

Mechanizmy regulacji ekspresji białek w kardiomiocytach chorych z niewydolnością serca. System ubikwityna–proteasom. Autofagia

The regulatory mechanisms of protein expression in heart failure patients' cardiomyocytes. The ubiquitin–proteasome system. Autophagy

Agnieszka Pawlak¹, Jacek Bil¹, Robert J. Gil^{1, 2}

¹Klinika Kardiologii Inwazyjnej, Centralny Szpital Kliniczny Ministerstwa Spraw Wewnętrznych i Administracji, Warszawa

²Zespół Kliniczno-Badawczy Chirurgii Transplantacyjnej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej, Polska Akademia Nauk, Warszawa

WSTĘP

Ze względu na lawinowo narastającą liczbę chorych z niewydolnością serca (HF) poznanie patomechanizmów HF i możliwości skutecznej interwencji terapeutycznej staje się coraz istotniejsze. Obiecującym i obecnie intensywnie badanym zagadnieniem w patologii HF jest ocena ekspresji białek w kardiomiocycie.

Białka są nie tylko elementem strukturalnym komórki, ale również uczestniczą w regulacji prawie wszystkich funkcji komórki. Nie przypadkowo zatem słowo białko (proteina) pochodzące od greckiego słowa *proteo* znaczy najważniejszy. Prawidłowa funkcja kardiomiocyta jest wynikiem równowagi między procesami syntezy i degradacji białek.

Codziennie w zdrowym organizmie jest usuwanych 3–5% białek (prawidłowe, ale już niepotrzebne lub nieprawidłowe powstałe na skutek mutacji genetycznych, błędów w transkrypcji i translacji) [1]. Szacuje się, że serce jako najbardziej narażony na stres narząd człowieka usuwa zdecydowanie większą ich ilość. W zdrowym sercu ok. 30% białek jest usuwane w ciągu 10 min po zsynchronizowaniu, a w niewydolnym liczby te są jeszcze większe [2]. Wydaje się zatem, że systemy kontrolujące jakość białek są zasadniczymi komórkowymi procesami odpowiedzialnymi za prawidłową funkcję kardiomiocyta. Kontrola jakości białek w komórce jest utrzymywana przez system proteolityczny, tj. lizosomalny (autofagia) i proteosomalny [system ubikwityna–proteasom (UPS, *ubiquitin–proteasome system*)].

Obecnie wiadomo, że nieprawidłowa funkcja systemu proteolitycznego jest przyczyną rozwoju wielu chorób serca, chorób nowotworowych i neurodegeneracyjnych.

SYSTEM UBIKWITYNA–PROTEASOM

System ubikwityna–proteasom został odkryty i opisany przez Aarona Ciechanovera, Asrama Hershenko i Irwina Rose, któ-

rzy za swoje osiągnięcie otrzymali nagrodę Nobla w 2004 r. UPS jest największym nielizosomalnym systemem o bardzo skomplikowanej budowie i funkcji, niszczącym białka strukturalne, konstytutywne, regulujące przebieg cyklu komórkowego, kodujące onkogeny i regulujące odpowiedź immunologiczną, ale także enzymy regulujące szlaki biosyntetyczne, czynniki transkrypcyjne [3]. UPS tworzą 3 zasadnicze elementy: (1) ubikwityna (Ub), (2) liczne białka pełniące funkcję enzymów katalizujących reakcje, (3) proteasomy. Proteoliza białek w ramach UPS przebiega w dwóch etapach: ubikwitynacja białka i degradacja białka w proteasomie.

Ubikwitynacja białek

Ubikwityna to polipeptyd złożony z 76 aminokwasów o masie cząsteczkowej 8,5 kDa, a ubikwitynacja jest potranslacyjną, wymagającą nakładu energii ATP, modyfikacją białka polegającą na znakowaniu Ub białka przeznaczonego do degradacji. Przeprowadzana jest przez kaskadę reakcji enzymatycznych, które są katalizowane przez 4 grupy enzymów: E1 — enzymy aktywujące Ub, E2 — enzymy sprzęgające Ub z białkiem przeznaczonym do zniszczenia poprzez ligazę E3, E3 — ligaza rozpoznająca białko przeznaczone do zniszczenia, E4 — czynnik elongacji łańcucha Ub [4]. Proces ubikwitynacji jest regulowany przez enzymy deubikwitynujące (DUBs, *deubiquitinating enzymes*), mające zdolność hydrolizy łańcuchów Ub tworzonych przez kaskadę enzymatyczną E1-E2-E3, zarówno uwolnionych z substratów rozkładanych przez proteasomy, jak i związanych z niezdegradowanymi białkami. W tym drugim przypadku DUB mogą chronić substrat przed hydrolizą proteosomalną [5].

Ubikwityna pełni również funkcje niezwiązane ze szlakiem proteosomalnym. Odgrywa rolę w regulacji procesów

Adres do korespondencji:

dr n. med. Agnieszka Pawlak, Centralny Szpital Kliniczny Ministerstwa Spraw Wewnętrznych i Administracji, ul. Wotoska 137, 02–507 Warszawa, e-mail: a.pawlak1@wp.pl

Praca wpłynęła: 21.10.2011 r. Zaakceptowana do druku: 26.10.2011 r.

Copyright © Polskie Towarzystwo Kardiologiczne

transkrypcyjnych, kierowaniu białek z błony komórkowej do kompartmentu endosomalnego oraz do ciałek wielopięczerzykowych [5, 6].

