

Received: 2011.04.26
Accepted: 2011.08.01
Published: 2011.08.12

Autofagia w niedokrwieniu mózgu*

Autophagy in brain ischemia

Alicja Kost¹, Daniela Kasprowska², Krzysztof Łabuzek³, Ryszard Wiaderkiewicz¹,
Bożena Gabryel²

¹ Zakład Histologii Katedry Morfologii, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny

² Zakład Farmakologii Katedry Farmakologii, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny

³ Klinika Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej Katedry Farmakologii, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Autofagia jest wewnątrzkomórkowym procesem degradacji makrocząsteczek i organelli komórkowych odgrywającym ważną rolę w utrzymaniu homeostazy oraz odpowiedzi na wiele bodźców uszkodzających. W ciągu ostatnich kilku lat pojawiło się wiele danych wskazujących na wyraźne nasilenie autofagii w neuronach po niedokrwieniu mózgu. W pracy przedstawiono biosyntezę autofagosomów oraz znaczenie i molekularne mechanizmy neuronalnej autofagii podstawowej i indukowanej. Omówiono także ostatnio opublikowane prace dotyczące potencjalnej roli autofagii w niedokrwieniu mózgu. Wyniki badań eksperymentalnych zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* sugerują, iż szlaki sygnałowe związane z autofagią mogą stanowić punkt wyjścia dla nowych strategii neuroprotekcyjnych.

Słowa kluczowe:

autofagia • apoptoza • nekroza • niedokrwienie • mózg

Summary

Autophagy is an intracellular process of macromolecule and organelle degradation, which plays an important role both in maintaining homeostasis and in responding to various harmful stimuli. Recent studies clearly indicate upregulation of autophagy in neurons challenged with brain ischemia. In this paper we present biosynthesis of autophagosomes as well as the role and molecular mechanisms of basal and induced neuronal autophagy. We have also reviewed recently published papers concerning the potential role of autophagy in brain ischemia. Results of both *in vivo* and *in vitro* experimental studies indicate that signaling pathways related to autophagy might become a target of new neuroprotective strategies.

Key words:

autophagy • apoptosis • necrosis • ischemia • brain

Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=955650>

Word count:

3856

Tables:

–

Figures:

3

References:

91

* Praca finansowana z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego N N401 072139.



Adres autorów: dr hab. n. med. Bożena Gabryel, Zakład Farmakologii Katedry Farmakologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, ul. Medyków 18, 40-752 Katowice, e-mail: bgabryel@interia.pl

Wykaz skrótów: **3-MA** – 3-metyloadenina; **Akt/PKB** – kinaza białkowa B; **AMP** – adenylozomonofosforan; **AMPK** – kinaza aktywowana AMP; **ATP** – adenylotrifosforan; **CaMKK** – kinaza kinaz kalmodulinozależnych; **CREB** – czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję genów zależnych od cAMP; **eIF2 α** – eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 2 α ; **ER** – retikulum endoplazmatyczne; **GTP** – guanozynotrifosforan; **HIF-1** – czynnik transkrypcyjny indukowany niedotlenieniem; **Ire1** – enzym zależny od inozytolu; **JNK** – kinaza białkowa fosforylująca N-koniec białka Jun; **LKB1** – serynowo-treoninowa kinaza 1; **MAP1B** – białko związane z mikrotubulami 1B; **mLST8/G β L** – białko podobne do podjednostki β białka G; **mTOR** – ssaczy cel rapamycyny; **mTORC1** – kompleks 1 kinazy mTOR składający się z kinazy mTOR oraz białek Raptor i mLST8/G β L; **mTORC2** – kompleks 2 kinazy mTOR składający się z kinazy mTOR oraz białek Rictor, mLST8/G β L i mSin1; **mSIN1** – ssaczy białko oddziałujące z białkową kinazą zależną od stresu; **OUN** – ośrodkowy układ nerwowy; **PCD** – programowana śmierć komórki; **PDK1** – kinaza białkowa zależna od fosfatydyloinozytoli; **PE** – fosfatydyloetanolamina; **PERK** – kinaza białkowa umiejscowiona w retikulum endoplazmatycznym; **PI** – jodek propidyny; **PI3K** – kinaza 3-fosfatydyloinozytoli; **PIP3** – fosfatydyloinozytolo trifosforan; **PKC α** – kinaza białkowa C α ; **Raptor** – białko regulatorowe związane z mTOR; **RFT** – reaktywne formy tlenu; **Rheb** – homolog białka Ras wzbogacony w mózgu; **Rictor** – białko niewrażliwe na rapamycynę towarzyszące mTOR; **rt-PA** – rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu; **TRAF2** – czynnik związany z receptorem TNF; **TSC1** – hamartyna; **TSC2** – tuberyna; **UPR** – odpowiedź na nieprawidłowo złożone białka; **Vps34** – kinaza 3-fosfatydyloinozytoli.

WSTĘP

Autofagia (samostrawienie) jest definiowana jako wysoce zachowawczy filogenetycznie mechanizm, w przebiegu którego komórka degraduje uszkodzone, obumarłe bądź zużyte elementy swej struktury [54]. W tym złożonym procesie angażującym układ endosomalno-lizosomalny trawione są wytworzone w nadmiarze, stare lub niepotrzebne makrocząsteczki (w tym białka o długim okresie półtrwania) oraz organella komórkowe (mitochondria, peroksysomy, fragmenty aparatu Golgiego i retikulum endoplazmatycznego) [77].

Autofagię obserwuje się zarówno podczas prawidłowego wzrostu i różnicowania komórek, jak i w sytuacjach patologicznych, tj. głodzenia, infekcji bakteryjnych, powstawania źle pofałdowanych białek czy obecności uszkodzonych komórkowych elementów strukturalnych [35,38,68]. W wielu badaniach wykazano, że skuteczna autofagia może chronić przed apoptozą [74]. Mimo iż autofagia odgrywa ważną prożyciową rolę i warunkuje homeostazę komórki może także prowadzić do jej śmierci [13]. Z tego powodu autofagia jest często opisywana jako typ II programowanej śmierci komórki (type II programmed cell death – PCD II) – w odróżnieniu od apoptozy, czyli PCD I [40,76].

Ostatnie lata przyniosły wiele danych wskazujących, że zaburzenia autofagii mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie schorzeń ośrodkowego układu nerwowego (OUN) w tym choroby Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona czy niedokrwienia/niedotlenienia mózgu [3,63].

Udar niedokrwienno (zawał) mózgu stanowi trzecią co do częstości przyczynę śmierci osób dorosłych w krajach wysokorozwiniętych oraz główny powód trwałego inwalidztwa osób po 40 roku życia [11,39]. Niedokrwienie OUN

