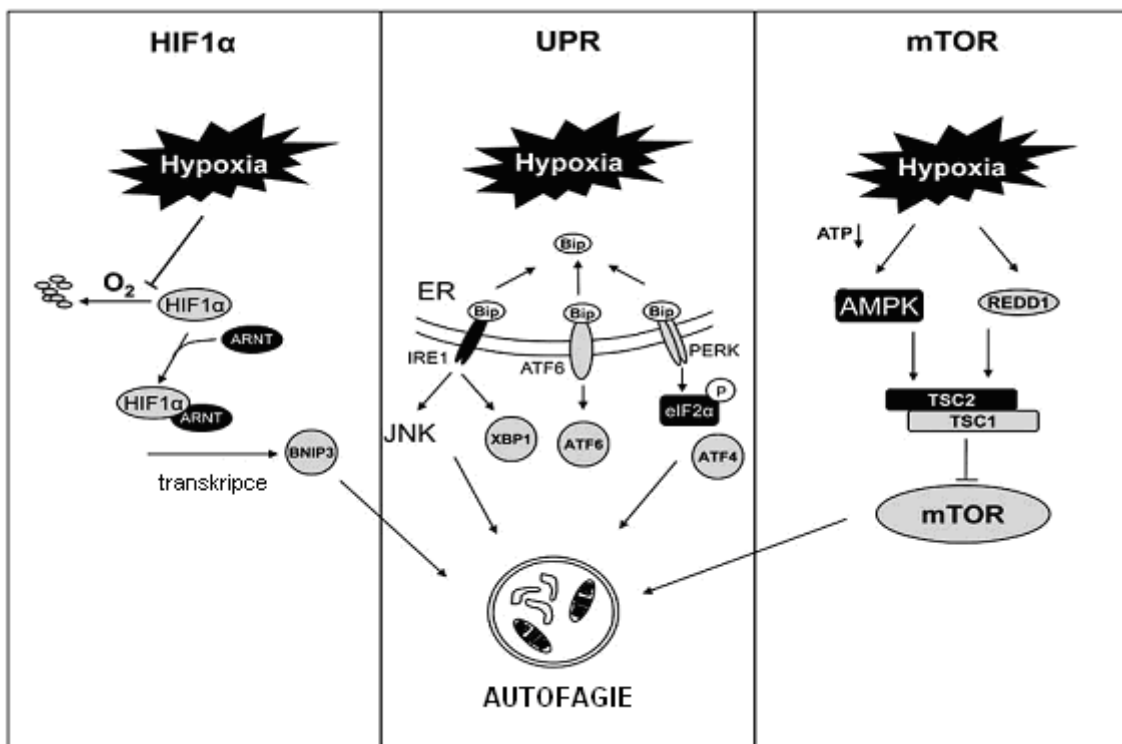
být zvýšena, jsou-li porušeny proteiny související s autofagií, jako například Beclin-1 nebo Atg5^{56,57}.

Vzhledem k tomu, že autofagie má schopnost vytvářet ATP a recyklovat aminokyseliny, je pravděpodobné, že během hypoxie je autofagie zapojena do udržování homeostasy ATP a recyklace organel (např.: degradace mitochondrií pohání anaerobní metabolismus).

V posledních letech bylo definováno několik signálních drah (obr. 7), které regulují reakce buněk na hypoxii. Patří mezi ně hlavně transkripční a translační reakce iniciované:

- 1) na kyslíku závislou stabilizací transkripčního faktoru, HIF-1 (hypoxií indukovaný faktor-1; z angl. „hypoxia inducible factor“)
- 2) aktivací reakce nesbaleného proteinu (UPR; z angl. „unfolded protein response“)
- 3) inhibicí mTOR kinasové signální dráhy⁵⁴

Odchytky v trvání stavu hypoxie a její závažnost aktivují tyto reakce rozdílně a vedou k velkým rozdílům fenotypu mezi jinak identickými buňkami.



Obr. 7: Signální dráhy během hypoxie a jejich vztah k autofagii

HIF-1 α : Hypoxie stabilizuje HIF-1 α , který následně dimerizuje s ARNT/HIF-1 β a vyvolává silnou transkripční reakci, včetně indukce BNIP3, který může ovlivnit autofagii.

UPR: Hypoxie spouští uvolnění IRE1, PERK a ATF6 z BiP, čímž se aktivuje UPR. IRE1 signalizuje prostřednictvím XBP1 a JNK. Aktivace PERK vede k fosforylaci eIF2 α a expresi ATF4. Obě dráhy IRE1-JNK a PERK-eIF2 α se jeví jako velice důležité pro indukci autofagie během rozličných typů stresu ER.

mTOR: REDD1 a AMPK během hypoxie stimulují aktivitu komplexu TSC1/TSC2, což vede k inhibici mTOR a následně k aktivaci autofagie⁵⁴.

5.1. HIF-1 a regulace autofagie

Transkripční faktory patřící do rodiny HIF (HIF-1, HIF-2 a HIF-3) patří mezi centrální regulátory buněčných reakcí za sníženého příjmu kyslíku. Tyto transkripční faktory se skládají ze dvou podjednotek; z podjednotky HIF α (např. HIF-1 α), která je za přítomnosti kyslíku ve většině případů rychle degradována a z konstitutivní podjednotky HIF β (např. HIF-1 β /ARNT), která je vůči hladině kyslíku stabilní. Podjednotky HIF α a HIF β dimerizují, což je nezbytný předpoklad pro transkripční aktivitu HIF⁵⁴.

Za hlavní regulátor transkripce během hypoxie je považován HIF-1, který vyvolává rozmanité transkripční reakce zahrnující více než 60 genů⁵⁸. HIF-1 se také podílí na regulaci 19 kDa proteinového komplexu Bcl-2/adenovirus E1B, známého pod zkratkou **BNIP3**⁵⁹ (obr. 7, str. 22). BNIP3 může prostřednictvím své BH3 domény interagovat s E1B a E1B-podobnými sekvencemi v proteinu Bcl-2 a tak potlačovat jeho anti-apoptotickou aktivitu. Proto byl BNIP3 zpočátku považován za člena pro-apoptotických proteinů. Nedávno bylo prokázáno, že BNIP3 může vyvolávat vedle apoptosy také jiný typ buněčné smrti, a sice PCD typu II, která je charakteristická tvorbou autofagických telísk⁵⁴. Úloha BNIP3 v indukci autofagie není jasná, nejpravděpodobnější varianta je založena na jeho schopnosti interagovat s Bcl-2. Protein Bcl-2 kromě schopnosti regulovat apoptosu, váže a inhibuje nezbytný autofagický protein Beclin1 (Atg6)^{11,60}. Asociace BNIP3 a Bcl-2 může uvolnit Beclin1 a stimulovat tak autofagii⁵⁴.

Nedávno byla také zjištěna úloha proteinkinasy C δ (PKC δ) v rané fázi hypoxické reakce, kde PKC δ aktivuje autofagii podporou fosforylace Bcl-2, která je zprostředkována prostřednictvím JNK1, a následnou disociací komplexu Bcl-2/Beclin1⁶¹.

O zapojení BNIP3 do regulace autofagie svědčí výsledky studie, ve které srdeční myocyty vystavené ischemicko-reperfusnímu (I/R) poškození rapidně zvýšily svou hladinu exprese BNIP3, vytvářely autofagické vakuoly a podstupovaly buněčnou smrt. Naopak exprese dominantně negativního BNIP3 chránila buňky před I/R poškozením, zlepšila

srdeční funkci a také chránila integritu mitochondrií⁶². Tyto údaje naznačují, že BNIP3 podporuje autofagii a následnou buněčnou smrt. Zdá se, že autofagie hraje důležitou úlohu v buňkách, které ztratily schopnost apoptosy a podporuje přežívání těchto buněk během metabolického stresu včetně hypoxie⁵⁴.

Nedávno bylo také prokázáno, že HIF-1 α indukovaná exprese BNIP3 může spouštět specifitější typ autofagie, mitochondriální autofagii/mitofagii^{56,63}. Tyto studie uvádějí, že stabilizace HIF-1 α a následná exprese BNIP3 jsou nezbytné během prodloužené hypoxie pro snížení množství mitochondrií. Tento proces vyžaduje také přítomnost Beclin1 a Atg5. Naopak, nedostatek HIF-1 α brání redukci množství mitochondrií a také respirace, což následně vede k nadměrné tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS) a k smrti buněk⁵⁴.

5.2. UPR a regulace autofagie

Za posledních 5 let se objevují důkazy, že buňky mají schopnost adaptace na hypoxii prostřednictvím rychlé a nepřetržité inhibice translace mRNA⁶⁴. Proteosyntéza je hlavním spotřebitelem buněčné energie. Během hypoxie může porucha inhibice translace mRNA zvyšovat buněčnou smrt⁵⁴. Ačkoli je proces translace během hypoxie inhibován, ne všechny mRNA jsou postižené stejným způsobem⁶⁵. Tyto změny v genové translaci pravděpodobně přispívají k rezistenci buněk na hypoxii⁵⁴.

Změny v translaci během hypoxie mohou být zprostředkovány nejméně dvěma odlišnými signálními drahami. Jedna je řízena prostřednictvím UPR a druhá prostřednictvím kinasy mTOR⁵⁴.