Proteasomalna degradacja białka

Proteasomy to duże kompleksy białkowe zlokalizowane w jądrze lub cytoplazmie komórki jądrazstej wykazujące zdolność hydrolizy białek. W sercu występuje proteasom 26S (1500–2000 kDa), który powstał przez połączenie rdzeniowego kompleksu katalitycznego 20S i kompleksu regulatorowego 19S [7]. Kompleks regulatorowy 19S rozpoznaje białka znakowane Ub i otwiera kanał do cylindra proteasomu 20S, przez co umożliwia wprowadzenie białek do wnętrza kompleksu katalitycznego 20S. Białka wchodzące do cylindra proteasomu 20S ulegają hydrolizie na małe polipeptydy o długości 3–22 aminokwasów (ryc. 1) [8]. W niektórych sytuacjach proteasomy mogą degradować i rozszczepiać białka niezależnie od Ub [3].

Rola UPS

Podstawową funkcją UPS jest degradacja białek zarówno długo, jak i krótko żyjących w kardiomiocycie [9]. System ten degraduje 80–90% wewnątrzkomórkowych białek, co czyni go najistotniejszą drogą eliminacji białka w komórce oraz ważnym układem regulującym procesy komórkowe, w tym krytyczne dla funkcjonowania i przeżycia komórki.

UPS kontroluje cykl komórkowy i apoptozę komórki na drodze potranslacyjnej regulacji surwiwiny, białka regulującego cykl komórkowy w fazie G1 i hamującego apoptozę komórki. Nasiloną degradacją białka przez UPS powoduje blokadę cyklu komórkowego i śmierć komórki. Inne prace wykazały istotne znaczenie UPS i autofagii w regulacji białek uczestniczących w sygnalizacji komórkowej [10]. Przykładem takiego białka jest koneksyna, która tworzy połączenia komórkowe typu koneksonów (*gap junction*) i warunkuje komunikację elektryczną (jonową) w komórkach serca. Zmniejszenie ilości koneksyny i jej nieprawidłowa redystrybucja prowadzi do wystąpienia arytmii komorowych. UPS reguluje ekspresję genów bezpośrednio i/lub pośrednio poprzez wpływ na funkcję regulatorów transkrypcji, takich jak: c-Jun, c-Fos, p-53, Ying-Yang-1 czy IκB. Dzięki temu UPS modyfikuje procesy zapalne i remodeling komórki, w tym przerost kardiomiocyta [7, 11].

Bardzo interesującym zagadnieniem, ale obecnie jeszcze mało poznanym, jest regulacja białek sarkomeru. Obecnie wiadomo, że sarkomer to dynamiczna struktura, o czym świadczą czasy $T_{1/2}$ dla podstawowych białek go budujących: aktyny, tropomiozyny: 7–10 dni, miozyny: 5–8 dni i tropiny (T/C/I): 3–5 dni [12]. Udział UPS w metabolizmie tych białek postuluje się na podstawie białka łańcucha ciężkiego miozyny, w przypadku którego wykazano znaczące wydłużenie $T_{1/2}$ po zastosowaniu inhibitora proteasomu (laktacyteiny) [13].

UPS a choroby serca

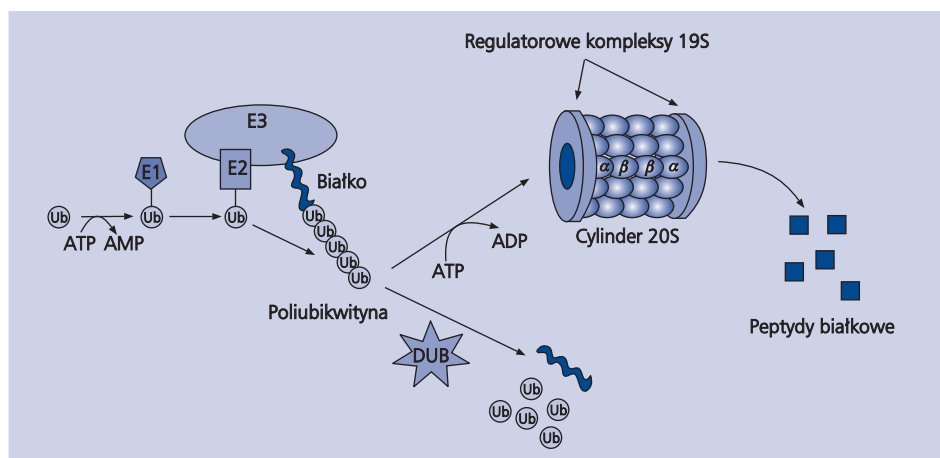
Niewydolność UPS może być wynikiem albo zwiększonego zapotrzebowania na UPS (zwiększona ilość ubikwitynowanych białek), albo wynikiem uszkodzenia UPS (np.: niedobory ener-

getyczne, stres oksydacyjny). Niewydolność UPS doprowadza do zachwiania równowagi białkowej, powodując wystąpienie zaburzeń w obrębie procesów opisanych powyżej (zaburzenia regulacji procesów zapalnych, regulacji ekspresji genów, regulacji cyklu komórkowego) lub gromadzenie się białek w komórce i tworzenie agregatów. Efektem deregulacji układu UPS jest rozwój wielu chorób kardiologicznych. Nieprawidłowości UPS wykazano w kardiomiopatii rozstrzeniowej (DCM, *dilated cardiomyopathy*), kardiomiopatii zależnej od desminy (DRC, *desmin related cardiomyopathy*), kardiomiopatii zależnej od doksorubicyny (DxCM, *doxorubicin related cardiomyopathy*), chorobie niedokrwiennej serca i w grupie chorób manifestujących lub wklajających się przerostem mięśnia sercowego: kardiomiopatii przerostowej i nadciśnieniu tętniczym. Jak wykazują wyniki badań eksperymentalnych i klinicznych wzrost ilości nieprawidłowych białek znakowanych Ub w komórce może być wspólnym ogniwem w patomechanizmie rozwoju HF o różnej etiologii (tab. 1).