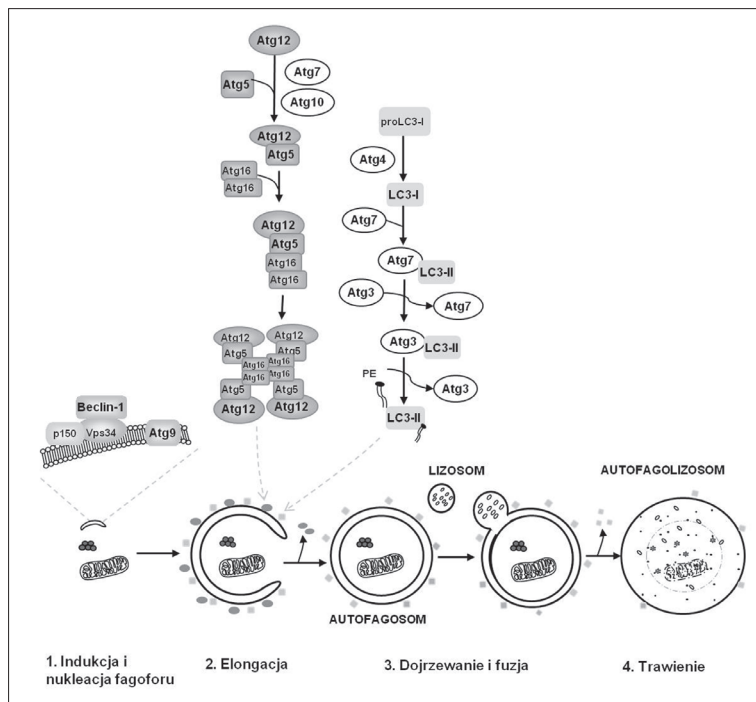
jest także częstym urazem okołoporodowym, mogącym doprowadzić do znacznych zaburzeń w rozwoju funkcji kognitywnych i motorycznych na skutek permanentnego uszkodzenia mózgu [19]. Rozmiar i charakter uszkodzeń spowodowanych niedokrwieniem zależą od jego zasięgu i czasu trwania oraz stopnia rozwoju mózgu [91]. Obecnie jedyną skuteczną terapią farmakologiczną udaru niedokrwienno mózgu jest leczenie trombolityczne z użyciem rekombinowanego tkankowego aktywatora plazminogenu (rt-PA). Terapia trombolityczna charakteryzuje się jednak dużym ograniczeniem ze względu na wąskie – trzygodzinne – okno terapeutyczne [32]. Dlatego też uwaga badaczy i klinicystów skupia się na poszukiwaniu alternatywnych możliwości terapeutycznych. Badania prowadzone są w dwóch zasadniczych kierunkach: (i) przywrócenia prawidłowego przepływu krwi (reperfuzji) w obszarze objętym ischemią oraz (ii) neuroprotekcji, której celem jest zapobieganie występowaniu niekorzystnych zmian biochemicznych w wyniku kaskady niedokrwiennej [22].

Z literatury przedmiotu wynika, iż w patomechanizmie niedokrwienia mózgu istotną rolę odgrywać może autofagia [1,33,91]. Rola jaką autofagia odgrywa w komórkach nerwowych narażonych na ischemię jest dyskusyjna. Nie ulega jednak wątpliwości, że poznanie zarówno szlaków sygnalizacyjnych prowadzących do autofagii w niedokrwieniu, jak i mechanizmów regulujących współzależność: autofagia-apoptoza może się przyczynić do opracowania nowych strategii terapeutycznych.

BIOSYNTETA AUTOFAGOSOMÓW

Termin autofagia oznaczający dosłownie „samozjadanie” wprowadzono w latach sześćdziesiątych XX wieku [31]. Obecnie, zależnie od mechanizmu dostarczania do lizosomów materiału przeznaczanego do degradacji, wyróżnia

Ryc. 1. Biosynteza autofagosomów



się trzy podstawowe postaci autofagii: makroautofagię, mikroautofagię oraz autofagię zależną od chaperonów. Podmiotem przedstawionych niżej rozważań jest makroautofagia – prototypowa postać autofagii polegająca na formowaniu, dojrzewaniu oraz degradacji przez lizosomy wakuoli autofagicznych (nazywanych autofagosomami). Dlatego też termin „autofagia” używany w niniejszej pracy odnosi się jedynie do makroautofagii.

Autofagia jest czteroetapowym procesem obejmującym kolejno fazy: (i) indukcji polegającej na odgradzeniu części cytoplazmy przez błonę izolującą zwaną fagoforem (nukleacja); (ii) przekształcenia fagoforu w zamknięty i otoczony podwójną błoną autofagosom, który zawiera część cytoplazmy i organelle; (iii) dojrzewania autofagosomu poprzez fuzję jego zewnętrznej błony z lizosomem i utworzenie autofagolizosomu (nazywanego także autolizosomem); (iv) degradacji wewnętrznej błony autofagosomu, a następnie jego zawartości przez enzymy lizosomalne [18,58] (ryc. 1).

Za kontrolę procesu odpowiadają produkty rodziny wysoce zachowawczych ewolucyjnie genów Atg (AuTophagy-related). Z dotychczas opisanych 32 przedstawiciele białek Atg u drożdży [21], 14 wykazuje homologię z białkami ssaków [30]. Zdecydowana większość produktów genów Atg uczestniczy w procesie indukcji i formowania autofagosomu (Atg1-Atg10, Atg12-Atg14, Atg16-Atg18, Atg29, Atg31). Przebieg autofagii zależny jest od kaskady białek Atg i mechanizmu ich współdziałania [82].

Powstanie fagoforu inicjowane jest najprawdopodobniej w retikulum endoplazmatycznym (ER) pozostającym w dynamicznej równowadze z aparatem Golgiego i późnymi endosomami [4,86]. W obszarze indukcji obserwuje się nagromadzenie kompleksów białek Atg [70]. Główną rolę w tej fazie autofagii odgrywa transbłonowe białko Atg9.

Wykazano, że krąży ono pomiędzy siecią trans aparatu Golgiego, a późnymi endosomami dostarczając składników lipidowych niezbędnych do formowania i wydłużania błon fagoforu [61]. Atg9 nie stwierdza się w dojrzałych i w pełni ukształtowanych autofagosomach [28]. W mechanizm usuwania Atg9 z obszaru formowania fagoforu zaangażowana jest kinaza serynowo-treoninowa Atg1 (u ssaków funkcjonalnym homologiem jest kinaza Ulk1). Aktywność Atg1 podlega regulacji przez interakcje białko-białko, zwłaszcza z fosfoproteiną Atg13 [62,70]. W prawidłowych warunkach (np. podczas wzrostu) Atg13 występuje w postaci hiperufosforylowanej i wykazuje niewielkie powinowactwo do Atg1. Natomiast podczas głodzenia, hipoksji, niedoboru energii lub czynników wzrostowych Atg13 jest szybko defosforylowana, co skutkuje większym powinowactwem do Atg1 i indukcją autofagii z powodu uruchomienia kaskady białek Atg. Formowanie fagoforu (nukleacja) następujące po indukcji jest regulowane przez Atg1, Atg9 oraz kompleks zawierający kinazę 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K) klasy III (Vps34), Beklinę 1 i p150. Kinaza Vps34 jest zaangażowana w proces autofagii tylko wówczas, gdy występuje w kompleksie z Bekliną 1 i innymi białkami regulatorowymi. Interakcje te nasilają jej aktywność katalityczną i powodują zwiększone wytwarzanie fosfatydyloinozytolu trifosforanu (PIP3) – niezbędnego do elongacji fagoforu i przyłączania do niego kolejnych białek Atg [26].

Na etap elongacji składają się dwa procesy koniugacji, przypominające proteosomalną ścieżkę ubikwitynylacji białek. Pierwszy z nich inicjuje formowanie wiązania izopeptydowego pomiędzy C-końcówką glicyną Atg12, a wewnętrzny lizyną Atg5 [78]. W procesie tym pośredniczy Atg7, który powoduje zależną od ATP aktywację Atg12, a zatem działa homologicznie do enzymu E1 podczas ubikwitynylacji. Atg12 jest następnie przenoszona na Atg10 (działające podobnie do E2), co prowadzi do związania Atg12 z Atg5 [21]. Po niekowalencyjnym przyłączeniu dimeru Atg16L



do powstałych kompleksów Atg12-Atg5 powstają multimery Atg12-Atg5-Atg16L [5]. Sugeruje się, że multimery te odpowiadają za zakrzywienie powstającego fagoforu przez zaangażowanie drugiego systemu koniugacji, polegającego na przyłączeniu fosfatydyloetanolaminy (PE) do białka LC3 przy alternatywnym udziale proteaz Atg4, Atg7 (enzym E1) lub Atg3 (enzym E2) [47]. W procesie tym dochodzi do konwersji LC3 z rozpuszczalnej, cytoplazmatycznej postaci LC3-I w postać lipofilną LC3-II, co umożliwia wbudowanie go do błon autofagosomu i autofagolizosomu. Ponieważ ekspresja LC3-II jest ściśle skorelowana z ilością autofagosomów, stąd też jest uważana za najbardziej wiarygodny marker aktywnych autofagosomów i autofagolizosomów [87]. W wyniku kaskady powyższych zdarzeń z fagoforu powstaje w pełni ukształtowany autofagosom, którego wielkość w komórkach ssaków jest zróżnicowana i utrzymuje się w zakresie 0,5–1,5 μm [54]. LC-II pozostaje przyłączone do błony autofagosomu aż do fuzji z lizosomem, po której powstaje dojrzały autofagolizosom. W fuzji biorą udział białka SNARE i Rab, a zwłaszcza Rab7, które jest niezbędne dla dojrzewania autolizosomu [18].