Mnohé studie dokazují, že hypoxie může aktivovat UPR, evolučně konzervovaný program, který reaguje na stres ER. ER má důležitou roli při syntéze a skládání proteinů, i při udržování Ca²⁺-homeostasy. Narušení prostředí ER způsobuje stres ER a vede k akumulaci nesbalených nebo nesprávně poskládaných proteinů, což může aktivovat UPR, včetně inhibice translace proteinů, upregulace chaperonů, degradace proteinů a indukce apoptosy. UPR je ochranný a kompenzační mechanismus, který má za úkol aktivovat mnohé funkce, aby se zabránilo poškození buněk¹³. UPR je charakterizována aktivací 3 transmembránových snímačů stresu ER: **PERK**, **IRE1** a **ATF6**. Aktivace těchto transmembránových proteinů ER brání interakci jejich lumenální domény ER s chaperonovým proteinem BiP (z angl. „binding immunoglobulin protein“) ⁶⁶. BiP tedy

slouží za normálních podmínek jako negativní regulátor těchto proteinů. Nahromadění nesbalených a špatně poskládaných proteinů v ER vede k vazbě BiP na nesbalené proteiny, výsledkem čehož je jeho disociace z PERK, IRE1 a ATF6 a aktivace UPR (obr. 7, str. 22)⁵⁴. Každá z těchto tří větví UPR vyvolává různou buněčnou odpověď od celkové inhibice proteosyntézy po aktivaci specifických „downstream“ efektorů⁶⁷.

Ačkoli dosud nebyla uskutečněna přímá demonstrace, že UPR aktivovaná hypoxií vede k indukci autofagie, přibývají záznamy o zapojení UPR v její regulaci. Látky způsobující UPR, jako například tunicamycin, thapsigargin nebo A23187 aktivují autofagii u kvasinek a v buňkách savců⁵⁴. Navíc inhibice proteasomální degradace nesbalených proteinů a jejich následné hromadění spouští autofagii⁶⁸, což nasvědčuje na významné postavení UPR v indukci autofagie.

1) PERK

PERK (z angl. „Protein kinase R-like ER kinase“) je transmembránová kinasa ER, která fosforyluje eukaryotický iniciační faktor 2α (eIF2 α) na serinu 51, což způsobuje inhibici celkové translace mRNA v iniciačním kroku⁶⁹. Během extrémní hypoxie dochází k inaktivaci signalizace PERK a k zhoršení přežívání buněk⁷⁰. Zdá se, že komplex PERK/eIF2 α je potřebný pro přeměnu a lipidaci LC3B (viz kapitola 8.) Atg5-dependentním způsobem⁷¹. Kromě toho PERK podporuje expresi Atg5 a tvorbu autofagických vesikul Atg5-dependentním způsobem⁵⁴. Aktivace PERK, zvýšená fosforylace eIF2 α a zvýšení markerů autofagie (LC3-II, Beclin-1 and Atg5) bylo pozorováno v srdcích potkana po podání aktivátorů stresu ER (tunicamycin and thapsigargin)⁷². Tyto údaje naznačují, že fosforylace eIF2 α a inhibice translace mRNA mohou mít klíčovou roli při aktivaci autofagie v reakci na stres ER.

2) IRE1

IRE1 (z angl. „inositol requiring protein kinase 1“) je transmembránová serin/threoninová kinasa ER, která má také endonukleasovou aktivitu. Její aktivace během UPR vede k odstraňování nežádoucích intronů z mRNA transkripčního faktoru XBP1 (z angl. „X-box binding protein1“). XBP1 spolupracuje s ATF6 a ATF4 při regulaci exprese genů důležitých při reakci na buněčný stres. IRE1 a XBP1 jsou zapojeny v procesu adaptace na stres způsobený hypoxií a po aktivování UPR chrání před buněčnou smrtí⁵⁴.

Studie využívající tunicamycin a thapsigargin jako aktivátory UPR ukázaly, že jde o aktivaci autofagie Atg5-dependentním způsobem za účasti IRE1. Tato studie taktéž ukázala, že kinasová aktivita IRE1 a její schopnost signalizovat prostřednictvím JNK (z angl. „c-Jun N-terminal protein kinase“) byla zapojena výlučně do indukce autofagie⁷³.

U kvasinek, které neobsahují PERK nebo ATF6, má při regulaci autofagie velmi důležitou roli právě IRE1. Zjistilo se totiž, že když jsou buňky kvasinek vystaveny podmínkám UPR striktně závislých jenom na IRE1 signalizaci, nastává rozšíření nebo rozpínání ER a následně se tvoří autofagosomy, které selektivně odčleňují a degradují tyto expandované organely⁷⁴.

3) ATF6

ATF6 (z angl. „activating transcription factor 6“) je ER transmembránový transkripční faktor regulující stres ER. Během podmínek vedoucích ke stresu ER je přemístěn do Golgiho aparátu, modifikován proteolytickým štěpením a následně translokován do jádra⁶⁷, kde funguje jako transkripční faktor. ATF6 má důležitou roli v UPR, reguluje expresi velkého množství chaperonů nacházejících se v ER a skládáním enzymů pomáhá při udržování homeostasy v ER. Kromě toho je zapojen do regulace degradace špatně poskládaných proteinů v ER nebo na jejich nasměrování pro degradaci⁵⁴.

Biologický význam ATF6 v reakcích na hypoxii nebo při regulaci autofagie však dosud nebyl dostatečně prozkoumán. Je však jasné, že ATF6 může při regulaci autofagie spolupracovat s IRE1 nebo PERK⁵⁴.

Jak již bylo načrtnuto, UPR je důležitý mediátor odolnosti buněk na hypoxii a také regulátor autofagie. Zároveň je pravděpodobné, že proces autofagie může chránit hypoxické buňky před stresem ER. Tato ochrana může být prostřednictvím degradace toxických proteinových agregátů, které se hromadí během ER stresu, nebo také nepřímo prostřednictvím udržování určitého energetického stavu, což však zůstává zajímavou oblastí pro další výzkum.

5.3. mTOR, autofagie a hypoxie

Hypoxie reguluje proteosyntézu také inhibicí tvorby druhého translačního iniciačního komplexu, eukaryotického iniciačního faktoru 4F (eIF4F). Translace eukaryotické mRNA obvykle začíná připojením komplexu eIF4F na čepičku mRNA⁷⁵.

Limitujícím faktorem komplexu eIF4F je přítomnost eIF4E, jehož dostupnost je kontrolována jeho disociací z proteinu vázajícího eIF4E (4E-BP). Během normoxických podmínek je 4E-BP hyperfosforylován a neváže eIF4E. Avšak během hypoxie nebo hladovění je 4E-BP hypofosforylován, což zvyšuje jeho afinitu k eIF4E a inhibuje tak translaci⁷⁶.

K hypofosforylaci 4E-BP během hypoxie dochází především kvůli inhibici mTOR kinasy⁵⁴. Aktivita mTOR je stimulována nutričními a růstovými signálními faktory prostřednictvím dráhy PI3K. Za podmínek příznivého růstu, mTOR potlačuje autofagii a tedy stimuluje buněčný růst. (viz. kapitola 4.1.).

Hlavní funkcí mTOR je stimulace proteosyntézy a buněčného růstu prostřednictvím fosforylace proteinkinasy S6K (p70S6K), dále 4E-BP a nakonec prostřednictvím fosforylace kinasy eukaryotického elongačního faktoru (eEF2K)⁵⁴.

Mechanismus vedoucí k inhibici mTOR během hypoxie zahrnuje proteiny komplexu tuberosní sklerozy, TSC1 a TSC2. Buňky, kterým některý z těchto proteinů chybí, nejsou schopné během hypoxie snižovat aktivitu mTOR⁷⁷. TSC2 je GAP (z angl. „GTPase-Activating Protein“) GTPasy Rheb, která je „upstream“ regulátorem mTOR. Komplex TSC1/TSC2 přeměňuje GTPasu Rheb na její inaktivní GDP-vázající formu, což vede k snížení aktivity mTOR. Overexprese Rheb naopak zabraňuje inhibici aktivity mTOR vyvolané hypoxií⁵⁴.

K aktivaci komplexu TSC1/TSC2 a inhibici mTOR během hypoxie dochází prostřednictvím nejméně dvou nezávislých mechanismů (obr. 7, str. 22). První z nich je dráha přes HIF-dependenční cíl REED1 (z angl. „regulated in development and DNA damage response 1“), který stimuluje aktivitu TSC1/TSC2 uvolněním TSC2³⁹. Druhý mechanismus vyžaduje přítomnost systému kontrolujícího energetický stav buňky. V tomto mechanismu se uplatňuje AMPK, která je schopná za podmínek nízkého obsahu ATP snižovat proteosyntézu. Zvýšení poměru AMP/ATP vede k aktivaci AMPK prostřednictvím mechanismu zahrnujícího alosterickou modifikaci a fosforylaci. AMPK je takto aktivována postupně během metabolického stresu (např. nedostatek glukosy nebo aminokyselin) nebo hypoxie, následně dochází k fosforylaci a aktivaci TSC2, což má za následek pokles aktivity mTOR³⁵.

Zajímavostí je, že HIF-cíl BNIP3 interaguje s Rheb a snižuje jeho hladinu GTP. Bylo ukázáno, že BNIP3 má během hypoxie důležitou roli při inhibici aktivity mTOR⁷⁸.