Badania autorów niniejszej pracy prowadzone w populacji chorych z DCM wykazały zwiększoną ekspresję Ub w kardiomiocycie, ale jedynie u osób z zaawansowaną HF. Pacjenci ze skrajną HF (głównie IV klasa wg NYHA) prezentowali śladową lub brak ekspresji Ub w komórce. Zwiększona ekspresja Ub w kardiomiocycie przybierała dwie postaci: zwiększonej ekspresji Ub jedynie w cytoplazmie komórki lub zwiększonej ekspresji Ub w cytoplazmie i jądrze komórki [14]. Wdaje się, że zwiększenie ekspresji Ub jest mechanizmem chroniącym kardiomiocyt przed gromadzeniem się uszkodzonych białek i tworzeniem agregatów. Ekspresja Ub w jądrach komórkowych może wskazywać na niekorzystne przemodowanie procesów w kierunku apoptozy. Zmniejszona ekspresja Ub lub jej brak w schyłkowej HF może być efektem zarówno wyczerpania mechanizmów kompensacyjnych, jak i niedoboru energetycznego. Interesujący jest fakt, że w populacji badanych pacjentów różne postacie ekspresji Ub korelowały z różnymi typami ekspresji desminy (ryc. 2), Ub może więc być jednym z czynników modyfikujących ekspresję desminy, będącej bardzo dobrym markerem zaawansowania remodelingu kardiomiocyta w DCM [15, 16].

Znaczenie obecności agregatów dla funkcjonowania i przeżycia kardiomiocytów nie jest ostatecznie wyjaśnione. Z jednej strony, uważa się, że przewlekła obecność nierozpuszczalnych agregatów białkowych *per se* może przyczynić się do wystąpienia dysfunkcji proteasomów [17], z drugiej strony, twierdzi się, że duże złogi białkowe są nieaktywne i raczej nie mają niekorzystnego wpływu na komórkę. Postuluje się nawet, że mogą odgrywać rolę cytoprotekcyjną, zapobiegając interakcji nieprawidłowych białek z innymi składnikami komórki poprzez ich izolację w postaci agregatów [18]. Toksyczne znaczenie przypisuje się zaś nadmiernej ilości rozpuszczalnych oligomerów białkowych (substancji, z których postają złogi).

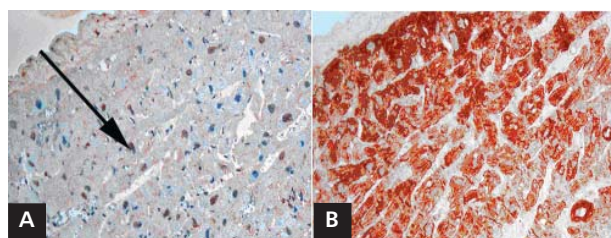
Wykazano, że zarówno w DCM, jak i w DRC obecność agregatów białkowych współlistnieje z zaburzoną funkcją UPS, wyrażoną wzrostem aktywności podjednostki 20S proteasomu (prawdopodobnie mechanizm kompensacyjny wywołany



Rycina 1. Proces ubikwytacji białka; Ub — ubikwityna; ATP — adenozyntrifosforan; AMP — adenozyntomofosforan; E1-Ub i E2-Ub — produkty pośrednie ubikwytacji; E3 — ligaza ubikwytynowa; DUB — enzymy deubikwytynujące; proteasom 26S zbudowany z podjednostek 19S, 20S

Tabela 1. Uszkodzenia systemu ubikwityna–proteasom w chorobach serca

Choroba	Zaburzenia systemu ubikwityna–proteasom
Kardiomiopatia rozrzeniowa	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ubikwytynowanych białek ↑ ilości agregatów ubikwytynowo pozytywnych ↑ aktywności chymotrypsynopodobnej peptydaz w proteasomie 20S ↑ ligazy E3 (Mdm2)
Kardiomiopatia przerostowa/ciśnieniowe przeciążenie lewej komory	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ubikwytynowanych białek ↑ ligazy E3 (atropin-1, MuRF)
Kardiomiopatia zależna od desminy	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ubikwytynowanych białek ↑ agregatów ubikwytynowo pozytywnych ↑ aktywności proteasomu 20S ↑ ligazy E3 (CSF-Fbox4) ↓ aktywności proteasomu 19S
Kardiomiopatia indukowana doksorybicyną	<ul style="list-style-type: none"> ↑ lub ↓ aktywności proteasomów zależnie od dawki doksorybicyny ↑ ligazy E3 (atropin-1, MuRF)
Choroba niedokrwienna serca	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ubikwytynowanych białek ↑ ilości agregatów ubikwytynowo pozytywnych ↓ aktywności proteasomów