AUTOFAGIA PODSTAWOWA W NEURONACH

Mizushima [53] zaproponował subklasyfikację autofagii w zależności od roli jaką pełni na podstawową (fizjologiczną) i indukowaną. W większości komórek, autofagia podstawowa utrzymuje się na niskim poziomie i z fizjologicznego punktu widzenia jest istotna dla konstytutywnego obrotu białek i innych składników cytoplazmy oraz selektywnej eliminacji organelli uszkodzonych lub zbędnych (np. mitochondriów lub peroksysomów) [77]. Przykładem autofagii podstawowej jest także eliminacja nadmiaru komórek podczas rozwoju zarodkowego. Ponadto sugeruje się, że może ona determinować długość życia organizmu [85].

Mimo iż podstawowy poziom autofagii jest niewątpliwie istotny do utrzymania homeostazy komórkowej, neurony w stanie fizjologicznym wykazują stosunkowo niewielką liczbę autofagosomów i prawdopodobnie powolną ich biosyntezę [89]. Niski poziom autofagii podstawowej w neuronach może być związany ze zdolnością tych komórek do wykorzystywania jako źródła energii nie tylko glukozy, ale także ciał ketonowych [7]. Ponadto, w warunkach silnego niedoboru substratów energetycznych (tj. ischemia), tymczasowym źródłem energii dla neuronów są przyległe astrocyty przekształcające glukozę do mleczanów w procesie glikolizy oraz zawierające zapasy glikogenu. Komórki astrocytarne działają protekcyjnie wobec neuronów również ze względu na intensywne wydzielanie czynników promujących przeżycie, tj. czynniki wzrostu i neuropeptydy [20]. Niski poziom neuronalnej autofagii podstawowej jest także warunkowany obecnością pewnych, swoistych dla neuronów białek. Przykładem może być występujące w znacznych ilościach w neuronach białko związane z mikrotubulami 1B (MAP1B), które z dużym powinowactwem wiąże LC3 i hamuje formowanie autofagosomów [89]. Należy jednak wspomnieć o alternatywnej tezie, która zakłada że neuronalna autofagia podstawowa zachodzi z taką samą intensywnością jak w innych komórkach, ale nowo wytworzone autofagosomy są efektywnie eliminowane przez szybką fuzję z lizosomami. Dlatego też w neuronach nie dochodzi do akumulacji „struktur przejściowych”

autofagii, a detekcja autofagosomów i innych markerów autofagii jest utrudniona [6].

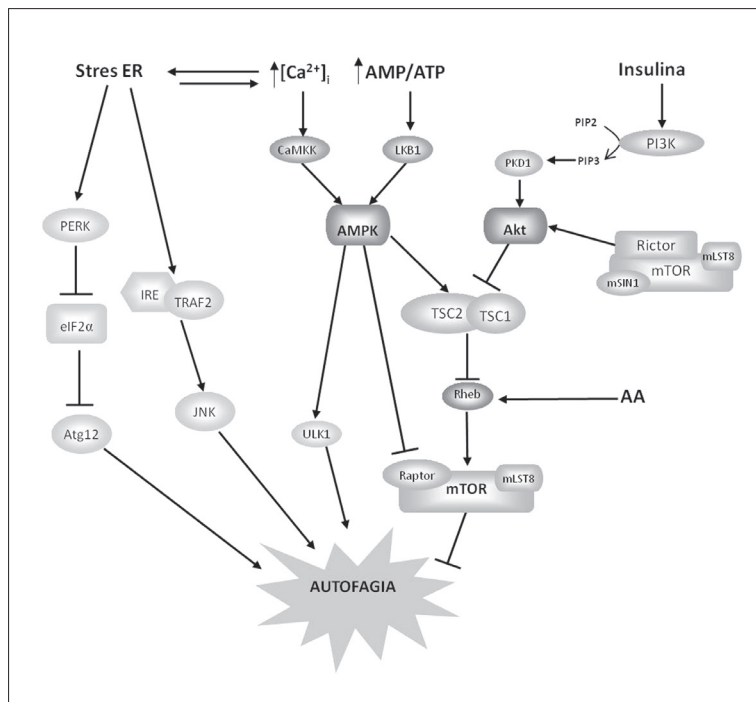
Autofagia neuronalna podlega regulacji przez kilka równoległych wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnałów, które są zaangażowane w przejście procesu z poziomu podstawowego (swoistego dla neuronów) w wysoce konserwowany stan indukowany (nazywany także aktywacją). Niedawno opublikowane wyniki badań na pierwotnych hodowlach neuronów korowych wskazują, iż taką rolę pełni sygnalizacja insulinowa [88]. Zidentyfikowano także potencjalne białkowe regulatory autofagii w neuronach, tj. proteiny DJ-1/PARK7 i p53. Krebiehl i wsp. [37] w modelu *in vitro* choroby Parkinsona stwierdzili, iż mutacja E64D genu kodującego DJ-1/PARK7 prowadzi do znacznego osłabienia autofagii podstawowej oraz akumulacji uszkodzonych mitochondriów [37]. Z kolei białko p53 w regulacji autofagii zdaje się wykazywać swoistą dychotomię: w prawidłowych warunkach metabolicznych jest regulatorem negatywnym, a pod wpływem czynników stresogennych - aktywującym proces. Jak wykazano w eksperymencie *in vitro* na kilku ludzkich i mysich liniach komórkowych (w tym neuroblastoma SH-SY5Y) podstawową rolę p53 w warunkach fizjologicznych jest supresja autofagii [73]. Natomiast w warunkach genotoksycznych, onkogenicznych lub deprywacji troficznej p53 pełni funkcję induktora autofagii [41].

Zaburzenia w prawidłowo zachodzącej neuronalnej autofagii podstawowej mogą stanowić podłoże chorób neurodegeneracyjnych [10]. Potwierdzają to wyniki badań przeprowadzonych na myszach transgenicznym, u których zablokowano autofagię przez swoistą dla neuronów delecję genów *Atg5* lub *Atg7*. U zwierząt obserwowano deficyty w rozwoju funkcji motorycznych, będących skutkiem postępującej neurodegeneracji związanej z gromadzeniem się nieprawidłowych białek, a następnie formowaniem agregatów i wtętotów wewnątrzkomórkowych [23,34]. Podstawowa autofagia w neuronach może mieć zatem dużo większe znaczenie biologiczne, niż początkowo przypuszczano. Obecnie uważa się, iż sprawne oczyszczenie rozproszonych białek cytoplazmatycznych w procesie fizjologicznej autofagii zapobiega akumulacji nieprawidłowych białek, które zakłócają prawidłowe funkcjonowanie neuronów i ostatecznie prowadzą do neurodegeneracji.

AUTOFAGIA INDUKOWANA W NEURONACH

Oprócz niedokrwienia/niedotlenienia bodźcami wyzwalającymi autofagię w mózgu są m.in.: deprywacja pokarmowa, neurotoksyny, ekscytotoksyczność czy zamknięte urazy głowy [41,52,89]. Podstawową funkcją autofagii jest zapewnienie prawidłowej odpowiedzi komórkowej na ograniczoną podaż składników odżywczych przez uruchomienie mechanizmu degradacji: autofagosom-lizosom. Podczas aktywacji procesu, w neuronach zachodzą zmiany polegające na deregulacji mechanizmów kontrolujących prowadzące do przejścia z poziomu podstawowego w indukowany, na którym dochodzi do znacznej intensyfikacji biosyntezy autofagosomów [89].