Tyto výsledky a skutečnost, že REDD1 je také HIF-indukovatelný gen, naznačují spojení mezi HIF, signalizací mTOR a regulací autofagie.

6. Autofagie a ischemie/reperfuse

6.1. Ischemie a reperfuse

Ischemická choroba srdeční je jedno z nejčastěji se vyskytujících onemocnění v rozvinutých zemích světa. Je nejčastější příčinou závažné morbidity i mortality dospělé populace. Ischemická choroba srdeční je definována jako *ischemie myokardu*, a to buď klidová, nebo při zvýšení nároků na dodávku kyslíku, např. při námaze, vznikající na podkladě patologických změn koronárního řečiště. V naprosté většině případů je způsobena aterosklerosou věnčitých tepen⁷⁹.

Při formulování exaktní definice ischemie lze vycházet ze dvou charakteristických rysů ischemie – snížení nebo úplné zamezení dodávky kyslíku tkáním (hypoxie až anoxie) a větší či menší akumulace odpadových metabolitů v závislosti na rozsahu uzavření zásobujících cév⁸⁰. Ischemie myokardu je tedy způsobena nedostatečným přívodem krve, což vede k poruše rovnováhy mezi dodávkou kyslíku a jeho potřebou v myokardu.

Pod pojmem **reperfuse** rozumíme obnovení adekvátního zásobování ischemického myokardu kyslíkem spolu s transportem odpadových produktů nahromaděných v této tkáni během ischemie a představuje prakticky jedinou možnost udržení životaschopnosti kardiomyocytů. Reperfuse ischemického myokardu však není jednoduchým procesem, který bezproblémově obnovuje metabolické a funkční procesy v srdci, ale dochází – v závislosti na několika rozhodujících faktorech – k jejímu více či méně výraznému poškození, projevujícímu se charakteristickou kontraktilní dysfunkcí srdce. Soubor změn, které nastávají v takto postiženém orgánu, se označuje jako **I/R poškození**. Všechny tyto procesy charakterizuje reversibilní nebo ireversibilní poškození buněk myokardu, které nastalo během reperfuse orgánu po předchozí ischemii⁸¹.

6.2. Aktivace autofagie v srdci během ischemie a reperfuse

Funkční úloha autofagie v srdci během I/R je značně složitá. Indukce autofagie v srdci byla poprvé popsána v 70. letech minulého století Sybersem a jeho týmem⁸², kteří pozorovali, že v srdcích ještě nenarozených myší se nacházejí autofagosomy obsahující poškozené organely. Na jejich studii navázal Decker se svým týmem, kteří dělali pokusy na srdcích králíků a zjistili, že hypoxické podmínky trvající 40 minut vedou ke zvýšení počtu autofagických vesikul a reperfuse následující po 20 nebo 40 minutové hypoxii vyvolává obrovské zesílení autofagie⁸³.

Další studie věnované autofagii v srdci se naplno rozběhly až o mnoho let později, kdy byl objasněn molekulární mechanismus autofagie. Mnohé pozdější výzkumy poukazovaly na to, že se autofagie vyskytuje během chronické ischemie myokardu v prasečích a lidských srdcích. Během akutní I/R byla autofagie pozorována v potkaních a myších srdcích⁸⁴. Ze všech těchto studií, vykonaných *in vivo* a také *in vitro* vyplývá, že ischemie vyvolává autofagii, která je následně ještě zesílena během reperfuse. Na rozdíl od tohoto závěru, Gustaffson a Gotlieb na modelu HL-1 myocytů zjistili, že autofagie byla během ischemie inhibována, ale během reperfuse se opět aktivovala⁸⁵.

6.3. Spouštěče autofagie během ischemie a reperfuse

K nejdůležitějším spouštěčům autofagie během I/R patří hladina ATP, AMPK, BNIP3, vápníku, reaktivních forem kyslíku a dusíku, dále pak mitochondriální permeabilní tranzitní póry, stres ER a UPR.

6.3.1. Hladina ATP a AMPK

Je známo, že k upregulaci autofagie dochází v reakci na pokles nebo celkové vyčerpání buněčného obsahu ATP⁸⁶. Za normálních podmínek se ATP tvoří prostřednictvím oxidativní fosforylace v mitochondriích myocytů⁸⁷. Během ischemie myokardu však dochází k zastavení oxidativní fosforylace, což způsobuje pokles hladiny ATP v buňce, následně vzrůst poměru AMP/ATP a aktivaci AMPK. Aktivovaná AMPK

zvyšuje absorpci a oxidativní metabolismus mastných kyselin, taktéž zvyšuje transport glukosy a glykolysu^{13,88}.

Matsui a spol. zkoumali izolované srdeční myocyty a zjistili, že nedostatek glukosy vyvolává autofagii, kterou je možné inhibovat přítomností dominantně negativní AMPK. Dále také zjistili, že autofagie vyvolaná ischemií myokardu je snížena u myši s overexpresí dominantně negativní AMPK, což následně vedlo k většímu infarktu myokardu⁸⁹. Tyto výsledky naznačují, že AMPK má důležitou roli v srdečních myocytech při zprostředkování autofagie vyvolané ischemií.

V současnosti však není znám signální mechanismus, kterým AMPK aktivuje autofagii v srdci. Je známo, že aktivace AMPK způsobuje fosforylaci komplexu TSC2, což vede k inhibici savčího mTOR, hlavního negativního regulátoru autofagie³⁵. V srdečních myocytech vystavených anoxii a také v ischemických srdcích izolovaných podle Langendorffa vedla aktivace AMPK, prostřednictvím fosforylace eEF2 k inhibici proteosyntézy, ale neinhibovala mTOR⁹⁰. Matsui a spol. nepozorovaly navzdory výrazné aktivaci AMPK během ischemie žádný výraznější pokles fosforylace kinasy p70S6⁸⁶, což naznačuje, že aktivita mTOR nemůže působit *in vivo* během ischemie. Zdá se tedy, že autofagie vyvolaná během ischemie, může být zprostředkována prostřednictvím dráhy AMPK-eEF2 kinasy spíše než prostřednictvím inhibice mTOR.

Další možností je, že AMPK stimuluje autofagii stabilizací p27^{kip1}, což je inhibitor komplexu cyklin-cyklin dependentní kinasa, který prostřednictvím fosforylace brání vzniku apoptosy, ale stimuluje autofagii v stresových podmínkách, jakými může být například nedostatek glukosy⁸⁴. Molekulární mechanismus, kterým p27^{kip1} podporuje autofagii, dodnes není znám.

Nedávné studie zjistili, že HIF-1 reguluje autofagii a přežívání buněk. Protože HIF-1 je v srdci během ischemie upregulován⁹¹, přičemž je aktivován prostřednictvím AMPK⁹², je pravděpodobná také tato možnost zprostředkování aktivace autofagie během ischemie.

6.3.2. BNIP3

Důležitou úlohu během I/R poškození hraje BNIP3⁶², je to BH3-only protein, který je upregulován za hypoxických podmínek⁹³. Mnohé studie ukazují, že BNIP3 způsobuje upregulaci autofagie v různých typech buněk, včetně myocytů. Gusstaffson a Lee zjistili, že overexprese BNIP3 v HL-1 myocytech⁶² a také v srdečních myocytech u dospělých

způsobuje výraznou indukci autofagie (Y Lee, AB Gustaffson, nepublikované pozorování, 2008)¹³. Dále zjistili, že overexprese dominantně negativního proteinu BNIP3 v HL-1 myocytech snižuje proces autofagie vyvolaný prostřednictvím simulované I/R⁶², což naznačuje, že BNIP3 přispívá k aktivaci autofagie během I/R.

Upregulace autofagie během hypoxie vyžaduje HIF-1 indukovanou expresi BNIP3⁵⁶. Bylo také zjištěno, že exprese malé BNIP3 interferující RNA nebo dominantně negativní formy BNIP3 snižuje autofagii vyvolanou hypoxií⁵⁷. Naproti tomu studie pracující s rakovinovými buněčnými liniemi ukázaly, že hypoxií vyvolaná aktivace autofagie nebyla závislá na nedostatku živin nebo expresi BNIP3, ale zahrnovala aktivaci AMPK⁵⁵.

Je zřejmé, že jsou potřebné další výzkumy pro definování úlohy BNIP3 během autofagie zprostředkované hypoxií. Rozumným vysvětlením však zůstává, že BNIP3 existuje jako integrální mitochondriální membránový protein a tedy může způsobovat poškození mitochondrií s následnou sekundární aktivací autofagie pro odstranění těchto poškozených organel¹³. BNIP3 tedy přímo souvisí s aktivací mitofagie.

6.3.3. Vápník

Během ischemie sodno-vápenná pumpa v plasmatické membráně působí opačně, což způsobuje zaplavení buněk vápenatými ionty. Následkem ischemie je tedy vyšší hladina intracelulárního Ca^{2+} . Bylo zjištěno, že vzrůst cytosolického vápníku je také potenciálním spouštěčem autofagie. Ca^{2+} -mobilizující činidla, například vitamín D, ionomycin a ATP inhibují hlavní regulátor autofagie mTOR, což má za následek hromadění autofagosomů mechanismem závislým na Beclin1 a Atg7³⁷. Proto je velmi pravděpodobné, že zvýšení intracelulárního Ca^{2+} je jedním z mnoha faktorů, které mohou vyvolávat autofagii během ischemie.