Rycina 2. Ekspresja ubikwityny w cytoplazmie i jądrze komórkowym (strzałka; **A**) i ekspresja desminy w cytoplazmie w postaci agregatów wokół jądra (**B**) w kardiomiocytach pacjenta z kardiomiopatią rozrzeniową. Zdjęcia uzyskano dzięki uprzejmości prof. E. Czarnowskiej z IP CZD

zwiększoną ilością nieprawidłowo złożonych białek) i znacznym zmniejszeniem ekspresji podjednostki 19S [19]. Istotne uszkodzenie UPS w DRC na skutek mutacji $\alpha\beta$ -kryształiny było stwierdzone przed wystąpieniem przerostu serca i jego niewydolności [19]. Ta obserwacja sugeruje, że nieprawidłowy obrót białka może przyczynić się do remodelingu kardiomiocytu i stanowić dodatkowy patomechanizm w DRM. Z kolei zwiększona aktywność UPS w DxCM może być wynikiem albo bezpośredniego toksycznego działania doksorybicyny na UPS, albo pośredniego, poprzez stymulację wydzielania wolnych rodników tlenowych, oksydujących białka komórki. Zwiększona aktywność UPS nasila degradację istotnych czynników transkrypcyjnych i zapalnych (I κ B), co ostatecznie może powodo-

wać niekorzystny remodeling kardiomiocyta. Interesujące jest, że zwiększoną aktywność UPS obserwowano przy małych dawkach dokсорubicyny, duże dawki blokowały UPS, zaburzając obrót białek krótko żyjących, kontrolujących takie procesy, jak cykl komórkowy czy apoptozę.

Postuluje się, że podwyższona aktywność UPS w wyniku mutacji sercowej miozyny, łączącej białko C (cMYBP-C), jest przyczyną wystąpienia rodzinnej kardiomiopatii przerostowej. Doświadczenie z blokadą UPS przez MG 132 lub laktacysteinę znacząco zwiększały stężenie zmutowanego białka, co sugerowało, że zmutowana cMYBP-C jest najprawdopodobniej szybko degradowana przez proteasomy [20]. Dla odmiany, w chorobie niedokrwiennej serca stwierdza się zmniejszoną aktywność proteasomów. Zwiększona produkcja wolnych rodników tlenowych, będąca stałym elementem niedokrwionego mięśnia, zwiększa oksydację białek, w tym białek budujących proteasomy i powoduje ich niewydolność. Zarówno zwiększenie ilości oksydowanych białek, jak i niewydolność UPS sprzyjają gromadzeniu białek w komórce [21].

W DCM, RCM i DxCM, oprócz zwiększonej aktywności proteasomu 20S, stwierdzono również istotne nieprawidłowości w obrębie ligaz E3. Ligazy zawierają różne białka pełniące rolę białek opiekuńczych albo elementów, poprzez które ligazy łączą się z białkami kwalifikowanym do degradacji. Wykazano, że nadekspresja Mdm2 zwiększa odporność komórki na niedotlenienie, zaś inaktywacja białka wywołuje apoptozę komórki [22]. Nadekspresja MuRF3 sprzyja przerostowi kardiomiocytów, a zmniejszona aktywność nasila uszkodzenie miokardium w trakcie niedokrwienia. Inne białko — FBX4 może wykazywać zwiększone powinowactwo do białek zmutowanych, jak to ma miejsce w przypadku abkrystaliny^{R120G}, co przyczynia się do zwiększonego gromadzenia ubikwitynowanych produktów [23].

Możliwości terapeutyczne

Czas i stopień (pełna lub częściowa) blokady UPS może powodować wystąpienie odmiennych rezultatów. Krótkotrwałe blokowanie proteasomów w niedokrwionym mięśniu serca redukowało rozmiar zawału, w niektórych badaniach nawet o 50% i poprawiało funkcję lewej komory (LV) [24]. Far-

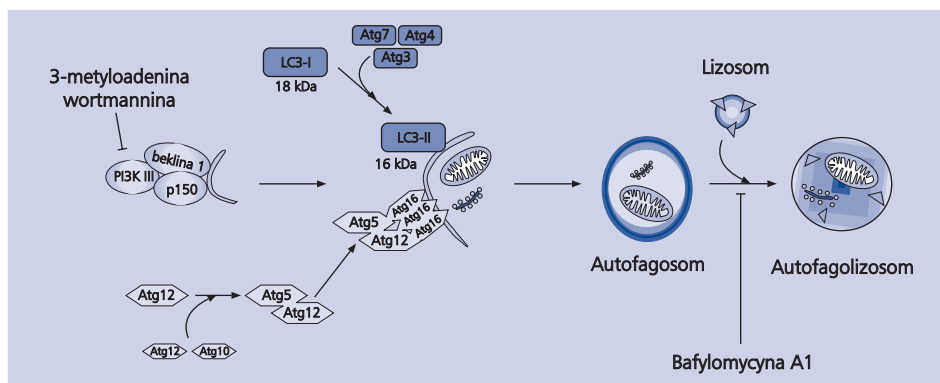
makologiczna blokada UPS wydaje się przyczyniać do kardioprotekcji na skutek przeciw zapalnego działania proteasomów poprzez czynnik IκB. Ponadto indukuje białka pomocnicze, takie jak αβ-kryształinę czy HSP70. Białka szoku cieplnego chronią kardiomiocyt przed hipoksją i mają bezpośrednie antyapoptotyczne działanie.

Interesujące, że prawie wszystkie badania przeprowadzone na modelu z ciśnieniowym przeciążeniem LV, w których blokowano proteasom 20S, wykazywały nie tylko zahamowanie rozwoju przerostu mięśnia sercowego, ale również odwracalność [25].