Zgromadzone dotąd dowody bezsprzecznie wykazują, że autofagia podlega kontroli przez regulatory, których indukcja zależy od dostępności składników odżywczych.



Ryc. 2. Autofagia indukowana w neuronach; → aktywacja, ⊥ blokowanie

Należą do nich: insulina, aminokwasy i kinaza aktywowana AMP (AMPK) działające poprzez białkową kinazę serynowo-treoninową mTOR (mammalian target of rapamycin) [90] (ryc. 2).

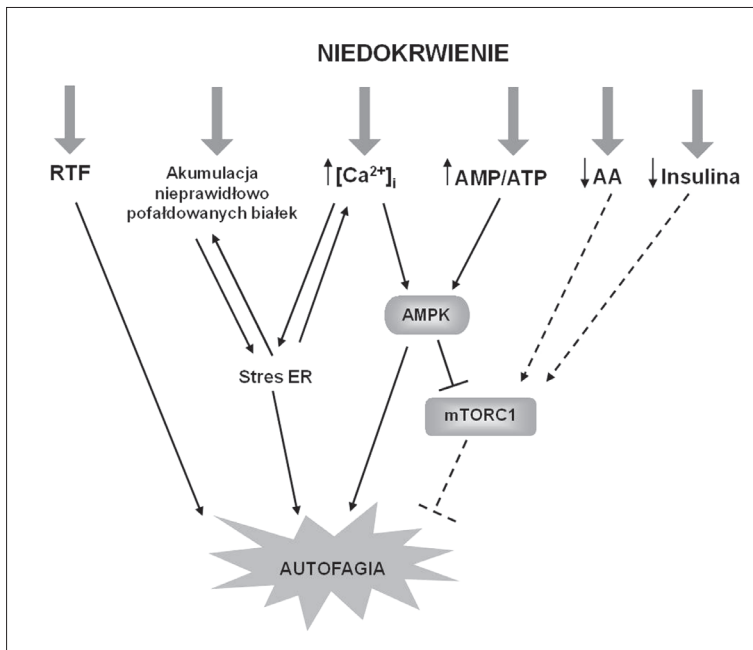
Według obecnego stanu wiedzy nadrzędną rolę w kontroli autofagii przypisuje się kinazie mTOR. Pełni ona w komórkach OUN wiele funkcji związanych z regulacją ich żywotności i różnicowania, transkrypcji, translacji, degradacji białek, organizacji cytoszkieletu i autofagii [24]. W komórkach ssaków mTOR występuje w postaci dwóch, funkcjonalnie odrębnych kompleksów białkowych: mTORC1 i mTORC2. Kompleks mTORC1 odgrywa rolę w regulacji autofagii, jest wysoce wrażliwy na rapamycynę (swoistego inhibitora mTOR). Natomiast mTORC2 charakteryzuje się niewrażliwością na rapamycynę i odpowiada za regulację cytoszkieletu aktywnego oraz aktywność kinaz PKC α i Akt. Składnikami obu kompleksów są kinaza mTOR i białko mLST8/G β L (G protein β -subunit like protein). Dodatkowo w skład kompleksu mTORC1 wchodzi białko Raptor (regulatory associated protein of mTOR), a w skład mTORC2 białka Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) i mSin1 [81].

Mechanizm, przez który mTOR działa jako negatywny regulator autofagii nie jest do końca poznany. Wydaje się, iż głównym szlakiem prowadzącym do aktywacji mTOR jest stymulowany przez insulinę szlak kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K). Kinaza PI3K zwiększa wytwarzanie PIP3, który wpływa na przemieszczenie się do błony komórkowej kinazy białkowej zależnej od fosfatydyloinozytolu (PDK1) oraz kinazy Akt. Aktywacja tej ostatniej zachodzi za pośrednictwem fosforylacji dwóch aminokwasów – treoniny 308 (Thr308) przez PDK1 i seryny 473 (S473) przez kompleks mTORC2. Aktywna kinaza Akt hamuje przez fosforylację aktywność kompleksu białek hamarty (TSC1) i tuberyny (TSC2) (tuberous sclerosis complex,

TSC1/TSC2), czyli głównego inhibitora szlaku sygnałowego mTOR. Inaktywacja kompleksu TSC1/TSC2 skutkuje osłabieniem aktywności GTP-azowej małego białka G – Rheb (homolog białka Ras wzbogacony w mózgu; Ras homolog enriched in brain). Jak wykazały liczne badania *in vivo* i *in vitro*, to właśnie białko Rheb związane z GTP jest silnym stymulatorem kinazy mTOR [57]. Ale oprócz szlaku insulinowego, kinaza mTOR może także ulegać aktywacji przez aminokwasy w podobnym mechanizmie polegającym na osłabieniu GTP-azowej aktywności białka Rheb [12]. Stąd też przyjmuje się, że zarówno sygnalizacja insulinowa uruchamiająca szlak kinazy PI3K, jak i bezpośrednia fosforylacja indukowana przez aminokwasy są niezbędne do pełnej efektywności enzymatycznej kinazy mTOR i supresji autofagii.

Przeciwnie do insuliny i aminokwasów działa aktywna kinaza AMPK, która na skutek hamowania sygnalizacji zależnej od mTOR pobudza proces autofagii (ryc. 2 i 3). AMPK reguluje szlaki metaboliczne włączając procesy wytwarzające energię, a wyłączając procesy ją zużywające optymalizując tym samym wewnątrzkomórkowe procesy energetyczne i pozwalając przetrwać okresy stresu komórkowego [75]. Wzrastający komórkowy poziom AMP lub (w mniejszym stopniu) spadek wytwarzania ATP prowadzi do aktywacji AMPK w wyniku fosforylacji treoniny 172 (Thr172) przez kinazy nadrzędne, do których należą serynowo-treoninowa kinaza 11 (LKB1) i kinaza kinaz kalmodulino-zależnych (CaMKK) [75]. Aktywna AMPK nasila autofagię hamując kompleks mTORC1 poprzez bezpośrednią fosforylację co najmniej dwóch białek: TSC2 na resztach serynowych różnych od miejsc docelowych innych kinaz oraz składowej kompleksu mTORC1 – białka Raptor [42]. Według ostatnich doniesień, AMPK może również aktywować autofagię bezpośrednio wpływając na kaskadę białek Atg. Kim i wsp. [29] wykazali bowiem, że w warunkach depriwacji glukozy AMPK indukuje autofagię





Ryc. 3. Czynniki indukujące autofagię w niedokrwieniu mózgu

poprzez fosforylację kinazy Ulk1 (ssaczy homolog kinazy Atg1) na resztach serynowych S317 i S777, co skutkuje kaskadą białek Atg [29].

Udział AMPK w aktywacji autofagii potwierdzono m.in. w eksperymencie *in vitro*, w którym czasowo wyciszono ekspresję genu kodującego AMPK w wyniku transfekcji krótkich interferujących RNA (siRNA) [49]. Świadczą o nim także wyniki badania nad autofagią aktywowaną wzrostem wapnia wewnątrzkomórkowego ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), w którym obserwowano supresję procesu w warunkach *in vitro* po zastosowaniu swoistego inhibitora AMPK – compound c (6-[4-(2-piperidyno-1-yl-etoksy)-fenylo]-3-pirydino-4-yl-pirazolonol[1,5-a] pirymidyna) [25].