6.3.4. Reaktivní formy kyslíku a dusíku

Mezi reaktivní formy kyslíku, ROS (z angl. „reactive oxygen species“) patří jednak volné kyslíkové radikály, které mají jeden nebo více nepárových elektronů, jako je $\text{OH}\bullet$, $\text{O}_2\bullet^-$ nebo neradikálové deriváty kyslíku, jako je peroxid vodíku (H_2O_2) nebo kyselina

chlorná (HClO). Jde o velmi toxické molekuly, které poškozují membrány buněk a další buněčné komponenty.

Během ischemie myokardu jsou ROS přítomny jen v malém množství, které se však zvýší při obnovení krevního toku koronární arterií (reperfusní paradox). Tomuto efektu může být zabráněno nebo může být zmírněn přítomností antioxidantů. Během I/R jsou v myokardu produkovány reaktivní formy kyslíku, které mohou v myocytech aktivovat autofagii¹³. Například u novorozenců bylo zjištěno, že podání lipopolysacharidů zvyšuje ROS a způsobuje autofagii v kardiomyocytech⁹⁴.

Je známo, že hlavním zdrojem ROS jsou mitochondrie. Nedávno bylo zjištěno, že mitochondrie mohou prostřednictvím ROS kromě apoptosy vyvolávat také autofagii¹³. Přítomnost „ROS-scavengeru“ po podání inhibitorů komplexů I a II mitochondriálního elektronového transportního řetězce (mETC), které způsobí velkou produkci ROS v buňkách, vede k snížení autofagie, což naznačuje, že ROS generované z mETC mohou aktivovat autofagii⁹⁵.

H₂O₂ reguluje autofagii oxidací esenciálního zbytku cysteinu Atg4, čímž jej inaktivuje. To následně vede k akumulaci komplexu LC3-PE na membráně fagoforu a tvorbě autofagosomů⁹⁶.

Oxid dusný (NO) má důležitou roli při ochraně srdce před I/R poškozením⁸⁵. Jeho nadměrné množství ovšem přispívá k selhání srdce. Existuje důkaz, že NO může v buňkách aktivovat autofagii. Podání NO donoru S-nitrosocysteinu způsobuje vznik autofagie, přičemž bylo pomocí elektronové mikroskopie zjištěno, že autofagosomy zaplavují poškozené mitochondrie⁹⁷. Naproti tomu bylo ukázáno, že v myocytech novorozenců, kterým byl podán NO donor SIN-1, se genová exprese autofagických genů Beclin1, Atg5 a Atg12 nemění⁹⁸, což naznačuje, že NO by neměl způsobovat upregulaci autofagie v srdečních myocytech. Tato studie ovšem měřila jenom genovou expresi a neposuzovala, či NO vyvolává tvorbu autofagosomů.

6.3.5. Mitochondriální permeabilní tranzitní póry

Otevírání mitochondriálních permeabilních tranzitních pórů (mPTP) může také vyvolávat autofagii v savčích buňkách⁹⁹. Overexprese Ca²⁺-aktivované cysteinové proteasy Calpainu10 způsobuje rozpínání mitochondrií, zvyšuje autofagii a může být blokována inhibitorem mPTP, cyklosporinem A¹⁰⁰. Bylo také zjištěno, že inhibice mPTP

cyklosporinem A má za následek snižování upregulace autofagie po I/R v HL-1 myocytech (Hamacher-Brady A, Gottlieb RA, nepublikované pozorování, 2006)¹³. Reperfuse spouští otvírání póry mPTP¹⁰¹, což může být „upstream“ signálem pro indukci autofagie během I/R¹³.

6.3.6. Stres ER a UPR

ER hraje důležitou roli při syntéze a skládání proteinů, i při udržování Ca²⁺-homeostasy. Jak bylo uvedeno v kapitole 5.2, narušení prostředí ER způsobuje stres ER a může vést k aktivaci UPR, včetně inhibice translace proteinů. Rápidní snížení proteosyntézy zvyšuje expresi chaperonů ER a podporuje odstraňování špatně poskládaných proteinů¹⁰².

Bylo zjištěno, že UPR je aktivována například v srdcích myši vystavených I/R, v přežívších kardiomyocytech myši z hraniční oblasti infarktového ložiska i v myocytech srdečních komor novorozených potkanů a dospělých myši vystavených ischemii nebo I/R¹⁰³.

Také stres ER je spojován s indukcí autofagie¹⁰⁴. Hromadění nesbalených proteinů vyvolává autofagii prostřednictvím aktivace snímačů stresu ER, jakými jsou v savcích buňkách například PERK nebo IRE1^{71,73}. Avšak jestli je tímto způsobem vyvolaná autofagie v srdci vystaveném I/R protektivní nebo škodlivá zůstává neobjasněná⁸³.

7. Autofagie a kardioprotekce

V současnosti rostou důkazy, že autofagie je zapojena do prevence různých onemocnění, k nimž se samozřejmě řadí také srdeční choroby. V srdci funguje autofagie převážně jako „pro-survival“ dráha, a to především během buněčného stresu tím, že odstraňuje proteinové agregáty a poškozené organely, dále také může být pro buňky prospěšná především proto, že recykluje proteiny a tak vytváří volné aminokyseliny a mastné kyseliny, které jsou zapotřebí pro udržování energetické produkce. Takto chrání srdce před vlivem nadměrného hladovění, ischemií a hypoxií nebo také před nadměrnou β -adrenergní stimulací. Pokud je autofagie spuštěna nadměru, což se děje například během reperfuse, může vést až k buněčné smrti, pravděpodobně prostřednictvím nadměrného

odstraňování nejen poškozených organel, ale také důležitých složek cytosolu¹⁰⁵. Zvýšená autofagická aktivita byla v kardiomyocytech pozorována při působení rozmanitých kardiovaskulárních stresů, včetně hladovění, chronické ischemie, reperfusního poškození, tlakového přetížení, kardiomyopatie nebo selhání srdce¹⁰⁶.

Dnes je již samozřejmostí skutečnost, že autofagie je nepostradatelná při udržování buněčné homeostasy a také je velice důležitá pro správnou srdeční funkci a strukturu¹⁰⁶. Chyba nebo poškození tohoto procesu má neblahé dopady na funkci srdce. Například vyřazení Atg5 v srdci narušuje proces autofagie a má za následek nahromadění abnormálních organel a rychlý vývoj srdeční dysfunkce¹⁰⁷. Dalším příkladem může být Danonova nemoc, která je charakterizována jako těžká srdeční dysfunkce u pacientů nebo také u myši s poškozenou autofagickou degradací v důsledku nedostatku proteinu LAMP-2¹⁰⁸.

Autofagie může kromě odstraňování toxických proteinových agregátů, také chránit srdce odstraňováním poškozených a nefunkčních organel, například odstraňování poškozených mitochondrií. Poškozené mitochondrie mohou být škodlivé pro buňku tím, že uvolňují pro-apoptotické faktory jako je cytochrom c, který dokáže aktivovat apoptosu¹⁰⁹. Dá se tedy konstatovat, že se autofagie podílí na kardioprotektivním účinku zabraňováním aktivace apoptosy.

Když je po ischemii zahájena reperfuze, dochází k otevírání mPTP¹⁰¹, což může být signálem pro autofagosomy, aby začaly izolovat mitochondrie a následně se spouští proces mitofagie. V kardiomyocytech vystavených ischemii je upregulován mitochondriální protein BNIP3. BNIP3 stimuluje apoptotickou buněčnou smrt, která je signalizována během I/R poškození srdce prostřednictvím porušení mitochondriální integrity, což následně vede ke zvýšené tvorbě superoxidu a uvolnění pro-apoptotických faktorů. Aktivace BNIP3 je ale také spojována s upregulací autofagie, čemu nasvědčuje vysoká hladina autofagosomů obsahujících fragmentované mitochondrie. Upregulace autofagie tedy s největší pravděpodobností představuje protektivní reakci na smrtelnou BNIP3-signalizaci, a to odstraňováním poškozených a špatně těsnících mitochondrií a následnému předcházení aktivaci apoptosy¹⁰⁵.

Pro stav ischemie je typická snížená dodávka kyslíku a živin a též snížená tvorba ATP prostřednictvím oxidativní fosforylace. Tyto podněty vyvolávají autofagii, což může mít pro srdce protektivní účinky, protože autofagická degradace proteinů a organel generuje volné aminokyseliny a mastné kyseliny, které mohou být použité pro

proteosyntézu nebo pro udržování mitochondriální produkce ATP, a tak podporovat přežívání srdečních buněk. Proto vzrůst autofagie koreluje s funkčním zotavením a záchranou myokardu po I/R, zatímco prodloužená ischemie koreluje s ireversibilním poškozením a kontraktilní dysfunkcí¹⁰⁵. Bylo zjištěno, že když se ischemie prodlouží až na 60 minut, tak jsou během reperfuse přítomné obrovské a pravděpodobně nefunkční lysosomy¹¹⁰, což značí, že prodloužená ischemie narušuje, resp. poškozuje autofagicko-lysosomální dráhu.