Kliniczne badania z użyciem inhibitora proteasomu bortezomidu u pacjentów z chorobą nowotworową wykazały możliwość wystąpienia powikłań, takich jak HF, migotanie przedsionków czy bradykardia. Warto jednak zwrócić uwagę, że większość z tych niepożądanych objawów wystąpiła u ludzi starszych, o których sam wiek jest czynnikiem niekorzystnie modyfikującym funkcję proteasomów.

AUTOFAGIA

Pewnego rodzaju alternatywę dla układu UPS stanowi autofagia. Jest to filogenetycznie stary proces, który istotnie wpływa na przeżycie komórek. Białka, które podlegają autofagii, nie są degradowane w proteasomach, ale w lizosomach. Wyróżnia się: makroautofagię, mikroautofagię i autofagię związaną z chaperonami. Makroautofagia jest główną postacią autofagii zachodzącą w komórce. Substraty są otaczane najpierw pojedynczą, a następnie podwójną błoną lipidową. Dochodzi do powstania autofagosomu mającego średnicę ok. 1 μm, który następnie ulega fuzji z lizosomem. Prowadzi to do utworzenia się autofagolizosomu, w którym za pomocą enzymów lizosomalnych dochodzi do ostatecznej degradacji protein (ryc. 3). Mikroautofagia polega na bezpośrednim otoczeniu przez błonę lizosomu substratów, które wnikają do jego środka na zasadzie endocytozy. Natomiast autofagia związana z chaperonami charakteryzuje się pewną selektywnością, ponieważ niezbędne jest, aby cytoplazmatyczne białko opiekuńcze rozpoznało właściwą sekwencję aminokwasową. Wtedy taki kompleks chaperon–substrat jest rozpoznawany przez receptor w błonie lizosomu — LAMP-2A (*lysosome-associated mem-*



Rycina 3. Molekularne mechanizmy makroautofagii

brane protein type-2A), a następnie przenoszony do jego wnętrza przy udziale białka Hsc70 (*heat-shock cognate protein*) [26].

Molekularne mechanizmy autofagii

W pierwszym etapie tworzenia pęcherzyków autofagalnych uczestniczy kinaza fosfatydylo-3-inozytolu klasy III (PI3K-III). Wyróżnia się 3 klasy tej kinazy: klasa I i II są związane głównie z przekazywaniem sygnału, natomiast klasa III pełni istotną rolę w transporcie wewnątrzkomórkowym elementów cytoskieletu i tym samym w sekwestracji substratów dla pęcherzyków autofagalnych. W komórkach człowieka PI3K-III jest związana funkcjonalnie z dwoma białkami: bekliną 1 i kinazą serynową p150. Lokalizują się one w pobliżu siateczki śródplazmatycznej i części *trans* aparatu Golgiego [27].

Natomiast za dojrzewanie pęcherzyków autofagalnych i tworzenie autofagosomów są odpowiedzialne 2 układy białek Atg (*autophagy-related genes*). Do pierwszego zalicza się 4 białka: Atg5, Atg7, Atg10 i Atg12. Białka Atg7 i Atg10 pełnią podobną rolę jak enzymy E1 i E2 w procesie ubikwitynacji. W rezultacie powstaje kompleks Atg5-Atg12 połączony wiązaniem kowalencyjnym. Następnie dochodzi do utworzenia kompleksu Atg5-Atg12-Atg16, w którym białko Atg16 ulega homooligomeryzacji i tworzą się struktury o masie nawet 800 kDa, związane z błoną autofagosomu [28].

W skład drugiego układu wchodzi białka: Atg3, Atg4, Atg7 i Atg8. U człowieka białko Atg8 występuje w 2 postaciach: LC3-I, rozpuszczalnej w cytoplazmie o masie 18 kDa i LC3-II, związanej z błoną o masie 16 kDa. Na początku białko proLC3 jest rozszczepiane przez proteazę Atg4 przy C-końcu. Wskutek odcięcia 22-aminokwasowego fragmentu powstaje białko LC3-I. Następnie pod wpływem białek Atg7 i Atg3, które odpowiednio mają aktywność podobną do enzymów E1 i E2, powstaje białko LC3-II, do którego jest przyłączana wiązaniem amidowym fosfatydyloetanolamina i które jest zakotwiczone w błonie tworzącego się autofagosomu. Ilość białka LC3-II w komórce jest wprost proporcjonalna do liczby autofagosomów, a proces przekształcania LC3-I w LC3-II ulega nasileniu po indukcji autofagii, dlatego też białko to jest aktualnie jedynym wiarygodnym markerem tego procesu [29]. Następnie dojrzały autofagosom, jak wcześniej wspomniano, łączy się z lizosomem, tworząc autofagolizosom.

Rola autofagii

Głównym zadaniem autofagii jest lizosomalna degradacja elementów cytoplazmy (peroksyzomy, mitochondria, siateczka śródplazmatyczna, aparat Golgiego) i białek o długim okresie półtrwania [30]. Autofagia jest jednym z mechanizmów adaptacyjnych podczas głodzenia. Degradacja białek zapewnia podaż aminokwasów i innych składników warunkujących utrzymanie homeostazy. Zaburzenia degradacji uszkodzonych struktur i niewydolność samej autofagii leżą u podstaw procesu starzenia się oraz wielu chorób, m.in. miopatii czy chorób neurodegeneracyjnych (choroba Alzheimera, choroba Parkinsona czy też choroba Huntingtona). Warto zaznaczyć, że autofagia jest zaangażowana także w walkę z we-

wnątrzkomórkowymi patogenami, jak np. *Mycobacterium tuberculosis*, wirusy czy też pasożyty (ksenofagia) [31].

Proces autofagii jest również odpowiedzialny za śmierć komórki. Wydaje się, że rozmiar tego procesu decyduje o życiodajnym lub śmiertelnym charakterze. Przez lata programowaną śmierć komórki utożsamiano z apoptozą. Obecnie wyróżnia się jej 3 typy: typ I — apoptoza, typ II — autofagia i typ III — niezależny od kaspaz i lizosomów [32].

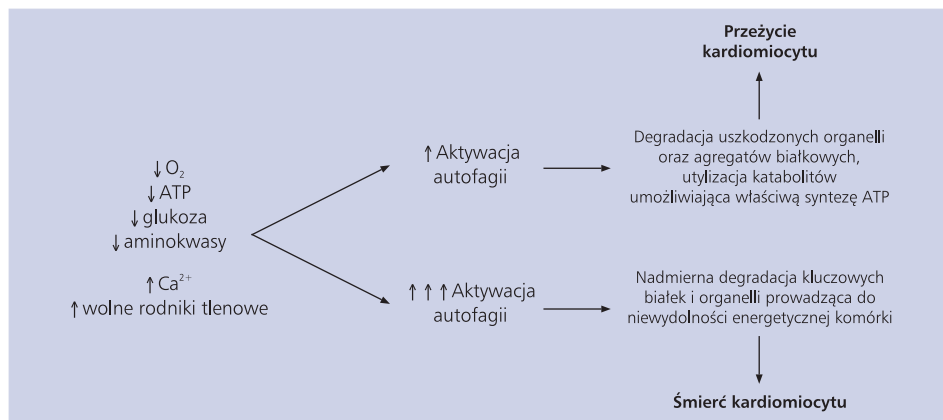
Autofagię aktywuje w komórce wiele leków stosowanych obecnie w praktyce klinicznej, w większości wykorzystywanych w terapii chorób nowotworowych [33]. Także nagromadzenie białek wskutek zahamowania ich degradacji może nie tylko spowodować stres siateczki, ale uczynić alternatywną drogę ich degradacji, a więc wywołać autofagię [34].

Autofagia a choroby serca

W miarę coraz lepszego poznania tego procesu okazało się, że odgrywa on również istotną rolę w kardiomiocytach, szczególnie w przypadkach HF i proteinopatii [35], oraz w niedokrwieniu i reperfuzji mięśnia sercowego, podczas których z powodu stresu oksydacyjnego wiele białek zostaje uszkodzonych przez wolne rodniki (ryc. 4) [36].

Szeroko rozumiane kardiomiopatie cechują się nagromadzeniem w komórce nieprawidłowych białek. W początkowej fazie obserwuje się spadek aktywności autofagii, natomiast gdy zaczynają pojawiać się objawy kliniczne HF dochodzi do indukcji szlaków autofagalnej degradacji [37, 38]. U osób z kardiomiopatią przerostową czy rozstrzeniową obserwuje się intensywną aktywność procesu autofagii [39]. W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach transgenicznych wykazano, że niedobór składników autofagii może prowadzić sam w sobie do zgubnych skutków, np. wyciszenie genu dla katepsyny lub białka LAMP-2 prowadzi do rozwoju DCM [40], a delecja genu Atg5 skutkuje początkowo rozwojem przerostu kardiomiocytów, a następnie doprowadza do rozstrzeni LV i HF [38]. Zaobserwowano także chimeryczną rolę jednego z kluczowych elementów procesu autofagii — bekliny 1. Gdy dochodzi do nadekspresji bekliny 1 w komórkach kardiomiopatycznego serca na tle przeciążenia ciśnieniowego, obserwuje się dramatyczną progresję w kierunku objawowej HF, natomiast w modelu, w którym ekspresja bekliny 1 jest ograniczona do 50% normy, rozwój objawowej HF jest bardzo powolny [41]. Warto dodać, że u ludzi mutacja w genie dla białka LAMP-2 prowadzi do miopatii znanej jako choroba Danona [42].

Z kolei w badaniach nad patofizjologią niedokrwionego mięśnia sercowego wykazano, że podczas zaburzeń perfuzji dochodzi do nasilenia aktywacji procesu autofagii, co przyczynia się do zwiększenia przeżycia kardiomiocytów zarówno w przypadkach ostrego, jak i przewlekłego niedokrwienia, czyli tzw. hartowania mięśnia sercowego [36, 43]. Zahamowanie procesu autofagii w warunkach naśladujących niedokrwienie (tj. niedobór glukozy lub tlenu) prowadzi do zmniejszenia przeżywalności kardiomiocytów. Niestety także nadmierna aktywacja autofagii może skutkować śmiercią kardiomiocytów [36].



Rycina 4. Rozmiar zjawiska autofagii a jego skutek

Autofagia jako cel terapeutyczny

Na podstawie powyższych obserwacji stwierdzono, że wpływając na regulację degradacji autofagalnej, np. na poziomie molekularnym za pomocą siRNA, można wpływać na przeżywalność komórek. Najbardziej zaawansowane prace są prowadzone nad wykorzystaniem zjawiska autofagii w terapii chorób nowotworowych, natomiast problem autofagii w chorobach układu sercowo-naczyniowego jest stosunkowo nowym tematem.

Jednak coraz częściej są opisywane osiągnięcia w terapii chorób serca, a wśród nich m.in. odnotowano korzystny wpływ powszechnie stosowanych leków, takich jak: beta-adrenolityki (poprzez ich wpływ na proces autofagii w fibroblastach mięśnia sercowego i ograniczenie nadmiernego włóknienia po przebytych zapaleniu lub zawale serca [44]) czy też metformina, która opóźniała rozwój HF poprzez zahamowanie jednego z kluczowych szlaków autofagii — zależnego od kinazy AMP [45].

Wykazano także, że zastosowanie N-acetylocysteiny zmniejsza rozmiar autofagii aktywowanej przez wolne rodniki [46]. W modelu szczurzym zaobserwowano, że sulfafenazol — lek o działaniu przeciwbakteryjnym, zmniejsza rozmiar zawału, ogranicza ilość uwolnionej kinazy kreatynowej, a także zapobiega obniżeniu frakcji wyrzutowej LV właśnie poprzez aktywację procesu autofagii [47]. Podobne wyniki uzyskano u świń przy zastosowaniu chloramfenikolu [48].

Inną, bardzo obiecującą grupą leków są inhibitory deacetylazy histonów, z powodzeniem stosowane w terapii nowotworów. Hamują one patologiczną autofagię i zapobiegają tym samym nadmiernej hipertrofii mięśnia. Aktualnie trwają badania na zwierzętach dotyczące ich roli w niedokrwionym sercu [41].

Na zakończenie warto wspomnieć o ewerolimusie — inhibitorze kinazy mTOR, który jest stosowany jako lek immunosupresyjny w transplantologii i w kardiologii interwencyjnej do produkcji stentów uwalniających lek. Martinet i wsp. [49] wykazali, że stenty uwalniające ewerolimus cechowały się skutecznością przy angioplastyce tzw. „ranliwych” zmian miażdżycowych. Działo się tak poprzez usuwanie z nich

makrofagów w mechanizmie autofagii. W innym badaniu, w modelu szczurzym, zaobserwowano, że stosowanie ewerolimusu tuż po zawale wiązało się z poprawą parametrów kurczliwości LV i zapobiegało rozwojowi HF poprzez aktywację procesu autofagii, a zahamowanie UPS [50].

PODSUMOWANIE

Aktualna wiedza pozwala jedynie na stwierdzenie nieprawidłowości w UPS czy procesie autofagii u pacjentów z chorobami serca. Wstępne wyniki regulacji aktywności UPS i autofagii są obiecujące i tworzą kolejną szansę poprawy stanu klinicznego czy rokowania dla chorych z HF. Wiedza ta wymaga jednak jeszcze wielu badań i dokładnego zrozumienia patofizjologicznego znaczenia dysfunkcji UPS i autofagii w chorobach serca.

Badania nad znaczeniem desminy i ubikwityny w patologiach serca są realizowane w projekcie nr 1961/B/P01/2008/35 finansowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Piśmiennictwo

1. Ciechanover A. The ubiquitin proteolytic system: from an idea to the patient bed. *Proc Am Thorac Soc*, 2006; 3: 21–31.
2. Schubert U, Antón LC, Gibbs J et al. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, 2000; 404: 770–774.
3. Powell SR. The ubiquitin — proteasome system in cardiac physiology and pathology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006; 291: H1–H19.
4. Ciechanover A. The ubiquitin proteolytic system: from a vague idea, through basic mechanisms and onto human diseases and drug targeting. *Neurology*, 2006; 66: S7–S19.
5. Bury M., Niemięko A. Proteasomalna degradacja białek komórkowych. *Postępy Biol Kom*, 2005; 32: 435–448.
6. Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*, 2007; 315: 201–205.
7. Herrmann J, Ciechanover A, Lerman LO, Lerman A. The ubiquitin-proteasome system in cardiovascular diseases—a hypothesis extended. *Cardiovasc Res*, 2004; 61: 11–21.
8. Jurczyszyn A, Skotnicki AB. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in neoplastic disease. *Adv Clin Exp Med*, 2006; 15: 309–320.

9. Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 2003; 426: 895–899.
10. Beardslee MA, Laing JG, Beyer EC, Saffitz JE. Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ Res*, 1998; 83: 629–635.
11. Purcell NH, Tang G, Yu C et al. Activation of NF-kappa B is required for hypertrophic growth of primary rat neonatal ventricular cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98: 6668–6673.
12. Willis MS, Schisler JC, Portbury AL, Patterson C. Build it up-Tear it down: protein quality control in the cardiac sarcomere. *Cardiovasc Res*, 2009; 81: 439–448.
13. Eble DM, Spragia ML, Ferguson AG, Samarel AM. Sarcomeric myosin heavy chain is degraded by the proteasome. *Cell Tissue Res*, 1999; 296: 541–548.
14. Pawlak A, Czarnowska E, Pronicki M et al. Expression of ubiquitin in patient with heart failure depending on desmin expression. *Eur J Heart Fail*, 2010; 9: S1.
15. Pawlak A, Gil RJ, Kasprzak J et al. Cardiomyocyte desmin abnormalities - an accurate predictor of long-term survival in patients with chronic heart failure. *Kardiol Pol*, 2009; 67: 724–733.
16. Pawlak A, Gil RJ, Walczak E, Seweryniak P. Desmin expression in human cardiomyocytes and selected clinical and echocardiographic parameters in patients with chronic heart failure. *Kardiol Pol*, 2009; 67: 955–961.
17. Liu J, Tang M, Mestrlil R, Wang X. Aberrant protein aggregation is essential for a mutant desmin to impair the proteolytic function of the ubiquitin-proteasome system in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 2006; 40: 451–454.
18. Su H, Wang X. The ubiquitin-proteasome system in cardiac proteinopathy: a quality control perspective. *Cardiovasc Res*, 2010; 85: 253–262.
19. Chen Q, Liu JB, Horak KM et al. Intrasarcomeric amyloidosis impairs proteolytic function of proteasomes in cardiomyocytes by compromising substrate uptake. *Circ Res*, 2005; 97: 1018–1026.
20. Sarikas A, Carrier L, Schenke C et al. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by truncated cardiac myosin binding protein C mutants. *Cardiovasc Res*, 2005; 66: 33–44.
21. Ishii T, Sakurai T, Usami H, Uchida K. Oxidative modification of proteasome: identification of an oxidation-sensitive subunit in 26 S proteasome. *Biochemistry*, 2005; 44: 13893–13901.
22. Toth A, Nickson P, Qin LL, Erhardt P. Differential regulation of cardiomyocyte survival and hypertrophy by MDM2, an E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, 2006; 281: 3679–3689.
23. den Engelsman J, Keijsers V, de Jong WW, Boelens WC. The small heat-shock protein alpha B-crystallin promotes FBX4-dependent ubiquitination. *J Biol Chem*, 2003; 278: 4699–4704.
24. Pye J, Ardeshirpour F, McCain A et al. Proteasome inhibition ablates activation of NF-kappa B in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003; 284: H919–H926.
25. Hedhli N, Lizano P, Hong C et al. Proteasome inhibition decreases cardiac remodeling after initiation of pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008; 295: H1385–H1393.
26. Tsujimoto Y, Shimizu S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ*, 2005; 12 (suppl. 2): 1528–1534.
27. Eisenberg-Lerner A, Kimchi A. The paradox of autophagy and its implication in cancer etiology and therapy. *Apoptosis*, 2009; 14: 376–391.
28. Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci*, 2003; 116 (Part 9): 1679–1688.
29. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 2008; 4: 151–175.
30. Mizushima N, Klionsky DJ. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr*, 2007; 27: 19–40.
31. Cuervo AM. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol*, 2004; 14: 70–77.
32. Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol*, 1990; 181: 195–213.
33. Ertmer A, Huber V, Gilch S et al. The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. *Leukemia*, 2007; 21: 936–942.
34. Bil J, Winiarska M, Nowis D et al. Bortezomib modulates surface CD20 in B-cell malignancies and affects rituximab-mediated complement-dependent cytotoxicity. *Blood*, 2010; 115: 3745–3755.
35. Nishida K, Kyoi S, Yamaguchi O et al. The role of autophagy in the heart. *Cell Death Differ*, 2009; 16: 31–38.
36. Matsui Y, Takagi H, Qu X et al. 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.
37. Tannous P, Zhu H, Nemchenko A et al. Intracellular protein aggregation is a proximal trigger of cardiomyocyte autophagy. *Circulation*, 2008; 117: 3070–3078.
38. Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T H et al. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med*, 2007; 13: 619–624.
39. Kassiotis C, Ballal K, Wellnitz K et al. Markers of autophagy are downregulated in failing human heart after mechanical unloading. *Circulation*, 2009; 120 (11 suppl.): S191–S197.
40. Tanaka Y, Guhde G, Suter A et al. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*, 2000; 406: 902–906.
41. Nemchenko A, Chiong M, Turer A et al. Autophagy as a therapeutic target in cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol*, 2011; 51: 584–593.
42. Maron BJ, Roberts WC, Arad M et al. Clinical outcome and phenotypic expression in LAMP2 cardiomyopathy. *JAMA*, 2009; 301: 1253–1259.
43. Yan L, Vatner DE, Kim SJ et al. Autophagy in chronically ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005; 102: 13807–13812.
44. Aranguiz-Urroz P, Canales J, Copaja M et al. Beta(2)-adrenergic receptor regulates cardiac fibroblast autophagy and collagen degradation. *Biochim Biophys Acta*, 2011; 1812: 23–31.
45. Sasaki H, Asanuma H, Fujita M et al. Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase. *Circulation*, 2009; 119: 2568–2577.
46. Gimenez-Xavier P, Francisco R, Santidrian AF et al. Effects of dopamine on LC3-II activation as a marker of autophagy in a neuroblastoma cell model. *Neurotoxicology*, 2009; 30: 658–665.
47. Huang C, Liu W, Perry CN et al. Autophagy and protein kinase C are required for cardioprotection by sulfaphenazole. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010; 298: H570–H579.
48. Sala-Mercado JA, Wider J, Undyala VV et al. Profound cardioprotection with chloramphenicol succinate in the swine model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation*, 2010; 122 (11 suppl.): S179–S184.
49. Martinet W, Verheye S, De Meyer GR. Everolimus-induced mTOR inhibition selectively depletes macrophages in atherosclerotic plaques by autophagy. *Autophagy*, 2007; 3: 241–244.
50. Buss SJ, Muenz S, Riffel JH et al. Beneficial effects of mammalian target of rapamycin inhibition on left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2009; 54: 2435–2446.