Ostatnio pojawia się coraz więcej danych wskazujących, iż w obrębie komórki silnymi czynnikami aktywującymi autofagię jest stres retikulum endoplazmatycznego (stres ER) i dysfunkcja mitochondriów (ryc. 2 i 3). Zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu ER, polegające na obniżeniu zdolności do modyfikacji potranslacyjnych i właściwej kontroli przebiegu fałdowania białek określa się powszechnie jako odpowiedź na nieprawidłowo złożone białka (unfolded protein response – UPR). Wszystkie wymienione na początku podrozdziału czynniki wyzwalające autofagię (w tym niedokrwienie/niedotlenienie mózgu) są zidentyfikowane także jako bodźce indukujące stres ER [26]. Obecnie przyjmuje się, iż dwa szlaki sygnalizacyjne UPR są zaangażowane w sygnalizację autofagii indukowaną stresem ER: PERK/eIF2 α oraz Ire1/TRAF2/JNK [45]. Prawdopodobnie eIF2 α (eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 2 α) ostatecznie aktywuje autofagię poprzez wzrost ekspresji białka Atg12 oraz nasilenia konwersji LC3-I do LC3-II [36]. Ponadto wzrost stężenia wolnego wapnia w cytosolu ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), na skutek stresu ER, może aktywować autofagię w szlaku CaMKK/AMPK/mTORC1 [26].

Autofagia indukowana stresem ER może zostać zahamowana przez umiejscowioną w błonach retikulum

antyapoptyczną proteinę Bcl-2 [26]. Zaproponowano dwa mechanizmy inhibicji autofagii przez Bcl-2. Jeden z nich polega na obniżeniu stężenia stacjonarnego wapnia w ER ($[\text{Ca}^{2+}]_{ER}$) i przez to ilości wolnych jonów Ca^{2+} uwalnianych z ER po bodźcu stresowym. Nie dochodzi wtedy do aktywacji CaMKK i uruchomienia ścieżki CaMKK/AMPK/mTORC1. Drugi natomiast zakłada, że Bcl-2 może wstrzymać autofagię na skutek wiązania Bekliny 1, usuwając ją tym samym z kompleksu z PI3K niezbędnego dla etapu nukleacji [26].

Liczne badania sugerują także ścisły związek między dysfunkcją mitochondriów a autofagią. Zaburzenia funkcji mitochondriów i związane z nimi generowanie znacznych ilości reaktywnych form tlenu (RFT) są jednym z głównych czynników wyzwalających autofagię w następstwie udarów, urazów oraz w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych (ryc. 3).

RFT powodują uszkodzenie DNA, peroksydację lipidów mitochondrialnych oraz rozpad/wzrost przepuszczalności błon lizosomalnych [84]. Zaburzenie integralności lizosomów umożliwia interakcję uwolnionych z nich katepsyn z proapoptycznymi białkami rodziny Bcl-2 (Bax, Bak, tBid) prowadząc do indukcji mitochondrialnego szlaku apoptozy oraz aktywacji kaspaz i DNazy II [72]. Nadmiar RFT może również wpływać na mechanizm molekularny odpowiedzialny za regulację autofagii. Na przykład H_2O_2 generowany w warunkach stresu oksydacyjnego powoduje inaktywację proteazy cysteinowej Atg4, co promuje konwersję białka LC3, akumulację postaci lipidowej LC3-II w błonie fagoforu i formowanie autofagosomu [64].

AUFAGIA A APOPTOZA I NEKROZA W NIEDOKRWIENIU MÓZGU

Objawy uszkodzenia mózgu powstałe w wyniku niedokrwienia na skutek zakrzepu lub zatoru tętnic mózgowych są konsekwencją masowej śmierci komórek w obszarze ogniska niedokrwienne. Zaledwie kilka sekund

po zatrzymaniu mózgowego przepływu krwi dochodzi do uruchomienia tzw. kaskady niedokrwienia obejmującej kolejne zmiany biochemiczne, prowadzące do degradacji struktur i błon komórkowych i ostatecznie do śmierci komórek mózgowych [80]. U chorych dotkniętych ostrym udarem niedokrwinnym obserwuje się utratę około 120 milionów neuronów na godzinę [39]. Uszkodzeniu podlegają jednak nie tylko obszary mózgowia bezpośrednio dotknięte niedokrwieniem, ale także tkanka z nim granicząca określana jako strefa tzw. penumbry czyli półcienia niedokrwiennego [55]. Obszar penumbry stanowi cel potencjalnych strategii neuroprotektoryjnych. Mimo bowiem, iż czynność komórek strefy półcienia zanika, to jednak nie następują w nich natychmiastowe i trwałe zmiany morfologiczne [27].

Śmierć komórek w wyniku niedokrwienia może przebiegać w wyniku nekrozy i apoptozy. Obecność markerów obu tych procesów zaobserwowano wielokrotnie w eksperymentalnych modelach niedokrwienia mózgu zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* [43]. Te dwie postaci śmierci komórkowej różnią się od siebie pod względem morfologicznym i molekularnym. Nekrozę charakteryzuje gwałtowny obrzęk komórki i organelli oraz utrata integralności błony komórkowej, co prowadzi do uwalniania substancji aktywujących proces zapalny i uszkadzających sąsiednie tkanki. Natomiast podczas apoptozy dochodzi do obkurczania się jądra komórkowego i fragmentacji DNA, a następnie rozpadu komórki na ciała apoptotyczne otoczone błoną. Apoptozie nie towarzyszy zatem stan zapalny ani uszkodzenie komórek sąsiadujących [71]. Procesy te różni także zapotrzebowanie energetyczne. Nekroza jest uznawana za śmierć pasywną, natomiast wkroczenie komórki na drogę apoptozy wymaga nakładów energetycznych [59].

Wydaje się jednak, że zarówno mechanizmy leżące u podstaw poischemicznej śmierci neuronów, jak i ich kinetyka są znacznie bardziej złożone niż mogłoby się wydawać. Stwierdzono bowiem, że oprócz cech charakterystycznych apoptozy i nekrozy, niektóre komórki w obszarze objętym niedokrwieniem wykazują obecność białkowych markerów autofagii: Bekliny 1 i LC3-II [91]. Zwiększoną liczbę autofagosomów oraz ekspresję białek autofagicznych wykazano w eksperymentalnych modelach niedokrwienia ogniskowego [1,79] oraz przemijającego mózgu [44]. Autofagię wywołaną niedokrwieniem ogniskowym obserwowano u zwierząt doświadczalnych w korze mózgu, hipokampie i prążkowie [1,60]. Podobne wyniki otrzymano w eksperymentach *in vitro* na pierwotnych hodowlach neuronów narażonych na ischemię [51] oraz na linii nieśmiertelnych mysich neuronów hipokampa (komórki HT22) hodowanej w medium pozbawionym surowicy [69].

O zróżnicowanej odpowiedzi komórek nerwowych na niedokrwienie świadczyć może zaobserwowana w niektórych z nich jednoczesna aktywacja szlaków charakterystycznych dla autofagii i apoptozy. W modelu przemijającej, ogniskowej ischemii u szczura stwierdzono, że pewna subpopulacja neuronów kory i prążkowie wykazuje jednocześnie zwiększoną ekspresję Bekliny 1 i aktywację kaspazy 3 [60]. Również Carloni i wsp. [8] w modelu neurodegeneracji indukowanej niedoborem tlenu (hipoksją/ischemią) u noworodków szczurzych stwierdzili w części komórek kory mózgowej współwystępowanie podwyższonej ekspresji

Bekliny 1 i markerów typowych dla apoptozy. Najwięcej komórek z jednoczesną aktywacją autofagii i apoptozy badacze zidentyfikowali w powierzchniowych warstwach kory. Natomiast znacznie mniej takich cech wykazywały komórki jej głębszych warstw oraz regionu CA1 hipokampa. Co istotne, tylko w kilku neuronach regionów CA1 i CA2 hipokampa stwierdzono kolokalizację Bekliny 1 i jodku propidyny (PI) – znacznika nekrozy – co sugeruje, że wzrost ekspresji białka występuje głównie w komórkach indukujących program apoptozy [8]. Na podstawie opublikowanych danych oraz badań własnych nad niedokrwieniem mózgu Rami i Kögel [59] wprowadzili termin „apofagia” na określenie apoptotycznej śmierci komórek z jednoczesną nadekspresją Bekliny 1 i aktywacją kaspazy 3.

ROLA AUTOFAGII W NIEDOKRWIENIU MÓZGU

Na obecnym etapie wiedzy nie można jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, czy autofagia indukowana niedokrwieniem mózgu przyczynia się do śmierci neuronów, czy też działa jako endogenny mechanizm neuroprotektoryjny, a może jest jedynie epifenomenem apoptozy i nekrozy? Na podstawie dostępnych danych literaturowych można jednak wskazać trzy główne sugestie sformułowane obecnie o potencjalnym wpływie autofagii na ischemiczne neurony.

Po pierwsze wydaje się, iż autofagia może się przyczyniać do degeneracji neurynów w niedokrwieniu mózgu. Potwierdzeniem tej tezy jest stwierdzona przez Adhamiego i wsp. [1] szybka i masywna degeneracja aksonów neuronów korowych myszy 24 godz. po ischemii/hipoksji. Wykazano także związek między autofagią uruchomioną w wyniku aktywacji AMPK, a powiększeniem się obszaru niedokrwienia i gorszym rokowaniem [16,42]. Znaczną redukcję rozmiaru uszkodzeń poischemicznych oraz zmniejszoną liczbę martwych komórek obserwowano natomiast u myszy z delecją neuronalną genu *Atg7* [33]. Stwierdzono ponadto, że zahamowanie autofagii 3-metyloadeniną (3-MA) – swoistym inhibitorem kinazy Vps34 – powodowało wzrost żywotności neuronów w modelu ischemii *in vitro* [51]. W badaniach *in vivo* u szczurów z niedokrwieniem ogniskowym po podaniu 3-MA również obserwowano mniejsze uszkodzenia związane z redukcją obrzęku mózgu i deficytem funkcji motorycznych [79].

Po drugie, wielokrotnie wykazano jednak istotny udział autofagii w ochronie komórek neuronalnych przed śmiercią indukowaną hipoksją/ischemią. Efekt cytoprotekcyjny obserwowano m.in. w mysim modelu traumatycznego uszkodzenia mózgu [17], mózgach noworodków szczurzych narażonych na niedokrwienie/niedotlenienie [8] oraz mysich neuronach hipokampa linii HT22 hodowanych w medium pozbawionym surowicy [69]. Najbardziej istotnym mechanizmem neuroprotektoryjnego działania efektywnej autofagii w ischemii jest przypuszczalnie eliminacja uszkodzonych mitochondriów (tzw. mitofagia) i przerwanie apoptozy. Selektywną eliminację mitochondriów stwierdzono w komórkach eukariotycznych po zablokowaniu kaspaz, a zatem sekwestracja organelli może być mechanizmem zapobiegającym wejściu komórki w apoptozę [83]. Natomiast znikaniu mitochondriów częściowo zapobiegało podawanie bafilomycyny A1 – inhibitora fuzji autofagosomów z lizosomami – co potwierdza udział autofagii w tym procesie [83]. Ponadto, degradacja nieprawidłowo funkcjonujących



mitochondriów w autofagolisomach może być przejawem adaptacji metabolicznej komórki do warunków hipoksji regulowanej przez indukowaną hipoksją czynnik transkrypcyjny (HIF-1) [66]. Mitofagia w niedotlenieniu jest zatem uważana za mechanizm przystosowawczy komórki na poziomie metabolicznym, niezbędny do utrzymania homeostazy redoks i przeżycia [66].

Sekwestracji w autofagosomach ulegają także fragmenty ER uszkodzone na skutek działania RFT, co zapobiega uwolnieniu do cytoplazmy zgromadzonych tam zasobów wapnia oraz aktywacji apoptozy zależnej od kaspazy 11 [15]. Niezmiernie istotne z punktu widzenia endogennych mechanizmów neuroprotekcyjnych uruchamianych po przejściowym niedokrwieniu mózgu jest także usuwanie białek uszkodzonych i/lub agregatów białkowych poprzez autofagię. Niewydolność procesu „samostrawienia” może skutkować ich akumulacją, zwiększając tym samym poziom stresu komórkowego i w perspektywie przyczyniać się do opóźnionej śmierci neuronów [44].

Za pozytywnym wpływem autofagii przemawiają także liczne dowody wskazujące na neuroprotekcyjne działanie rapamycyny – farmakologicznego aktywatora procesu [48,56]. Carloni i wsp. [9] stwierdzili nasilenie neuronalnej autofagii z jednoczesnym osłabieniem apoptozy i wyraźnym zmniejszeniem uszkodzenia mózgu po podaniu rapamycyny noworodkom szczurzym narażonym na ischemię/hipoksję. Badacze obserwowali także silną fosforylację kinazy Akt oraz czynnika transkrypcyjnego CREB (cAMP response element binding protein), co potwierdza udział szlaku PI3K/Akt/mTOR w autofagii indukowanej niedokrwieniem.

Na podstawie ostatnio opublikowanych danych wskazuje się także, iż u podstaw neuroprotekcijnego wpływu hartowania ischemicznego (preconditioning) leży aktywacja autofagii [46,67].

Po trzecie, ze względu na to, iż autofagia jest procesem katabolicznym może opóźniać początek nekrozy przez

utrzymanie homeostazy jonowej [2]. Nie bez znaczenia jest tu także przypisanie kinazie mTOR – głównego regulatora autofagii – roli czujnika zmian w wewnątrzkomórkowym poziomie ATP [14]. Prawdopodobnie zmiany w ATP są przekazywane do mTOR za pośrednictwem aktywnej AMPK, ponieważ nawet niewielkie obniżenie cytosolowego stężenia ATP skutkuje relatywnie dużym wzrostem AMP potęgowanym dodatkowo aktywnością kinazy adenylanowej. Aktywacja AMPK hamuje ścieżki sygnałowe zależne od mTOR, indukuje autofagię i wyłącza szlaki metaboliczne zależne od ATP [12]. Warto w tym miejscu wspomnieć o idealnym umiejscowieniu w obrębie mitochondriów dwóch enzymów: mTOR na błonie zewnętrznej i kinazy adenylanowej w przestrzeni międzybłonowej, co umożliwiła szybką i zintegrowaną reakcję komórki na zmiany w stosunku ATP/AMP [50,65]. Jeśli jednak nie dojdzie do zmniejszenia deficytów energetycznych podczas reperfuzji, przedłużający się okres „stresu autofagicznego” może prowadzić do masywnej aktywacji enzymów lizosomalnych i ostatecznie nekrotycznej śmierci neuronu [2].

Na podstawie przytoczonych wyżej danych można przypuszczać, że autofagia, apoptoza i nekroza współwystępują w obszarze objętym niedokrwieniem, prowadząc do śmierci komórkowej o mieszanych cechach biochemicznych i morfologicznych, a autofagia jest procesem decydującym o losach neuronów.

PODSUMOWANIE

W literaturze pojawia się coraz więcej danych wskazujących na udział autofagii w patomechanizmie niedokrwienia mózgu. Kwestią dyskusyjną pozostaje czy aktywacja autofagii jest przejawem endogennego mechanizmu neuroprotekcijnego, czy wręcz przeciwnie przyczynia się do śmierci komórek. Dominuje jednak pogląd, że efektywna autofagia jest procesem ochronnym aktywowanym wcześniej w odpowiedzi na czynniki apoptogenne. Co więcej, uważa się, iż szlaki sygnałowe związane z autofagią mogą być podstawą nowych strategii neuroprotekcyjnych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Adhami F., Liao G., Morozov Y.M., Schloemer A., Schmithorst V.J., Lorenz J.N., Dunn R.S., Vorhees C.V., Wills-Karp M., Degen J.L., Davis R.J., Mizushima N., Rakic P., Dardzinski B.J., Holland S.K., Sharp F.R., Kuan C.Y.: Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy. *Am. J. Pathol.*, 2006; 169: 566–583
- [2] Adhami F., Schloemer A., Kuan C.Y.: The roles of autophagy in cerebral ischemia. *Autophagy*, 2007; 3: 42–44
- [3] Alirezaei M., Kemball C.C., Whitton J.L.: Autophagy, inflammation and neurodegenerative disease. *Eur. J. Neurosci.*, 2011; 33: 197–204
- [4] Axe E.L., Walker S.A., Manifava M., Chandra P., Roderick H.L., Habermann A., Griffiths G., Kistakis N.T.: Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.*, 2008; 182: 685–701
- [5] Barth S., Glick D., Macleod K.F.: Autophagy: assays and artifacts. *J. Pathol.*, 2010; 221: 117–124
- [6] Boland B., Kumar A., Lee S., Platt F.M., Wegiel J., Yu W.H., Nixon R.A.: Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, 2008; 28: 6926–6937
- [7] Boland B., Nixon R.A.: Neuronal macroautophagy: from development to degeneration. *Mol. Aspects Med.*, 2006; 27: 503–519
- [8] Carloni S., Buonocore G., Balduini W.: Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. *Neurobiol. Dis.*, 2008; 32: 329–339
- [9] Carloni S., Girelli S., Scopa C., Buonocore G., Longini M., Balduini W.: Activation of autophagy and Akt/CREB signaling play an equivalent role in the neuroprotective effect of rapamycin in neonatal hypoxia-ischemia. *Autophagy*, 2010; 6: 366–377
- [10] Cherra S.J. III, Dagda R.K., Chu C.T.: Autophagy and neurodegeneration: survival at a cost? *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2010; 36: 125–132
- [11] Chu C.T.: Eaten alive: autophagy and neuronal cell death after hypoxia-ischemia. *Am. J. Pathol.*, 2008; 172: 284–287
- [12] Codogno P., Meijer A.J.: Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ.*, 2005; 12: 1509–1518
- [13] Cuervo A.M.: Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.*, 2004; 14: 70–77
- [14] Dennis P.B., Jaeschke A., Saitoh M., Fowler B., Kozma S.C., Thomas G.: Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science*, 2001; 294: 1102–1105
- [15] Ding W.X., Ni H.M., Gao W., Yoshimori T., Stolz D.B., Ron D., Yin X.M.: Linking autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am. J. Pathol.*, 2007; 171: 513–524

- [16] Du L., Hickey R.W., Bayir H., Watkins S.C., Tyurin V.A., Guo F., Kochanek P.M., Jenkins L.W., Ren J., Gibson G., Chu C.T., Kagan V.E., Clark R.S.: Starving neurons show sex difference in autophagy. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 2383–2396
- [17] Erlich S., Alexandrovich A., Shohami E., Pinkas-Kramarski R.: Rapamycin is a neuroprotective treatment for traumatic brain injury. *Neurobiol. Dis.*, 2007; 26: 86–93
- [18] Eskelinen E.L.: Maturation of autophagic vacuoles in mammalian cells. *Autophagy*, 2005; 1: 1–10
- [19] Ferrari D.C., Nesic O., Perez-Polo J.R.: Perspectives on neonatal hypoxia/ischemia-induced edema formation. *Neurochem. Res.*, 2010; 35: 1957–1965
- [20] Gabryel B., Trzeciak H.I.: Role of astrocytes in pathogenesis of ischemic brain injury. *Neurotox. Res.*, 2001; 3: 205–221
- [21] Glick D., Barth S., Macleod K.F.: Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.*, 2010; 221: 3–12
- [22] Green A.R., Shuaib A.: Therapeutic strategies for the treatment of stroke. *Drug. Discov. Today*, 2006; 11: 681–693
- [23] Hara T., Nakamura K., Matsui M., Yamamoto A., Nakahara Y., Suzuki-Migishima R., Yokoyama M., Mishima K., Saito I., Okano H., Mizushima N.: Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 2006; 441: 885–889
- [24] Harris T.E., Lawrence J.C. Jr.: TOR signaling. *Sci STKE*, 2003; 2003: re15
- [25] Hoyer-Hansen M., Jäättelä M.: AMP-activated protein kinase: a universal regulator of autophagy? *Autophagy*, 2007; 3: 381–383
- [26] Hoyer-Hansen M., Jäättelä M.: Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ.*, 2007; 14: 1576–1582
- [27] Joźwiak-Bebenista M., Bednarek K., Nowak J.Z.: Działanie neuroprotektynne PACAP, VIP oraz pochodnych w niedokrwieniu mózgu. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 478–489
- [28] Kim J., Huang W.P., Stromhaug P.E., Klionsky D.J.: Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to *de novo* vesicle formation. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 763–773
- [29] Kim J., Kundu M., Viollet B., Guan K.L.: AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.*, 2011; 13: 132–141
- [30] Klionsky D.J.: Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007; 8: 931–937
- [31] Klionsky D.J.: Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy*, 2008; 4: 740–743
- [32] Kobayashi A., Członkowska A.: Leczenie trombolityczne w udarze niedokrwinnym mózgu. *Farmakoter. Psychiatr. Neurol.*, 2005; 1: 5–18
- [33] Koike M., Shibata M., Tadakoshi M., Gotoh K., Komatsu M., Waguri S., Kawahara N., Kuida K., Nagata S., Kominami E., Tanaka K., Uchiyama Y.: Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am. J. Pathol.*, 2008; 172: 454–469
- [34] Komatsu M., Waguri S., Chiba T., Murata S., Iwata J., Tanida I., Ueno T., Koike M., Uchiyama Y., Kominami E., Tanaka K.: Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 2006; 441: 880–884
- [35] Komatsu M., Waguri S., Ueno T., Iwata J., Murata S., Tanida I., Ezaki J., Mizushima N., Ohsumi Y., Uchiyama Y., Kominami E., Tanaka K., Chiba T.: Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J. Cell Biol.*, 2005; 169: 425–434
- [36] Kouroku Y., Fujita E., Tanida I., Ueno T., Isoai A., Kumagai H., Ogawa S., Kaufman R.J., Kominami E., Momoi T.: ER stress (PERK/eIF2 α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ.*, 2007; 14: 230–239
- [37] Krebichl G., Ruckerbauer S., Burbulla L.F., Kieper N., Maurer B., Waak J., Wolburg H., Gizatullina Z., Gellerich F.N., Woitalla D., Riess O., Kahle P.J., Proikas-Cezanne T., Krüger R.: Reduced basal autophagy and impaired mitochondrial dynamics due to loss of Parkinson's Disease-Associated Protein DJ-1. *PLoS One*, 2010; 5: e9367
- [38] Kuma A., Hatano M., Matsui M., Yamamoto A., Nakaya H., Yoshimori T., Ohsumi Y., Tokuhisa T., Mizushima N.: The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, 2004; 432: 1032–1036
- [39] Lakhani S.E., Kirchgessner A., Hofer M.: Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J. Transl. Med.*, 2009; 7: 97
- [40] Lamparska-Przybysz M., Motyl T.: Autofagia – narzędzie śmierci czy przeżycia komórki nowotworowej. *Postępy Biol. Kom.*, 2005; 32: 13–22
- [41] Levine B., Abrams J.: p53: the Janus of autophagy? *Nature Cell Biol.*, 2008; 10: 637–639
- [42] Li J., McCullough L.D.: Effects of AMP-activated protein kinase in cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.*, 2010; 30: 480–492
- [43] Lipton P.: Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.*, 1999; 79: 1431–1568
- [44] Liu C., Gao Y., Barrett J., Hu B.: Autophagy and protein aggregation after brain ischemia. *J. Neurochem.*, 2010; 115: 68–78
- [45] Liu L., Cash T.P., Jones R.G., Keith B., Thompson C.B., Simon M.C.: Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol. Cell*, 2006; 21: 521–531
- [46] Liu X.Q., Sheng R., Qin Z.H.: The neuroprotective mechanism of brain ischemic preconditioning. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2009; 30: 1071–1080
- [47] Maiuri M.C., Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G.: Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007; 8: 741–752
- [48] Malagelada C., Jin Z.H., Jackson-Lewis V., Przedborski S., Greene L.A.: Rapamycin protects against neuron death in *in vitro* and *in vivo* models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.*, 2010; 30: 1166–1175
- [49] Matsui Y., Takagi H., Qu X., Abdellatif M., Sakoda H., Asano T., Levine B., Sadoshima J.: Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ. Res.*, 2007; 100: 914–922
- [50] Meijer A.J., Dubbelhuis P.F.: Amino acid signalling and the integration of metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 313: 397–403
- [51] Meloni B.P., Meade A.J., Kitikomolsuk D., Knuckey N.W.: Characterisation of neuronal cell death in acute and delayed *in vitro* ischemia (oxygen-glucose deprivation) models. *J. Neurosci. Methods.*, 2011; 195: 67–74
- [52] Mizushima N.: Autophagy: process and function. *Genes Dev.*, 2007; 21: 2861–2873
- [53] Mizushima N.: The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death. Differ.*, 2005; 12(Suppl.2): 1535–1541
- [54] Mizushima N., Ohsumi Y., Yoshimori T.: Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.*, 2002; 27: 421–429
- [55] Obrenovitch T.P.: The ischemic penumbra: twenty years on. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, 1995; 7: 297–323
- [56] Pan T., Kondo S., Zhu W., Xie W., Jankovic J., Le W.: Neuroprotection of rapamycin in lactacystin-induced neurodegeneration via autophagy enhancement. *Neurobiol. Dis.*, 2008; 32: 16–25
- [57] Perycz M., Świech Ł., Malik A., Jaworski J.: mTOR w fizjologii i patologii układu nerwowego. *Postępy Biol. Kom.*, 2007; 34: 511–525
- [58] Rami A.: Review: autophagy in neurodegeneration: firefighter and/or incendiary? *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2009; 35: 449–461
- [59] Rami A., Kögel D.: Apoptosis meets autophagy-like cell death in the ischemic penumbra: Two sides of the same coin? *Autophagy*, 2008; 4: 422–426
- [60] Rami A., Langhagen A., Steiger S.: Focal cerebral ischemia induces upregulation of Beclin 1 and autophagy-like cell death. *Neurobiol. Dis.*, 2008; 29: 132–141
- [61] Reggiori F., Shintani T., Nair U., Klionsky D.J.: Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy*, 2005; 1: 101–109
- [62] Reggiori F., Tucker K.A., Stromhaug P.E., Klionsky D.J.: The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Dev. Cell.*, 2004; 6: 79–90
- [63] Rubinsztein D.C., DiFiglia M., Heintz N., Nixon R.A., Qin Z.H., Ravikumar B., Stefanis L., Tolkovsky A.: Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy*, 2005; 1: 11–22
- [64] Scherz-Shouval R., Shvets E., Fass E., Shorer H., Gil L., Elazar Z.: Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.*, 2007; 26: 1749–1760
- [65] Schieke S.M., Phillips D., McCoy J.P. Jr., Aponte A.M., Shen R.F., Balaban R.S., Finkel T.: The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 27643–27652
- [66] Semenza G.L.: Mitochondrial autophagy: life and breath of the cell. *Autophagy*, 2008; 4: 534–536



- [67] Sheng R., Zhang L.S., Han R., Liu X.Q., Gao B., Qin Z.H.: Autophagy activation is associated with neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemic preconditioning. *Autophagy*, 2010; 6: 482–494
- [68] Shintani T., Klionsky D.J.: Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 2004; 306: 990–995
- [69] Steiger-Barraissou S., Rami A.: Serum deprivation induced autophagy and predominantly an AIF-dependent apoptosis in hippocampal HT22 neurons. *Apoptosis*, 2009; 14: 1274–1288
- [70] Suzuki K., Kubota Y., Sekito T., Ohsumi Y.: Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells*, 2007; 12: 209–218
- [71] Taoufik E., Probert L.: Ischemic neuronal damage. *Curr. Pharm. Des.*, 2008; 14: 3565–3573
- [72] Tardy C., Codogno P., Autefage H., Levade T., Andrieu-Abadie N.: Lysosomes and lysosomal proteins in cancer cell death (new players of an old struggle). *Biochim. Biophys. Acta*, 2006; 1765: 101–125
- [73] Tasdemir E., Maiuri M.C., Galluzzi L., Vitale I., Djavaheri-Mergnt M., D'Amelio M., Criollo A., Morselli E., Zhu C., Harper F., Nannmark U., Samara C., Pinton P., Vicencio J.M., Carnuccio R., Moll U.M., Madeo F., Paterlini-Brechot P., Rizzuto R., Szabadkai G., Pierron G., Blomgren K., Tavernarakis N., Codogno P., Cecconi F., Kroemer G.: Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat. Cell. Biol.*, 2008; 10: 676–687
- [74] Thorburn A.: Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis*, 2008; 13: 1–9
- [75] Towler M.C., Hardie D.G.: AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ. Res.*, 2007; 100: 328–341
- [76] Uchiyama Y.: Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsins. *Arch. Histol. Cytol.*, 2001; 64: 233–246
- [77] Uchiyama Y., Shibata M., Koike M., Yoshimura K., Sasaki M.: Autophagy-physiology and pathophysiology. *Histochem. Cell Biol.*, 2008; 129: 407–420
- [78] Wang C.W., Klionsky D.J.: The molecular mechanism of autophagy. *Mol. Med.*, 2003; 9: 65–76
- [79] Wen Y.D., Sheng R., Zhang L.S., Han R., Zhang X., Zhang X.D., Han F., Fukunaga K., Qin Z.H.: Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. *Autophagy*, 2008; 4: 762–769
- [80] Werner C., Engelhard K.: Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br. J. Anaesth.*, 2007; 99: 4–9
- [81] Wullschlegel S., Loewith R., Hall M.N.: TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 2006; 124: 471–484
- [82] Xie Z., Klionsky D.J.: Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.*, 2007; 9: 1102–1109
- [83] Xue L., Fletcher G.C., Tolkovsky A.M.: Mitochondria are selectively eliminated from eukaryotic cells after blockade of caspases during apoptosis. *Curr. Biol.*, 2001; 11: 361–365
- [84] Yamashima T., Oikawa S.: The role of lysosomal rupture in neuronal death. *Prog. Neurobiol.*, 2009; 89: 343–358
- [85] Yang Z., Klionsky D.J.: An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2009; 335: 1–32
- [86] Ylä-Anttila P., Vihinen H., Jokitalo E., Eskelinen E.L.: 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy*, 2009; 5: 1180–1185
- [87] Yorimitsu T., Klionsky D.J.: Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.*, 2005; 12, Suppl. 2: 1542–1552
- [88] Young J.E., Martinez R.A., La Spada A.R.: Nutrient deprivation induces neuronal autophagy and implicates reduced insulin signaling in neuroprotective autophagy activation. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 2363–2373
- [89] Yue Z., Friedman L., Komatsu M., Tanaka K.: The cellular pathways of neuronal autophagy and their implication in neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009; 1793: 1496–1507
- [90] Zeng X., Overmeyer J.H., Maltese W.A.: Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *J. Cell Sci.*, 2006; 119: 259–270
- [91] Zhu C., Wang X., Xu F., Bahr B.A., Shibata M., Uchiyama Y., Hagberg H., Blomgren K.: The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ.*, 2005; 12: 162–176

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.