I když je indukce autofagie během fáze ischemie protektivní, její další zvýšení během reperfusní fáze může způsobovat buněčnou smrt⁸⁴. Dá se tedy říct, že autofagie chrání srdce během ischemie, ale během reperfuse může být škodlivá. Jestli je indukce autofagie během I/R prospěšná nebo škodlivá může záviset také na rozsahu počáteční ischemie. Když je úroveň ischemie mírná, aktivace autofagie během reperfuse může být také mírná a tedy protektivní¹⁰⁵. Samozřejmě jsou zapotřebí ještě nespočetné výzkumy, které by přeložily všechny tyto poznatky týkající se autofagie do klinické léčby za účelem snížení I/R poškození.

7.1. Modulace autofagie pro terapeutické účely

Modulace autofagické dráhy může představovat potenciální budoucí terapeutický cíl pro léčbu nebo prevenci různých kardiovaskulárních onemocnění. Avšak i přes objevy mnohých specifických genů a signalizačních drah zapojených do regulace autofagie, jsou terapeutické přístupy jak modulovat autofagii v kardiovaskulárních onemocněních velmi omezené. Inhibitory autofagie, které se v současnosti v experimentech na buněčných kulturách používají, jako je inhibitor PI3K třídy III, 3-methyladenin (3-MA), jsou pro jejich vysokou toxicitu nevhodné pro experimenty *in vivo*¹¹¹. Nejefektivnějším spouštěčem autofagie v savcích buňkách je nutriční hladovění, tedy strategie, která samozřejmě není *in vivo* moc atraktivní nebo je dokonce z kardiovaskulárního hlediska až nebezpečná. U potkanů přerušované hladovění chrání srdce před ischemickým poškozením¹¹², pravděpodobně prostřednictvím anti-apoptického mechanismu a prostřednictvím indukce autofagie. Prodloužené hladovění však spouští těžké kardiovaskulární komplikace a smrt srdce.

Autofagie může být v srdečních myocytech po I/R snížena vlivem endogenního srdečního peptidu urocortinu¹¹³, který inhibuje expresi Beclin1. Další složky schopné

regulovat autofagii v srdci jsou například β -blokátor propranol, blokátor vápenného L-kanálu, verapamil, (oba mají stimulační účinek) nebo β -adrenoreceptorový agonista, isoproterenol, který zvyšuje hladinu cAMP a tím inhibuje autofagii¹⁰⁵. Inhibitor mTOR a spouštěč autofagie, rapamycin může být také použit na léčbu srdce. Podání rapamycinu má v izolovaných srdcích myši podobné protektivní účinky před I/R poškozením jako preconditioning, a to prostřednictvím otvírání mitochondriálních K_{ATP} kanálů. Kromě toho rapamycin v nízkých dávkách (25-100 nM) snižuje nekrosu i apoptosu v kardiomyocytech vystavených I/R¹¹⁴.

Hromadění proteinových agregátů v kardiomyocytech nastává buď v reakci na hemodynamický stres (tachykardie, přechodný vzestup tlaku krve), nebo jako reakce na genetickou mutaci důležitých proteinů. Zatím není známo, zda existují přirozené rozdíly v typech proteinových agregátů, které se tvoří a/nebo jsou asociované s autofagickou reakcí. Některé studie naznačují, že zvýšená autofagická aktivita neodstraňuje přímo agregáty samotné, ale spíše jejich prekursory, a to posunutím rovnováhy pryč od tvorby agregátů¹¹⁵. Patofysiologický výsledek může být určen závažností a/nebo trváním autofagické reakce nebo povahou autofagického substrátu¹¹⁶. Tato dávková a kontextová závislost úlohy autofagie v srdečních onemocněních představuje nové, speciální výzvy pro další studie.

V současnosti však není známo, jak dlouho je možné aktivovat autofagii bez škodlivých následků pro buňku. Navíc neexistuje dobré vysvětlení pro rozpor mezi skutečností, že autofagická buněčná smrt kardiomyocytů u pacientů trpících na srdeční selhání je pozorovaná pouze v menšině buněk, zatímco funkční dopad je často dramatický. Navíc se zatím neví, zda stárnoucí nebo dlouho žijící buňky, k jakým patří například kardiomyocyty, jsou méně schopné vyvolávat autofagii v porovnání s ostatními typy buněk¹⁰⁵.

Z terapeutického hlediska bude pro lékaře a vědce výzvou zjistit, jakým způsobem selektivně zapnout přežívání zprostředkované autofagií při léčbě srdečních onemocnění bez aktivace dráhy buněčné smrti.

8. Metody stanovení autofagie

Dlouhou dobu byly metody stanovení autofagie velice omezené a neuspokojivé. Až v posledních letech, úměrně lepšímu porozumění molekulárních mechanismů autofagie, se tyto metody mohly naplno rozvinout. Dnes existuje spousta užitečných a konvenčních metod, které lze s úspěchem použít k monitorování autofagie u kvasinek, ale jenom několik z nich je vhodných pro monitorování autofagie u savců. Převažují zejména tři obecné typy metod:

1) mikroskopické metody

2) biochemické metody

3) metody detekce proteinových modifikací (SDS-PAGE, Western blotting)¹¹⁷.

Další dělení těchto metod je závislé na tom, zda je proces autofagie již ukončen – **metody monitorování autofagického toku**, nebo ještě neskončil, ale je ve svém rovnovážném stavu, tedy hladina autofagosomů se s časem nemění a tok autofagie přes systém je konstantní – **metody monitorování rovnovážného stavu autofagie¹¹⁸.**

8.1. Metody monitorování rovnovážného stavu autofagie

1. Elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie (EM) je nejstarší, ale stále nenahraditelnou metodou pro kvalitativní i kvantitativní charakterizaci autofagických organel (fagoforů, autofagosomů, amfiosomů a lysosomů). Dokonce lze říct, že fenomén autofagie byl pomocí elektronové mikroskopie objeven¹¹⁹. Mikroskopie patří mezi morfologické metody, které vyžadují jisté zkušenosti a čas. Často je docela obtížné odlišit autofagické organely od jiných struktur jenom na základě morfologie. Je potřebné si kromě jiného uvědomit, že dvojitou membránovou strukturu, která obsahuje cytoplasmatický materiál, nemusí mít vždy jenom autofagosom. Kvantifikaci autofagické aktivity je možné pomocí EM uskutečnit tak, že se spočítá oblast nebo objem autofagických vakuol a vyjádří se jako poměr k celkové cytoplasmatické oblasti nebo objemu¹¹¹. Kromě klasické EM se také používá imunoelektronová mikroskopie, kdy se pro ověření autofagického charakteru některých organel využívají protilátky proti autofagosomálním proteinům a LC3. Tato metoda je více specifická než klasická EM^{20,111}.

2. Atg8/LC3 western blotting

Protein Atg8/LC3 je, jak již bylo uvedeno, ubiquitinu podobný protein, který může konjugovat s PE. U kvasinek pak vzniká Atg8-PE. U savců Atg8 sestává z rodiny proteinů a je označován jako LC3. Nejdříve je LC3 syntetizován v nezpracované formě, proLC3, která je pak převedena na proteolytickou formu, které na C-konci chybějí aminokyseliny, LC3-I a nakonec je modifikována do formy konjugované s PE, LC3-II¹¹⁸.

Atg8-PE/LC3-II je jediným proteinovým markrem, který je s jistotou asociován s kompletním autofagosomem, ale může být také lokalizován na fagoforech. Když je u kvasinek indukována autofagie, tak celkové množství Atg8 je alespoň 10-násobně zvýšeno. U savců, když je zvýšena přeměna LC3-I na LC3-II nebo pokles hladiny LC3-II vzhledem k LC3-I, tak nemusí být nutné změněna celková hladina LC3¹¹⁸. V savčích buňkách má LC3 tři isoformy: LC3A, LC3B a LC3C, které jsou v různých tkáních různě distribuované a měli bychom je při monitorování autofagie brát do úvahy. V srdci se nacházejí zejména isoformy LC3A a LC3B¹²⁰.

Western blotting tedy může být s lehkostí používán k monitorování změn hladiny LC3, ale je nutno poznamenat, že normální hladina LC3-II není dostatečným důkazem autofagie.

3. Fluorescenční mikroskopie

Nejčastěji zastoupená isoforma LC3B (dále označována jako LC3) a její na N-konci značená forma pomocí fluorescenčního proteinu GFP, GFP-LC3, se také často využívá k monitorování autofagie, a to prostřednictvím nepřímé imunofluorescence nebo přímé fluorescenční mikroskopie²⁰. Měření je založeno na vzrůstu fluorescence LC3 nebo GFP-LC3. Tato metoda je též užitečná v studiích *in vivo*, ve kterých se využívají transgenní organismy, např. *Drosophila melanogaster* nebo myši¹¹⁸. Také je možno používat pro imunocytochemii nebo imunohistochemii protilátky anti-LC3. Tato metoda je založena na monitorování endogenního proteinu, avšak je omezena mírou schopnosti jeho detekce, neboť se často stává, že jeho množství je pod hladinou detekce¹¹⁸.

Použitím nepřímé fluorescenční mikroskopie a imunoelektronové mikroskopie lze také detekovat endogenní hladinu Atg18 (savčí WIPI-1), protože distribuce GFP-Atg18 se jeví být velice podobná distribuci GFP-LC3¹²¹.

4. Kinasová aktivita TOR a Atg1

Jak již bylo uvedeno, v mnoha systémech vede inhibice TOR k indukci autofagie. Aktivita TORC1, který negativně inhibuje autofagii transkripčně nezávislým způsobem, může být monitorována pomocí změn fosforylace jejího cílového proteinu nebo „downstream“ efektoru, kterými jsou kinasa p70S6K nebo protein S6K¹²². V případě kinasy p70S6K je sledována fosforylace na threoninu 389, který je přímým cílem TOR a je citlivý na rapamycin. Další možností je kvantifikace p70S6K kinasové aktivity *in vitro*¹¹⁸.

Když je vyvolána autofagie, je zvýšena Atg1 kinasová aktivita, proto je možné měřit Atg1 kinasovou aktivitu k ověření, zda je autofagie opravdu indukována⁴³.

5. Regulace transkripce

V některých situacích je indukce autofagie doprovázena vzrůstem hladiny mRNA některých autofagických genů, jako například Atg8/LC3 nebo Atg12. Proto hodnocení hladiny LC3 mRNA pomocí metody northern blotu nebo qRT-PCR, i přes to, že vzrůst LC3 mRNA je mírný a závislý na typu buněk a organismů, může poskytovat korelativní údaje týkající se indukce autofagie¹¹⁸.

8.2. Metody monitorování toku autofagie

1. Autofagická degradace proteinů

Testy proteinové degradace umožňují dobrou kvantifikaci autofagie¹¹⁸. Hlavní strategií je nejdříve označit buněčné proteiny inkorporací radioaktivní aminokyseliny (např. ¹⁴C-leucin nebo ¹⁴C-valin). Preferována je dlouhá doba inkubace, abychom dostatečně označili i dlouho žijící proteiny, které nejlépe reprezentují autofagické substráty. Vlastní testování začíná až po degradaci značených krátce žijících proteinů. V neporušené buňce nebo perfundovaném orgánu pak následuje časově-závislé uvolnění v kyselině rozpustné radioaktivity ze značeného proteinu, která se pak měří^{117,123}. Velká frakce měřené degradace je však neautofagického původu a proto by se měly současně měřit buněčné vzorky ošetřené 3-MA nebo aminokyselinami, které potlačují autofagii, a tyto hodnoty se pak odečtou od celkové hodnoty¹¹⁸.

2. Obrat LC3-II

Tok autofagie může být měřen pomocí metody western blot sledováním obratu LC3-II v přítomnosti a nepřítomnosti lysosomální degradace¹²⁴. K prevenci lysosomální degradace se používají inhibitory proteas (např. leupeptin, E64d), dále léky jako bafilomycin A₁, který mění lysosomální pH nebo také ošetření pomocí agents, které blokují fúzi autofagosomů s lysosomy¹¹⁸.

Jeden z novějších dodatků této metody se opírá o pozorování, že subpopulace LC3-II existuje v některých buněčných typech v cytosolické formě (LC3-IIs). Zdá se, že obsah cytosolického LC3-IIs a poměr mezi LC3-I a LC3-IIs koreluje se změnami autofagie a také poskytuje přesnější měření autofagického toku¹²⁵. Výhodou této metody je, že nevyžaduje přítomnost autofagických nebo lysosomálních inhibitorů.

3. GFP-Atg8/LC3

GFP-LC3 může být také využitý k sledování toku autofagie. Když se GFP-Atg8 nebo GFP-LC3 dostane do lysosomu, Atg8/LC3 je citlivý k degradaci, zatímco GFP protein je relativně resistantní na hydrolysu. Výskyt volného GFP během western blotu může být použit k monitorování lyse vnitřní autofagosomální membrány a rozkladu nákladu¹²⁶. Také přesun GFP-LC3 do lysosomu může být monitorován, a to pomocí fluorescenční mikroskopie. Avšak když je syntetizován nový GFP-LC3, tak může být problematické použití GFP fluorescence k sledování toku autofagie¹¹⁸. Potenciálním řešením tohoto problému je použití fotoaktivovatelné verze fluorescenčního proteinu, která umožňuje vykonání tohoto testu pulsní analysou¹²⁷.

Pro studium autofagie v srdci *in vivo* byla připravena transgenní myš, která nese gen pro konjugát červeného fluorescenčního proteinu, mCherry, nebo GFP s LC3 pod promotorem těžkého řetězce α myosinu, který je exprimován výhradně v srdci^{128,129}.

4. p62 western blot

Kromě LC3 lze také použít k monitorování toku autofagie jako marker p62/SQSTM1. Protein p62/SQSTM1 slouží jako spojení mezi LC3 a ubiquitinovanými substráty. Váže se přímo s Atg8/LC3 a tím napomáhá autofagii při degradaci ubiquitovaných proteinových agregátů. p62 se stává součástí kompletního autofagosomu a je degradován v autolysosomech¹³⁰. Nedávné studie ukazují, že inhibice autofagie

koreluje se vzrůstem hladiny p62, což naznačuje, že rovnovážná hladina tohoto proteinu odráží stav autofagie¹¹⁸.

5. Testy autofagické sekvestrace

K monitorování autofagické aktivity se může využít také sekvestrace autofagického nákladu, použitím elektroinjekčně vloženého cytosolického markeru, jakým je například ³H-rafinosa nebo endogenního cytosolického proteinu, jakým je například laktátdehydrogenasa. Principem je měření přenosu nákladu z rozpustné (cytosol) do nerozpustné (sediment) buněčné frakce, která kromě jiného obsahuje autofagické organely¹¹⁸.

6. Přeměna autofagických organel

Inhibitory autofagické sekvestrace (např. aminokyseliny, 3-MA nebo wortmannin) mohou být použity k monitorování úbytku autofagických organel a tím odhadnout jejich poločas života pomocí morfometrické elektronové mikroskopie. Když je ovšem fúze nebo intralysosomální degradace inhibována, tak přeměna autofagosomů nebo autolysosomů bývá různě postižena¹³¹. Naopak, výhodou je, že trvání takového experimentu je obvykle jenom pár hodin. K monitorování poločasu života autofagosomů se používá také fluorescenční mikroskopie, a to zejména monitorováním GFP-LC3 v přítomnosti a nepřítomnosti bafilomycinu A1 nebo sledováním GFP-LC3 po překonaném hladovění a následném zotavení v mediu bohatém na aminokyseliny¹¹⁸.

9. Závěr

Autofagie je složitý a pro buňku velice důležitý proces. Její schopnost odstraňovat dlouho žijící proteiny a cytoplasmatické organely ji staví na přední místo při udržování buněčné homeostasy. Značnou část své práce jsem proto věnovala popisu procesu autofagie a signalizačních drah vedoucích k regulaci tohoto životně důležitého děje.

V poslední době se autofagie studuje i v souvislosti s rozvojem nejrůznějších chorob. Není tomu jinak ani při onemocněních srdce. V této práci jsem se proto dále zaměřila na úlohu autofagie během hypoxických podmínek, které nastávají v procesu

ischemie. Také jsem se věnovala i procesu následného obnovení zásobení myokardu kyslíkem, tedy reperfusi.

Během ischemie má autofagie převážně kardioprotektivní a anti-apoptické účinky, například tím že odstraňuje poškozené organely, zejména mitochondrie v procesu mitofagie, jejichž hromadění může vést až k buněčné smrti. Během reperfuse je autofagie také aktivována, ovšem v mnohem silnější podobě, čímž se stává pro buňku nebezpečnou a může vést až k jejímu zániku, prostřednictvím nadměrného odstraňování nejen poškozených organel, ale i důležitých složek cytosolu. Autofagie může mít tedy pro srdce a jeho funkci protektivní i škodlivé účinky.

Zůstává ještě mnoho nezodpovězených otázek týkajících se autofagie v srdci, jejího přesného mechanismu během hypoxie/ischemie a reperfuse, a také možností její regulace, aby se dosáhlo co nejlepšího účinku autofagie v boji s nemocí.

Seznam použité literatury

- 1 Klionsky, D.J.: *J. Cell. Sci.* 118, 7-18 (2005)
- 2 Bursch W., Ellinger A., Kienzl H., Torok L., Pandey S., Sikovska M., Walker R., Hermann R.S.: *Carcinogenesis*. 17, 1595-1607 (1996)
- 3 Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A. Jr, Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., Ohsumi, Y.: *Dev. Cell*. 5, 539–545 (2003)
- 4 Seglen, P.O., Bohley, P.: *Experientia*. 48, 158–172 (1992)
- 5 Yoshimori, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 453-458 (2004)
- 6 Mizushima, N.: *Genes Dev.* 21, 2861-2873 (2007)
- 7 Wang, C.W., Klionsky, D.J.: *Mol. Med.* 9, 65-76 (2003)
- 8 Majeski, A.E., Dice, J.F.: *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36, 2435–2444 (2004)
- 9 Mizushima, N., Ohsumi, Y., Yoshimori, T.: *Cell. Struct. Funct.* 27, 421-429 (2002)
- 10 Pattingre, S., Espert, L., Biard-Piechaczyk, M., Codogno, P.: *Biochimie* 90, 313-323 (2008)
- 11 Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., Levine, B.: *Cell*. 122, 927-939 (2005)
- 12 Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., Ohsumi, Y.: *EMBO J.* 20, 5971–5981 (2001)
- 13 Gustafsson, A.B., Gottlieb, R.A.: *Circ. Res.* 104, 150-158 (2009)
- 14 Yang, Y., Liang, Z., Gu, Z., Qin, Z.: *Acta Pharmacol Sin.* 26, 1421–1434 (2005)
- 15 Geng, J., Klionsky, D.J.: *EMBO reports*. 9, 859-864 (2008)
- 16 Mizushima, N., Noda, T., Ohsumi, Y.: *EMBO J.* 18, 3888–3896 (1999)
- 17 Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N., Ohsumi, Y.: *J. Biol. Chem.* 277, 18619–18625 (2002)
- 18 Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., et al.: *Nature*. 408, 488–492 (2000)
- 19 Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., Yoshimori, T.: *J. Cell. Sci.* 117, 2805-2812 (2004)
- 20 Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., et al.: *EMBO J.* 19, 5720–5728 (2000)
- 21 Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E.: *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36, 2503 – 2518 (2004)
- 22 Wang, C.W., Stromhaug, P.E., Kauffman, E.J., Weisman, L.S., Klionsky, D.J.: *J. Cell. Biol.* 163, 973–985 (2003)
- 23 Mesa, R., Salomon, C., Roggero, M., Stahl, P.D., Mayorga, L.S.: *J. Cell. Sci.* 114, 4041–4049 (2001)
- 24 Gutierrez, M.G., Munafò, D.B., Beron, W., Colombo, M.I.: *J. Cell. Sci.* 117, 2687–2697 (2004)

- 25 Nakamura, N., Matsuura, A., Wada, Y., Ohsumi, Y.: J. Biochem. 121, 338–344 (1997)
- 26 Teter, S.A., Eggerton, K.P., Scott, S.V., Kim, J., Fischer, A.M., Klionsky, D.J.: J. Biol. Chem. 276, 2083–2087 (2001)
- 27 Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sabatini, D.M.: Curr. Opin. Cell Biol. 17, 596-603 (2005)
- 28 Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N.: Cell 124, 471-484 (2006)
- 29 Scott, R.C., Schuldiner, O., Neufeld, T.P.: Dev. Cell 7, 167-178 (2004)
- 30 Jung, C.H., Ro, S.H., Cao, J., Otto, N.M., Kim, D.H.: FEBS Lett. 584, 1287-1295 (2010)
- 31 Loewith, R. et al.: Mol. Cell 10, 457-468 (2002)
- 32 Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., Sabatini, D.M.: Science 307, 1098-1101 (2005)
- 33 Lee, C.H., Inoki, K., Guan, K.L.: Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 47, 443-467 (2007)
- 34 Inoki, K., Corradetti, M.N., Guan, K.L.: Nat. Genet. 37, 19-24 (2005)
- 35 Hardie, D.G.: J. Cell Sci. 117, 5479-5487 (2004)
- 36 Feng, Z., Zhang, H., Levine, A.J., Jin, S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 8204-8209 (2005)
- 37 Hoyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Fehrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R., Mathiasen, I.S., Jaattela, M.: Mol. Cell 25, 193-205 (2007)
- 38 Sarbassov, D.D., Sabatini, D.M.: J. Biol. Chem. 280, 39505-39509 (2005)
- 39 Sofer, A., Lei, K., Johannessen, C.M., Ellisen, L.W.: Mol. Cell Biol. 25, 5834-5845 (2005)
- 40 Kim, E., Guan, K.L.: Cell Cycle 8, 1014-1018 (2009)
- 41 Findlay, G.M., Yan, L., Procter, J., Mieulet, V., Lamb, R.F.: Biochem. J. 403, 13-20 (2007)
- 42 Nobukuni, T., Joaquin, M., Roccio, M., Dann, S.G., Kim, S.Y., Gulati, P., Byfield, M.P., Backer, J.M., Natt, F., Bos, J.L., Zwartkruis, F.J., Thomas, G.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 14238-14243 (2005)
- 43 Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., Ohsumi, Y.: J. Cell. Biol. 150, 1507-1513 (2000)
- 44 Kawamata, T., Kamada, Y., Kabeya, Y., Sekito, T., Ohsumi, Y.: Mol. Biol. Cell 19, 2039-2050 (2008)
- 45 Kabeya, Y., Noda, N.N., Fujioka, Y., Suzuki, K., Inagaki, F., Ohsumi, Y.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 389, 612-615 (2009)
- 46 Kabeya, Y., Kamada, Y., Baba, M., Takikawa, H., Sasaki, M., Ohsumi, Y.: Mol. Biol. Cell 16, 2544-2553 (2005)
- 47 Klionsky, D.J., Meijer, A.J., Codogno, P., Neufeld, T.P., Scott, R.C.: Autophagy 1, 59-61 (2005)
- 48 Lee, S.B., Kim, S., Lee, J., Park, J., Lee, G., Kim, Y., Kim, J.M., Chung, J.: EMBO Rep. 8, 360-365 (2007)
- 49 Kametaka, S., Okano, T., Ohsumi, M., Ohsumi, Y.: J. Biol. Chem. 273, 22284-22291 (1998)
- 50 Sinha, S., Levine, B.: Oncogene 27, S137-S148 (2009)

- 51 Wei, Y., Pattingre, S., Levine, B.: Keystone Symposium on Autophagy in Health and Disease, Monterey, California, U.S.A (2007)
- 52 Tassa, A., Roux, M.P., Attaix, D., Bechet, D.M.: *Biochem. J.* 376, 577-586 (2003)
- 53 Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B.H., Jung, J.U.: *Nat. Cell Biol.* 8, 688-699 (2006)
- 54 Rouschop, K.M.A., Wouters, B.G.: *Curr. Mol. Med.* 9, 417-424 (2009)
- 55 Papandreou, I., Lim, A.L., Laderoute, K., Denko, N.C.: *Cell. Death. Differ.* 15, 1572-1581 (2008)
- 56 Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L.A., Tan, Y.S., Baek, J.H., Wesley, J.B., Gonzalez, F.J., Semenza, G.L.: *J. Biol. Chem.* 283, 10892-10903 (2008)
- 57 Azad, M.B., Chen, Y., Henson, E.S., Cizeau, J., McMillan-Ward, E., Israels, S.J., Gibson, S.B.: *Autophagy*. 4, 195-204 (2008)
- 58 Greijer, A.E., van der Groep, P., Kemming, D., Shvarts, A., Semenza, G.L., Meijer, G.A., van de Wiel, M.A., Belien, J.A., van Diest, P.J., van der Wall, E.: *J. Pathol.* 206, 291-304 (2005)
- 59 Guo, K., Searfoss, G., Krolikowski, D., Pagnoni, M., Franks, C., Clark, K., Yu, K.T., Jaye, M., Ivashchenko, Y.: *Cell. Death. Differ.* 8, 367-376 (2001)
- 60 Pattingre, S., Levine, B.: *Cancer Res.* 66, 2885-2888 (2006)
- 61 Chen, J.L., Lin, H.H., Kim, K.J., Lin, A., Ou, J.H.J., Ann, D.K.: *Autophagy*. 5, 244-246 (2009)
- 62 Hamacher-Brady, A., Brady, N.R., Logue, S.E., Sayen, M.R., Jinno, M., Kirschenbaum, L.A., Gottlieb, R.A., Gustafsson, A.B.: *Cell. Death. Differ.* 14, 146-157 (2007)
- 63 Semenza, G.L.: *Autophagy*. 4, 534-536 (2008)
- 64 Wouters, B.G., van den Beucken, T., Magagnin, M.G., Koritzinsky, M., Fels, D., Koumenis, C.: *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 487-501 (2005)
- 65 Koritzinsky, M., Seigneuric, R., Magagnin, M.G., van den Beucken, T., Lambin, P., Wouters, B.G.: *Radiother. Oncol.* 76, 177-186 (2005)
- 66 Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., Ron, D.: *Nat. Cell Biol.* 2, 326-332 (2000)
- 67 Liu, C.Y., Kaufman, R.J.: *J. Cell Sci.* 116, 1861-1862 (2003)
- 68 Ding, W.X., Ni, H.M., Gao, W., Yoshimori, T., Stolz, D.B., Ron, D., Yin, X.M.: *Am. J. Pathol.* 171, 513-524 (2007)
- 69 Koritzinsky, M., Rouschop, K.M., van den Beucken, T., Magagnin, M.G., Savelkoul, K., Lambin, P., Wouters, B.G.: *Radiother. Oncol.* 83, 353-361 (2007)
- 70 Bi, M., Naczki, C., Koritzinsky, M., Fels, D., Blais, J., Hu, N., Harding, H., Novoa, I., Varia, M., Raleigh, J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Bell, J., Ron, D., Wouters, B.G., Koumenis, C.: *EMBO J.* 24, 3470-3481 (2005)
- 71 Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E., Momoi, T.: *Cell. Death. Differ.* 14, 230-239 (2007)
- 72 Petrovski, G., Das, S., Juhasz, B., Kertesz, A., Tosaki, A., Das, D.K.: *Antioxid. Redox. Signal.* v tisku (2010)

- 73 Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tani, I., Yoshinaga, K., Shiosaka, S., Hammarback, J.A., Urano, F., Imaizumi, K.: *Mol. Cell. Biol.* 26, 9220–9231 (2006)
- 74 Bernales, S., McDonald, K.L., Walter, P.: *PLoS Biol.* 4, e423 (2006)
- 75 Gingras, A.C., Raught, B., Sonenberg, N.: *Annu. Rev. Biochem.* 68, 913–963 (1999)
- 76 Hay, N., Sonenberg, N.: *Genes Dev.* 18, 1926–1945 (2004)
- 77 Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R.L., Manning, B.D., Reiling, J.H., Hafen, E., Witters, L.A., Ellisen, L.W., Kaelin, W.G., Jr.: *Genes Dev.* 18, 2893–2904 (2004)
- 78 Li, Y., Wang, Y., Kim, E., Beemiller, P., Wang, C.Y., Swanson, J., You, M., Guan, K.L.: *J. Biol. Chem.* 282, 35803–35813 (2007)
- 79 Hradec J., Býma S.: Ischemická choroba srdeční. Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře. Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, Praha (2007)
- 80 Rendeková V., Pecháň I.: *Cardiology.* 9, 320–324 (1999)
- 81 Rendeková V., Pecháň I.: *Cardiology.* 9, 42–48 (2000)
- 82 Sybers, H.D., Ingwall, J., DeLuca, M.: *Recent. Adv. Stud. Cardiac. Struct. Metab.* 12, 453–463 (1976)
- 83 Decker, R.S., Wildenthal, K.: *Am. J. Pathol.* 98, 425–444 (1980)
- 84 Matsui, Y., Kyoji, S., Takagi, H., Hsu, Ch., Hariharan, N., Ago, T., Vatner, S.F., Sadoshima, J.: *Autophagy.* 4, 409–415 (2008)
- 85 Hamacher-Brady, A., Brady, N.R., Gottlieb, R.A.: *J. Biol. Chem.* 281, 29776–29787 (2006)
- 86 Matsui, Y., Takagi, H., Qu, X., Abdellatif, M., Sakoda, H., Asano, T., Levine, B., Sadoshima, J.: *Circ. Res.* 100, 914–922 (2007)
- 87 Gustafsson, A.B., Gottlieb, R.A.: *Autophagy.* 4, 416–421 (2008)
- 88 Arad, M., Seidman, C.E., Seidman, J.G.: *Circ. Res.* 100, 474–488 (2007)
- 89 Takagi, H., Matsui, Y., Hirotsu, S., Sakoda, H., Asano, T., Sadoshima, J.: *Autophagy.* 3, 405–407 (2007)
- 90 Horman, S., Beauloye, C., Vertommen, D., Vanoverschelde, J.L., Hue, L., Rider, M.H.: *J. Biol. Chem.* 278, 41970–41976. (2003)
- 91 Kido, M., Du, L., Sullivan, C.C., Li, X., Deutsch, R., Jamieson, S.W., Thistlethwaite, P.A.: *J. Am. Coll. Cardiol.* 46, 2116–2124 (2005)
- 92 Lee, M., Hwang, J.T., Lee, H.J., Jung, S.N., Kang, I., Chi, S.G., Kim, S.S., Ha, J.: *J. Biol. Chem.* 278, 39653–39661 (2003)
- 93 Kubasiak, L.A., Hernandez, O.M., Bishopric, N.H., Webster, K.A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 12825–12830 (2002)
- 94 Hickson-Bick, D.L., Jones, C., Buja, L.M.: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 44, 411–418 (2008)
- 95 Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S.J., Gibson, S.B.: *J. Cell. Sci.* 120, 4155–4166 (2007)
- 96 Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., Elazar, Z.: *EMBO J.* 26, 1749–1760 (2007)

- 97 Barsoum, M.J., Yuan, H., Gerencser, A.A., Liot, G., Kushnareva, Y., Graber, S., Kovacs, I., Lee, W.D., Waggoner, J., Cui, J., White, A.D., Bossy, B., Martinou, J.C., Youle, R.J., Lipton, S.A., Ellisman, M.H., Perkins, G.A., Bossy-Wetzell, E.: *EMBO J.* 25, 3900–3911 (2006)
- 98 Rabkin, S.W., Klassen, S.S.: *Nitric Oxide.* 16, 339–347 (2007)
- 99 Elmore, S.P., Qian, T., Grissom, S.F., Lemasters, J.J.: *FASEB J.* 15, 2286–2287 (2001)
- 100 Arrington, D.D., Van Vleet, T.R., Schnellmann, R.G.: *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 291, C1159–C1171 (2006)
- 101 Halestrap, A.P., Clarke, S.J., Javadov, S.A.: *Cardiovasc. Res.* 61, 372–385 (2004)
- 102 Rutkowski, D.T., Kaufman, R.J.: *Trends. Cell. Biol.* 14, 20–28 (2004)
- 103 Thuerauf, D.J., Marcinko, M., Gude, N., Rubio, M., Sussman, M.A., Glembotski, C.C.: *Circ. Res.* 99, 275–282 (2006)
- 104 Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., Klionsky, D.J.: *J. Biol. Chem.* 281, 30299–30304 (2006)
- 105 De Meyer, G.R.Y., Martinet, W.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1793, 1485–1495 (2009)
- 106 Nishida, K., Kyoï, S., Yamaguchi, O., Sadoshima, J., Otsu, K.: *Cell Death Differ.* 16, 31–38 (2009)
- 107 Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M., Omiya, S., Mizote, I., Matsumura, Y., Asahi, M., Nishida, K., Hori, M., Mizushima, N., Otsu, K.: *Nat. Med.* 13, 619–624 (2007)
- 108 Nishino, I., Fu, J., Tanji, K., Yamada, T., Shimojo, S., Koori, T., Mora, M., Riggs, J.E., Oh, S.J., Koga, Y., Sue, C.M., Yamamoto, A., Murakami, N., Shanske, S., Byrne, E., Bonilla, E., Nonaka, I., Di Mauro, S., Hirano, M.: *Nature.* 406, 906–910 (2000)
- 109 Gustafsson, A.B., Gottlieb, R.A.: *J. Clin. Immunol.* 23, 447–459 (2003)
- 110 Gustafsson, A.B., Gottlieb, R.A.: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 44, 654–661 (2008)
- 111 Mizushima, N.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2491–2502 (2004)
- 112 Ahmet, I., Wan, R., Mattson, M.P., Lakatta, E.G., Talan, M.: *Circ.* 112, 3115–3121 (2005)
- 113 Valentim, L., Laurence, K.M., Townsend, P.A., Carroll, C.J., Soond, S., Scarabelli, T.M., Knight, R.A., Latchman, D.S., Stephanou, A.: *J. Mol. Cell Cardiol.* 40, 846–852 (2006)
- 114 Khan, S., Salloum, F., Das, A., Xi, L., Vetovec, G.W., Kukreja, R.C.: *J. Mol. Cell Cardiol.* 41, 256–264 (2006)
- 115 Rubinsztein, D.C.: *Nature* 443, 780–786 (2006)
- 116 Rothermel, B.A., Hill, J.A.: *Circ. Res.* 103, 1363–1369 (2008)
- 117 Klionsky, D.J., Cuervo, A.M., Seglen, P.O.: *Autophagy* 3, 181–206 (2007)
- 118 Klionsky, D.J. et al.: *Autophagy* 4, 151–175 (2008)
- 119 Ashford, T. P., Porter, K. R.: *J. Cell Biol.* 12, 198–202 (1962)
- 120 He, H., Dang, Y., Dai, F., Guo, Z., Wu, J., She, X., Pei, Y., Chen, Y., Ling, W., Wu, C., Zhao, S., Liu, J.O., Yu, L.: *J. Biol. Chem.* 278, 29278–29287 (2003)

- 121 Proikas-Cezanne, T., Ruckerbauer, S., Stierhof, Y.D., Berg, C., Nordheim, A.: FEBS Lett. 581, 3396-3404 (2007)
- 122 Erlich, S., Alexandrovich, A., Shohami, E., Pinkas-Kramarski, R.: Neurobiol. Dis. 26, 86-93 (2007)
- 123 Pattingre, S., Petiot, A., Codogno, P.: Methods Enzymol. 390, 17-31 (2004)
- 124 Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., Kominami, E.: Autophagy 1, 84-91 (2005)
- 125 Karim, M.R., Kanazawa, T., Daigaku, Y., Fujimura, S., Miotto, G., Kadowaki, M.: Autophagy 3, 553-560 (2007)
- 126 Shintani, T., Klionsky, D.J.: J. Biol. Chem. 279, 29889-29894 (2004)
- 127 Patterson, G.H., Lippincott-Schwartz, J.: Methods 32, 445-450 (2004)
- 128 Zhu, H., Rothermel, B.A., Hill, J.A.: Methods. Enzymol. 453, 343-363 (2009)
- 129 Perry, C.N., Kyoji, S., Hariharan, N., Takali, H., Sadoshima, J., Gottlieb, R.A.: Methods. Enzymol. 453, 325-342 (2009)
- 130 Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., Johansen, T.: J. Biol. Chem. 282, 24131-24145 (2007)
- 131 Kovács, A.L., Réz, G., Pálfi, Z., Kovács, J.: Cell Tissue Res. 302, 253-261 (2000)

Souhlas se zapůjčením

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka