

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie (BBI)



Petr Kordač

Úloha hypoxií indukovaného faktoru-1 α v rozvoji chronického srdečního selhání
The role of hypoxia inducible factor-1 α in the progression of chronic heart failure

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Jan Neckář, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení

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

V Praze 10. 5. 2019

.....
Petr Kordač

Poděkování

Chtěl bych velice poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Neckářovi, Ph.D. za všechny jeho rady, připomínky a celkově za všechnu pomoc, kterou mi ochotně při této práci poskytl.

Abstrakt

Transkripční faktor hypoxií indukovaný faktor 1 α (HIF-1 α) je klíčový regulátor fyziologických a buněčných adaptačních procesů při nedostatku kyslíku. Za hypoxie (nebo ischemie) se hladina HIF-1 α zvyšuje v důsledku inaktivace HIF-1 α degradujících enzymů prolyl hydroxyláz. HIF-1 α také hraje významnou roli při spouštění protektivních buněčných a metabolických dějů v srdci za různých patofyziologických podmínek. Zdá se, že stabilizace HIF-1 α se může uplatňovat při omezení škodlivých remodelačních procesů spojených s rozvojem chronického srdečního selhání (CHF). Cílem bakalářské práce bude shrnout poznatky o úloze HIF-1 α při rozvoji CHF.

Klíčová slova:

Srdce, chronické srdeční selhání, hypoxií indukovaný faktor-1 α , prolyl hydroxylázy

Abstract

Transcription factor hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) is a key regulator of physiological and cellular mechanisms to adapt to deficiency of oxygen. In hypoxia (or ischemia) HIF-1 α level increases as HIF-1 α -degrading enzymes prolyl hydroxylases are inactive due to low oxygen level. HIF-1 α plays also essential role in triggering cellular protection and metabolic alteration during pathophysiological conditions in the heart. It has been suggested that stabilization of HIF-1 α in myocardium may prevent deleterious remodelling induced by various forms of chronic heart failure (CHF). The project aims to outline current knowledge about the role of HIF-1 α in the progression of CHF.

Key words:

Heart, chronic heart failure, hypoxia inducible factor-1 α , prolyl hydroxylase

Obsah

1. Úvod	8
2. Srdeční selhání a ICHS.....	9
2.1. Srdeční selhání.....	10
2.1.1. Příčiny CHSS způsobené systolickou dysfunkcí	10
3. Druhy hypoxie	12
4. Hypoxií indukovaný faktor (HIF)	13
4.1 Struktura.....	14
4.2 Izoformy	15
4.3 Regulace HIF	16
4.3.1 Regulace HIF proteinu	16
4.3.1.1. Prolyl hydroxylázy (PHDs)	18
4.3.1.2. Ubiquitinace	18
4.3.2 Regulace transkripce HIF	19
4.3.3 Na kyslíku nezávislá regulace HIF	19
4.4 Cílové geny HIF-1 α	21
4.4.1. Změny na buněčné úrovni.....	22
4.4.1.1. Reaktivní formy kyslíku (ROS).....	22
4.4.1.2. Metabolismus glukózy.....	24
4.4.2. Změny na orgánové úrovni.....	25
4.4.2.1. Neovaskularizace	25
4.4.2.2. Erytropoéza	27
5. HIF-1 α a srdeční selhání	27
6. Závěr	30
7. Seznam literatury.....	31
7.1 Internetové zdroje:	31
7.2 Knižní zdroje:	31
7.3 Odborné články:	32

Seznam použitých zkratek

2OG	2-oxoglutaric acid (α -ketoglutaric acid)
4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
AcCoA	Acetyl coenzyme A
AHR	Aryl hydrocarbon receptor
AKT	protein kinase B (PKB)
ANGPT	angiopoetin
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ARNTL	ARNT-like protein
bHLH	Basic helix-loop-helix
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3
CBP	CREB binding protein
COX4-1	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1
E-box	Enhancer box
EGLN	Egl nine
eIF-4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
EPO	Erythropoetin
ETC	Elektronový transportní řetězec (z ang. Electron transport chain)
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FIH	Faktor inhibující HIF (z ang. Factor inhibiting HIF)
FRAP	FKBP12-rampamycin associated protein
GLUT	Glucose transporter
GPX	Glutathione peroxidase
HIF	Hypoxií indukovaný faktor (z ang. Hypoxia inducible factor)
HRE	Hypoxia responsive element
CHSS	Chronické srdeční selhání (v ang. Chronic heart failure)
ID	Inhibitory domain
ICHS	Ischemická choroba srdeční (v ang. IHD – ischemic heart disease)
IPAS	Inhibitory Pas protein
LDHA	Lactate dehydrogenase A
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
LON	Mitochondriální proteáza (z ang. Mitochondrial protease)

MOP	Member of the PAS superfamily
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mtROS	Mitochondriální ROS (z ang. Mitochondrial ROS)
NLS	Nuclear localization sequence
ODDD	Oxygen dependent degranation domain
PAS	PER-ARNT-SIM
PDC	Pyruvate dehydrogenase kinase
PDH	Pyruvát dehydrogenáza (z ang. Pyruvate dehydrogenase)
PER	Period circadian protein
PGF	Placental growth factor
PHDs	Prolyl hydroxylázy (z ang. Prolyl hydroxylase)
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PPAR- γ	Peroxisome proliferator-activated receptor
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
pVHL	Von Hippel-Lindau tumor suppressor
RACK1	Receptor of activated protein kinase C
ROS	Reaktivní formy kyslíku (z ang. Reactive oxygen species)
RTK	Receptor tyrosine kinase
SDF-1	Stroml derived factor-1
SIM	Single-minted protein
SOD	Superoxiddismutasa
TAC	Transortální konstriktce (z ang. Transortic constriction)
TAD	Transactivation domain
TCA	Tricarbolix acid cycle
TGF- β	Transforming growth factor β
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WT	Wild type

1. Úvod

Kardiovaskulární choroby jsou nejčastější příčinou mortality a morbidit ve vyspělých zemích světa. V Evropské unii bylo za rok 2015 zaznamenáno 127 úmrtí na 100 000 obyvatel a celosvětově si tato onemocnění vyžádala na téměř 18 milionů zemřelých ročně. Z těchto úmrtí bylo 85 % zapříčiněno infarktem myokardu ve spojitosti s následným rozvojem srdečním selháním. Uvádí se, že za srdeční selhání v současné době může především ischemická choroba srdeční následována idiopatickou dilatační kardiomyopatií. Riziko srdečního selhání se zvyšuje u nemocných s *diabetes mellitus* a u jedinců s vysokým krevním tlakem. Srdeční selhání se vyskytuje především u starších lidí, kdy s věkem výrazně stoupá i jeho prevalence včetně přidružených komorbidit. Nemoc se nicméně stále častěji projevuje i u mladých lidí, a to v souvislosti se špatnou životosprávou spojenou s nadměrnou obezitou, nedostatkem fyzické aktivity a požíváním alkoholických a tabákových výrobků (1; 2; Widimský, 2013).

Ať je již příčina infarktu jakákoliv, buňky myokardu musí na rozvoj srdečního selhání adekvátně reagovat a přizpůsobit se aktuálnímu stavu. Vzhledem k tomu, že toto onemocnění je velmi často provázeno srdeční hypoxií (snížením dostupnosti kyslíku), dochází k aktivaci transkripčního faktoru hypoxií indukovaného factoru (HIF), který může zprostředkovat mnoho dalších dějů směřujících k co nejprospěšnější adaptační odpovědi.

V této práci jsem se pokusil shrnout poznatky o úloze a regulaci HIF-1 α v organismu s ohledem na některá kardiovaskulární onemocnění. Zvláštní pozornost byla věnována úloze HIF-1 α při rozvoji chronického srdečního selhání, neboť tomuto tématu bych se rád věnoval v rámci svého magisterského studia.

2. Srdeční selhání a ICHS

Udržovat stálý krevní oběh a zásobit tak všechny orgány živinami a kyslíkem má na starosti srdce. Zajistit jeho funkci je energeticky velice náročné. Přestože srdce tvoří přibližně jen 0,5 % hmotnosti našeho těla, tak z celkové spotřeby kyslíku spotřebuje téměř 12 %. Jen v klidu je jeho spotřeba 9,7 ml/100 g/min (Barrett at al. 2016), což se může během zátěže či náhlým stresem zvýšit až na pětinasobek původní spotřeby (3).

Přísun živin a okysličené krve do myokardu zprostředkovávají koronární/věňčité tepny (*aa. coronariae*), které se oddělují od aorty ihned u srdce (*ze sinus aortae*) a dělí se na dvě větve – *arteria coronia dextra* a *arteria coronia sinistra* (Borovský et al., 1967). Jestliže má srdce na zásobování krví, respektive kyslíkem, zvýšené nároky, dochází k vasodilataci cév a zvýšení srdeční frekvence. Pokud to poptávku po kyslíku nevyřeší, dochází k rozvoji ischemické choroby srdeční (ICHS), která může vést až ke vzniku infarktu myokardu. Ve většině případů (více než 90 %) je příčinou vzniku ICHS koronární ateroskleróza, kdy jsou věňčité tepny zúžené aterosklerotickými pláty s rupturou intimy a trombózou v místě plátu. Pláty vznikají ukládáním cholesterolu a jiných tukových částic a vápníku. Někdy může být na vině i jiná příčina, např. samotná trombóza v koronární tepně, embolie věňčitých tepen, spasmus, arteritida aj. (Widimský et al., 2009). Podle délky trvání se ICHS dělí na chronickou a akutní. Chronická se projevuje pomaleji, postupným zvětšováním plátu a může docházet ke kompenzačním mechanismům, jako je hypertrofie myokardu a vytvoření kolaterálního oběhu. Když dojde během narůstání plátu k ruptuře, tak dochází k akutní ICHS, při které je dodávka kyslíku do určité oblasti srdce přerušena náhle a není čas na kompenzační mechanismy. Nejběžnějším příznakem ICHS je *angina pectoris*, která se klinicky projevuje bolestí na hrudi vystřelující do boků, spodní čelisti či levého ramene a paže. *Angina pectoris* se obvykle projevuje při zvýšené námaze a odeznívá po několika minutách (4). Uvádí se, že ICHS, je nejčastější příčinou srdečního selhání. ICHS anebo v kombinaci s hypertenzí (to je riziko až trojnásobné) může celkově za srdeční selhání u více než 50-60 % nemocných a ve vyspělých zemích je nejčastější příčinou úmrtí (Widimský et al., 2003).

2.1. Srdeční selhání

Srdeční selhání je patofyziologický stav, kdy srdce není schopné udržet dostatečný minutový výdej, aby byly pokryty metabolické potřeby organismu. Pro srdeční selhání je charakteristický snížený srdeční výdej, jehož důsledkem může být pokles arteriálního tlaku krve a dále nahromadění krve před levou nebo pravou komorou a tím zvýšení venózního tlaku. Podle toho, jaká situace nastala, se srdeční selhání někdy dělí na selhání „dopředu“ a selhání „dozadu“. Toto umělé dělení se ale již moc nevyužívá, protože se částečně vždycky vyskytují obě situace. Jelikož srdce jsou prakticky dvě samostatné jednotky v sériovém zapojení, tak se využívá dělení podle místa selhání na levostranné, a pravostranné srdeční selhání (popřípadě může být i oboustranné). Dle časového hlediska rozlišujeme na akutní srdeční selhání a dále na syndrom chronického pravostranného a levostranného srdeční selhání. Akutní srdeční selhání může být nově vzniklá porucha činnosti srdce nebo to může být akutní zhoršení již vyskytujícího se chronického stavu. Po vzniku chronického srdečního selhání (CHSS) se aktivují kompenzační mechanismy, které krátkodobě pomohou zlepšit poruchu chronické funkce, ale činnost již nebude taková jako dříve, což vede k dalším kompenzacím a dochází k rozvoji srdečního selhání, které může vést až ke smrti. Po přechodu do chronické fáze srdečního selhání (nemusí být nutně po akutním) jsou možnosti kompenzačních mechanismů omezené, což může vést k akutnímu selhání a následné smrti, či se cyklus může několikrát opakovat (Nečas et. al., 2003; Špinar et al., 2006). Mezi kompenzační mechanismy snažící se zvýšit minutový srdeční objem během srdečního selhání patří zvýšení tepové frekvence, zvýšení kontraktility myokardu, zvýšení předtížení (*preloadu* – viz níže) a zvětšení kontraktálních elementů – hypertrofie srdce. Všechny tyto mechanismy jsou aktivovány prostřednictvím neurohumorálního systému (Widimský et al., 2003).

2.1.1. Příčiny CHSS způsobené systolickou dysfunkcí

Za poruchu systolické funkce komor může snížení síly kontrakce či zvýšení napětí stěn komor. Za snížení síly kontrakce může dilatační kardiomyopatie, srdeční onemocnění (myokarditida) a především ischemická choroba srdeční. K srdečnímu selhání ale může dojít, i když je počáteční kontraktilita v pořádku, a to nadměrným tlakovým zatížením.

Zvýšení tlaku na stěny komor, je způsobeno objemovým (zvýšení *preloadu* – předtížení) a/nebo tlakovým (zvýšení *afterloadu* – dotížení) přetížením srdce. Kromě poruchy systolické funkce komor mohou za srdeční selhání ještě poruchy diastolické funkce komor a poruchy srdečního rytmu (Nečas et al., 2003).

Preload je síla, kterou je svalové vlákno napnuté před stahem (na konci diastoly). Se zvyšujícím se objemem srdeční komory na konci diastoly, se tedy zvětšuje síla, kterou je krev vypuzena do aorty či *a. pulmonalis* (Frankův-Sterlingův zákon). Zvětšení *preloadu* je jedním z kompenzačních mechanismů, ale nedokáže pomoci trvale. Srdce se začne adaptovat na objemové přetížení dilatací. Tím se zvětší objem komory během diastoly, ale sníží se tlak v komoře na konci diastoly a tím i *preload*. Následkem zvětšení diastolického roztažení se zvyšuje napětí ve stěně a práce myokardu je energeticky náročnější a má vyšší spotřebu kyslíku. Aby se snížilo napětí v dilatované části komory, tak dochází k hypertrofii, čímž se napětí rozloží mezi více myofibril. Postupem času dojde ke ztrátě kontraktility myokardu a k sekundární systolické dysfunkci. Následkem chronického objemové přetížení komory může dojít k poškození chlopní, což způsobuje regurgitaci aortální a/nebo mitrální chlopně při přetížení levé komory a pulmonální a/nebo trikuspidální chlopně při přetížení pravé komory (Nečas et al., 2003).

Afterload je odpor, který musí srdce překonat, aby došlo k e젝ci do aorty či *a. pulmoris* během kontrakce. Důvodem zvýšeného *afterloadu* je především zvýšený tlak v aortě (popřípadě v *a. pulmoris*), který je způsoben zvýšenou periferní resistencí či zúžením vzniklým tvorbou aterosklerotického plátu. Pokud srdce nedokáže překonat tlak potřebný k e젝ci, omezí se cirkulace a dochází k akutnímu srdečnímu selhání. Vlivem zvýšeného *afterloadu* se snižuje tepový objem a v komoře po kontrakci zůstává reziduální systolický objem. K nevypuzené krvi v komoře se během diastoly přidá další krev a zvětší tím celkový objem komory (zvýšený *preload*) a následný vztah bude podle Franklin-Starlingova silnější a snáze překoná tlak v aortě (popřípadě *a. pulmoris*). Při chronickém tlakovém přetížení dochází k rozvoji hypertrofie komor, čímž se zlepší její kontraktilita, ale zhorší se její diastolická funkce. Postupem času se poškodí i systolická funkce komory, což má za následek snížení kontraktility. Proti snížení kontraktility se může komora adaptovat dilatací, čímž se ale sníží e젝ční tlak, a nakonec dojde k akutnímu srdečnímu selhání (Nečas et al., 2003).

Pokud kompenzační mechanismy během rozvoje chronického srdečního selhání nestačí pro udržení požadované hladiny kyslíku v myokardu, tak se myokard stává hypoxickým a je zahájena řada adaptačních procesů zahrnující aktivaci či inhibici mnoha funkcí v důsledku aktivace různých signálních drah. Jednu z nejdůležitějších rolí zde hraje hypoxií indukovaný faktor (HIF), který řídí expresi mnoha genů zajišťujících odolnost kardiomyocytů na sníženou dostupnost kyslíku. To samé platí pro ostatní tkáně, pokud kompenzační mechanismy během CHSS neudrží dostatečný minutový objem.

3. Druhy hypoxie

Hypoxie je stav, kdy se hladina kyslíku v tkáních sníží pod její přirozenou hladinu z mnoha příčin. V extrémních případech může dojít i k anoxii, kdy kyslík chybí v tkáni úplně (5; 6). Hypoxické stavy jsou typické pro řadu kardiovaskulárních onemocnění, včetně chronického srdečního selhání.

Podle vzniku dělíme hypoxii na 5 typů:

- a) Hypoxemická hypoxie
- b) Anemická hypoxie
- c) Cirkulační/stagnační hypoxie (ischemie)
- d) Histotoxická hypoxie
- e) Metabolická hypoxie

Hypoxemická hypoxie je typ, kdy tkáně nemají dostatek kyslíku kvůli nízkému obsahu kyslíku v krvi. Je způsobená například nízkým atmosférickým tlakem ve vysokých výškách, takže se hemoglobin nedostatečně saturuje. Cíleně se tato hypoxie používá při trénincích vrcholových sportovců pro lepší adaptaci na zátěž (5; 6)

Při anemické hypoxii dochází k problému při přenosu kyslíku z plic k tkáním v důsledku nedostatečného množství funkčních erytrocytů či špatné funkci hemoglobinu (5; 6). Příkladem nefunkčnosti hemoglobinu může být methemoglobinie, kdy dochází k oxidaci železnatých iontů na železité v molekule hemoglobinu, čímž vznikne methemoglobin, který není schopný kyslík navázat (7). Dalším příkladem je otrava oxidem uhelnatým, který má k hemoglobinu větší afinitu než kyslík (zhruba 200×), takže přednostně vzniká karboxylhemoglobin a znemožňuje tak navázání kyslíku v dostatečném množství (8).

Během cirkulační hypoxie je krev okysličená, ale nedostává se k tkáním např. v důsledku nedostatečné funkce srdce (tzv. srdeční selhání). Dalším problémem je, že se k tkáním rovněž nedostávají živiny a neodvádí se metabolity. Projevem postižené tkáně je její cyanotické zbarvení, způsobené nahromaděním neokysličeného hemoglobinu (5; 6).

U histotoxické hypoxie se okysličená krev dostane až k cílové tkáni, ale ta ho není schopná přijmout vlivem toxických látek (např. otrava kyanidem, kobaltem, acetonem a jiné). Posledním typem je metabolická hypoxie. Při té je vše výše uvedené v pořádku, ale poptávka po kyslíku je větší vlivem zvýšeného metabolismu tkáně např. při sepsi (5; 6).

Podle délky trvání se hypoxie také rozděluje na akutní, která trvá v rádech hodin (např. infarkt) a chronickou, která trvá dny až týdny (např. dlouhodobý pobyt ve vysokých nadmořských výškách).

4. Hypoxií indukovaný faktor (HIF)

HIF je transkripční faktor, jehož hlavní funkcí je buněčná odpověď na hypoxii a udržování kyslíkové homeostázy (Semenza, 2002; Wu et al., 2013). Další jeho funkce je role při vasodilataci cév, erythropoéze, remodelaci cév, migraci buněk, signalizaci, transportu železa a transportu glukózy (Wang et al., 1995; Webb et al., 2009).

HIF byl objeven roku 1992 jako neznámý faktor vážící se na hypoxií responzivní element (HRE – *hypoxia-responsive element*) na 3' enchanceru genu pro erythropoetin (EPO) – hormonu, jenž je indukovaný hypoxií a je zodpovědný za proliferaci erytrocytů (Semenza & Wang, 1992; Goldberg et al., 1998). Později bylo zjištěno, že HIF je heterodimer složený z nově objevené HIF α podjednotky, která je závislá na kyslíku a z konstantně exprimující se HIF β podjednotky (Wang et al., 1995). HIF β byl objeven již dříve a pojmenován *AHR nuclear translocator* (ARNT) jako vazebný partner *aryl hydrocarbon receptor* – AHR (Reyes et al., 1992). Poprvé byla jeho cDNA nasyntetizována jako faktor pro záchranu HEPA-1 buněk, které měly defektní tvorbu enzymu metabolizujícímu P4501A1 xenobiotika (Sogawa et al., 1995). Krátce poté byla objevena také izoforma HIF-2 α (EPAS1 – *endothelial PAS protein 1*; HLF – *HIF-like factor*; MOP2 – *member of the PAS superfamily 2*), která je s HIF-1 α homologní ze 48 % (především v bHLH doméně – viz níže) a také tvoří heterodimer s ARNT pro vazbu na HRE. Na rozdíl

od HIF-1 α vyskytujícím se ve všech tkáních je HIF-2 α více tkáňově specifický. Tvoří se především v plicích, endotelu, játrech, ledvinách a v srdci (Ema et al., 1997; Wiesener et al., 2003). Poslední izoformou HIF α je HIF-3 α (MOP7/IPAS – *inhibitory PAS*), která rovněž dimerizuje s ARNT (Hara et al., 2001). HIF-3 α nemá doposud žádnou prokázanou transkripční aktivitu a některé jeho sestřihové varianty mohou dimerizovat i s HIF-1 α , čímž ho inhibují, protože zabrání jeho navázání na DNA (Makino et al., 2001). Co se týká HIF β (ARNT) další jeho izoformy jsou ARNT2 a ARNT3 (MOP3, ARNTL). Podle Graham et al. (2017) nepatří ARNT3 mezi izoformy HIF β , ale úzce souvisí s ARNT a většinou funguje jako podjednotka beta. Proto označení ARNTL – *ARNT-like* protein.

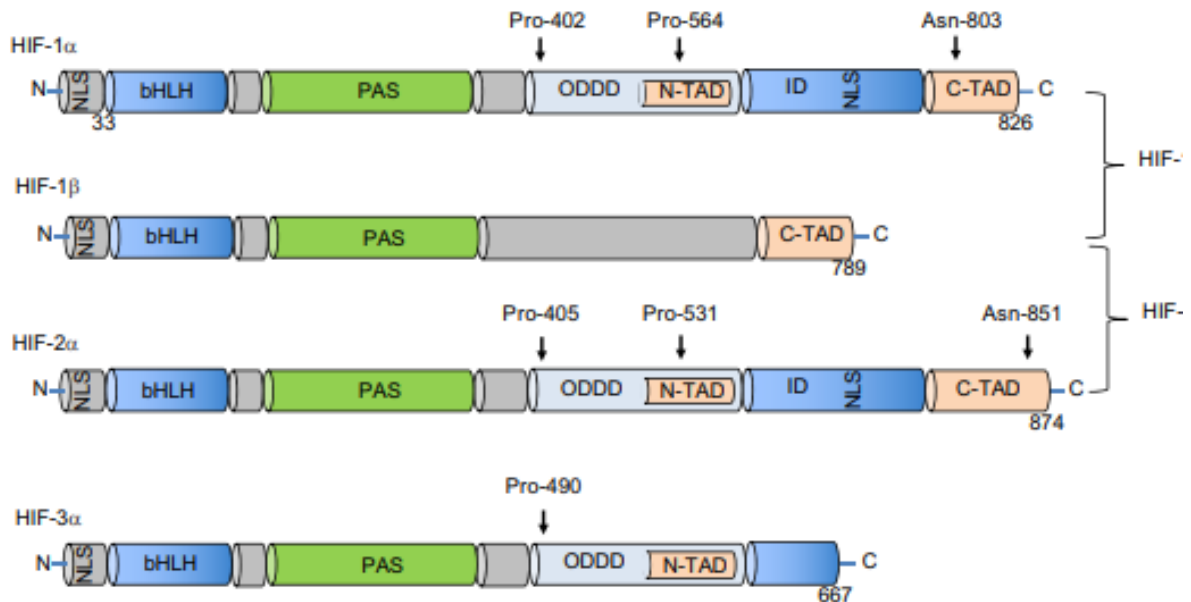
4.1 Struktura

Podjednotky HIF α i ARNT patří se všemi svými izoformy do skupiny PAS proteinů, pro kterou je charakteristická přítomnost dvou homologních PAS domén (PAS-A a PAS-B), kterou spolu podjednotky dimerizují v jádře (Wang et al., 1995). PAS doména byla objevena napříč všemi organismy (Henry et al. 2011) a pojmenovaná podle tří proteinů ve kterých byla poprvé nalezená – PER, ARNT a SIM. *Period circadian protein* (PER) byl objeven u *drosophily* podílející se na řízení cirkadiálních rytmů. *Single-minted protein* (SIM) byl také objeven u *drosophily* a slouží k regulaci genové exprese ve střední buněčné linii embrya. ARNT byl objeven jako lidský esenciální protein pro správný přenos signálu pomocí AHR (Gu et al., 2000).

HIF a stejně tak většina PAS proteinů obsahují *basic helix-loop-helix* (bHLH) doménu na N-konci svých PAS domén. bHLH doména slouží k vazbě na DNA v HRE a také se podílí na tvorbě heterodimerů mezi dvěma bHLH-PAS proteiny (Crews, 1998).

Kromě bHLH domény (nezbytné pro vazbu na DNA) a dvou PAS domén účastníci se vytvoření heterodimeru, obsahuje HIF ještě další domény (viz obrázek 1). *Oxygen dependent degranation domain* (ODDD – v některé literatuře jen ODD) je přítomná pouze u HIF α a dochází na ní během normoxických podmínek k fosforylaci, ubiquitinaci a následné degradaci. ARNT podjednotky neobsahují ODDD, takže jejich hladina nezávisí na přítomnosti kyslíku (Huang et al., 1998, Jiang et al., 1997). Dvě *transactivation domain* (TAD) v poloze na N-konci a C-konci slouží k navázání transkripčních faktorů a regulaci transkripce cílových genů. N-TAD se nachází v ODDD, tudíž ARNT obsahuje

pouze C-TAD. *Nuclear localization sequence* (NLS) umožňuje translokaci do jádra a nachází se jak na N-konci (N-NLS), tak na C-konci (C-NLS) nacházejícím se v *inhibitory domain* (ID), která je mezi ODDD a C-TAD (Ruas et al., 2002, Beaudry et al., 2016).



Obrázek 1 – Struktura HIF podjednotek (Beaudry et al., 2016)

4.2 Izoformy

HIF α se u člověka vyskytuje ve třech izoformách – HIF-1 α , HIF-2 α a HIF-3 α . Jak HIF-1 α tak i HIF-3 α se vyskytují v šesti transkripčních variantách a HIF-2 α má pouze jednu variantu. ARNT se vyskytuje ve třech izoformách – ARNT1, ARNT2 a ARNT3 (ARNT3 se někdy za další izoformu nepovažuje – viz výše). Podjednotka HIF-1 α i HIF-2 α může vytvořit heterodimer s jakoukoliv podjednotkou ARNT a vytvořit tak funkční transkripční komplex (Gaber et al., 2005; Lisy & Peet, 2008). Dvě podjednotky ARNT mohou také vytvořit homodimer. Tím se reguluje dostupnost ARNT pro ostatní možné vazebné partnery. ARNT homodimer může rovněž dimerizovat sekvencí *major late promotor* na *enchancer box* (E-box) obsahující sekvenci CACGTG a aktivovat expresi dalších proteinů (Sogawa et al., 1995). E-box je DNA sekvence nukleotidů sloužící k vazbě DNA s bHLH doménou vzájemně se lišící několika nukleotidy podle konkrétního proteinu. E-box pro HIF α se označuje jako HRE (Semenza et al., 1996). Některé

z transkripčních variant HIF-3 α postrádají ODDD a C-TAD, ale stále se mohou spojit s ARNT či HIF-1 α což vede k vytvoření neaktivního transkripčního heterodimeru, který inhibuje cílovou genovou expresi. HIF-3 α je známý jako lidský *inhibitory PAS (IPAS) protein* (Hara et al., 2001; Makino et al., 2001).

4.3 Regulace HIF

Zatímco ARNT protein i jeho mRNA mají v buňce konstantní hladinu bez ohledu na intracelulární koncentraci kyslíku (respektive na normoxii nebo hypoxii) (Kallio et al., 1997), tak HIF-1 α protein má krátký poločas rozpadu ($t_{1/2} \sim 5-10$ min) a je zásadně regulován v závislosti na přítomnosti kyslíku (Salceda & Caro, 1997). HIF-1 α se spolu s ARNT běžně vyskytují ve všech buněčných typech, zatímco HIF-2 α , HIF-3 α , ARNT2, ARNT3, jsou více specifické pro určitou tkáň (Wiesener et al., 2003).

Hlavními regulátory způsobující degradaci HIF-1 α (i HIF-2 α) jsou dioxygenázy, mezi kterými jsou nejvýznamnější FIH a především PHDs (viz kapitola 5.3.1). Dioxygenázy jsou enzymy katalyzující reakci kyslíku s organickou sloučeninou. Pro funkci FIH i PHDs je naprosto nezbytná přítomnost O₂, 2-oxoglutarátu, dvojmocného železa (Fe²⁺) a částečně i askorbát (Epstein et al., 2001; Bugg, 2003).

Hladina HIF-1 α mRNA se během hypoxie dramaticky zvyšuje. Zatím nebylo zcela objasněno, zdali je primárním mechanismem zvýšení transkripce mRNA, snížení degradace mRNA či obojí (Prabhakar & Semenza 2012).

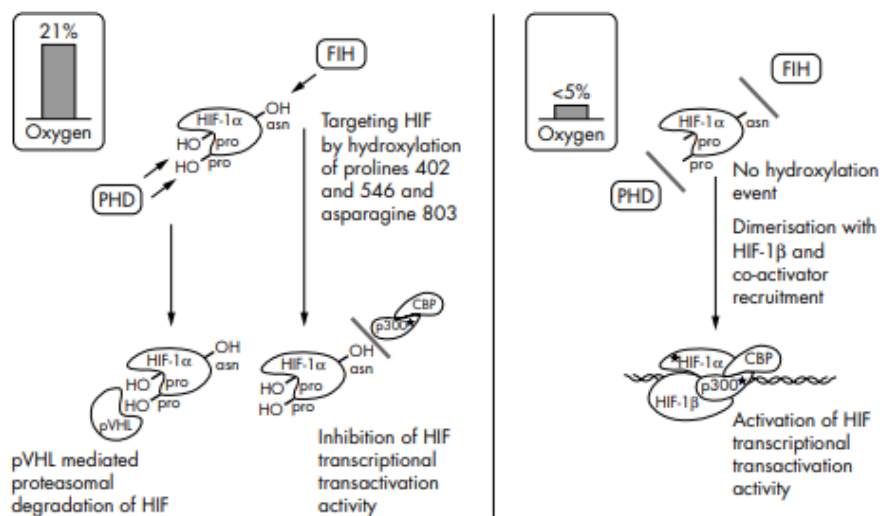
4.3.1 Regulace HIF proteinu

V normoxických podmínkách dochází na HIF α k fosforylaci, ubiquitinaci a následné degradaci proteozomální cestou. Hlavní regulátor množství HIF α podjednotky jsou enzymy prolyl hydrolázy (PHDs). Pokud mají PHDs potřebný enzymatický aparát, tak způsobí hydroxylaci prolinových zbytků pro402 a pro564 v případě HIF-1 α a pro409 a pro564 v případě HIF-2 α , které se nacházejí v ODDD. Na HIF-1 α dochází v ODDD zároveň k acetylaci lysinového zbytku lys532 (Jeong et al., 2002). Hydrolyzované zbytky jsou rozpoznány proteinem *von Hippel-Lindau tumor suppressor* (pVHL), který na HIF α podjednotku nasedne a zprostředkuje E3 ubiquitinizaci (Leung & Ohh, 2002). Takto

označené proteiny jsou degradovány 26S proteasomem. Aby byla degradace úspěšná, stačí hydroxylace pouze jednoho prolinového zbytku (Epstein et al., 2001). Acetylace lys532 na HIF-1 α proteinu přispívá k jeho interakci s pVHL. Tuto acetylaci zprostředkovává N-acetyltransferáza *ADP-ribosylation factor domain*. Ke své aktivitě nepotřebuje molekulární kyslík, ale během hypoxie klesá množství její mRNA, protože je její exprese utlumena (Jeong et al., 2002).

V hypoxických podmínkách chybí prolyl hydroxylázám nezbytný kyslík, čímž nedojde k hydroxylaci prolinových zbytků v ODDD a následnému navázání pVHL, který by HIF α označil ubiquitinem, což by vedlo k jeho degradaci 26S proteasomem. V cytoplasmě se následně různě zvýší hladina izoform HIF α podle tkáně ve které došlo k hypoxii.

Stabilizovaný HIF α je z cytoplazmy transportován do jádra, kde společně s ARNT vytvoří funkční heterodimer spojením v PAS doménách. Tím vznikne stabilní a aktivní HIF komplex, který může zahájit genovou expresi (Kallio et al., 1997; Isaacs et al., 2004.). Děje během normoxie a hypoxie jsou znázorněné na obrázku 2.



Obrázek 2 – Schéma dějů v buňce během normoxie a hypoxie (Gaber et al., 2005)

4.3.1.1. Prolyl hydroxylázy (PHDs)

PHDs jsou enzymy katalyzující hydroxylaci prolinových zbytků na HIF α podjednotce. Rozlišujeme tři izoformy PHDs – PHD1 (EGLN2 – *EGL nine*), PHD2 (EGLN1) a PHD3 (EGLN3), které se liší výskytem a afinitou k jednotlivým alfa izoformám HIF (Huang et al., 2002; Yang et al., 2014). Jak již bylo výše zmíněno, patří mezi dioxygenázy a potřebují molekulární kyslík, 2-oxoglutarát (2OG, α -ketoglutarát) a dvojmocné železo. Během reakce PHDs vytvoří z Fe²⁺ ve svém katalytickém centru Fe³⁺-superoxidový komplex, který reaguje s 2OG, čímž vytvoří sukcinát a Fe⁴⁺-oxointermediát. Fe⁴⁺-oxointermediát následně způsobí hydroxylaci za vzniku CO₂ a trans-4-hydroxyprolinu na cílovém substrátu. Reakce běží podle rovnice: *prolin* + 2OG + O₂ → *trans* – 4 – *hydroxyprolin* + CO₂ + *sukcinát* (Bugg, 2003). Kyselina askorbová není k funkci nezbytná, ale může sloužit jako alternativní akceptor kyslíku a výrazně urychluje reakci redukcí Fe³⁺ na Fe²⁺ v katalytickém centru PHDs. Kromě nedostatku kyslíku během hypoxie vede ke snížení jejich aktivity také nadbytek reaktivních forem kyslíku (ROS – viz níže), které mohou oxidovat Fe²⁺ na Fe³⁺ a znemožnit tak vytvoření Fe³⁺-superoxidového komplexu (Prabhakar & Semenza, 2012). K reakci PHDs s ODDD HIF α slouží motiv LXXLAP, kde „X“ může být libovolná aminokyselina (Huang et al., 2002).

Zatímco PHD2 se vyskytuje ve většině tkání, tak PHD1 se vyskytuje hlavně v mozku, srdci, ledvinách, játrech a varlatelych a PHD3 především v srdci. Aktivita PHD2 a PHD3 je za hypoxie zvýšená, PHD1 nikoliv (Yang et al., 2014). Kromě výskytu se také liší podle různé afinity k HIF α – PHD1 a PHD3 častěji hydroxylují HIF-2 α a HIF-1 α bývá nejčastěji hydroxylován PHD2 (Appelhoff et al., 2004).

4.3.1.2. Ubiquitinace

Ubiquitinace je proces, kdy dojde k navázání několika molekul ubiquitinu na cílový protein. Pokud jsou navázané aspoň 4 molekuly ubiquitinu, tak dojde k rozpoznání 26S proteasomem a následné degradaci. K vazbě ubiquitinu na protein je třeba tří enzymů – aktivačního (E1), konjugačního (E2) a legačního (E3) (Kamura et al., 2000).

4.3.2 Regulace transkripce HIF

V jádře se HIF α po spojení s ARNT naváže na DNA na sekvenci 5'-(A/G)CGTG-3', která je uvnitř HRE (Semenza et al., 1996). HRE je *cis* působící regulační prvek zprostředkovávající HIF dependentní genovou expresi. V mnoha HRE je po HIF vážící sekvenci 5'-(A/G)CGTG-3' 0-8 nukleotidů, po kterých následuje sekvence 5'-CACAA-3' (Semenza, 2014). Například HRE sekvence pro EPO je 5'-**ACGTGCTGTCTCACACA**-3' (Semenza & Wang, 1992). Některé geny mohou mít více různých HRE (Semenza, 2014).

Aby byla možná vazba bHLH doménou na HRE, tak se na HIF-1 α musí na asparaginový zbytek asn803 (u HIF-2 α asn851) v C-TAD navázat některý z transkripčních koaktivátorů p300 či jeho homolog *CREB binding protein* (CBP). CBP/p300 zprostředkovávají navázání dalších koaktivátorů nezbytných pro acetylaci histonů, čímž způsobí rozvolnění chromatinu (Carrero et al., 2000; Lando et al., 2002; Ruas et al., 2002).

Tento proces je možný pouze za hypoxie, protože za těchto podmínek se na asn803 (asn851) váže faktor inhibující HIF (FIH, asparagin hydroláza), čímž znemožní navázání koaktivátoru CBP/p300. FIH stejně jako PHDs patří do skupiny 2-oxoglutarát, Fe²⁺ dependentních dioxygenáz vyžadujících pro svou aktivitu kyslík.

4.3.3 Na kyslíku nezávislá regulace HIF

Kromě hypoxie mohou hladinu HIF regulovat ještě další faktory. U člověka toto bylo prvně pozorováno v buňkách hladkého svalstva plicní tepny, když byla hladina HIF-1 α proteinu zvýšena za normoxických podmínek. Ukázalo se, že za to jsou zodpovědné hormony, cytokininy a růstové faktory, které regulují jeho expresi podle tkáňové specifických mechanismů aktivujících různé signální dráhy. Mezi významné molekuly zvyšující hladinu HIF-1 α za normoxie patří *insulin-like growth factor 1 & 2*, *epidermal growth factor*, *fibroblast growth factor 2*, inzulín, *interleukin 1 beta* a heterogulin (Semenza, 2002; Prabhakar & Semenza 2012). Vazbou některého z těchto ligandů na příslušný tyrozinkinázový receptor (RTK – *receptor tyrosine kinase*) se aktivuje translace HIF-1 α mRNA do proteinu, a to buď PI3K či MAPK signální cestou (Semenza, 2002).

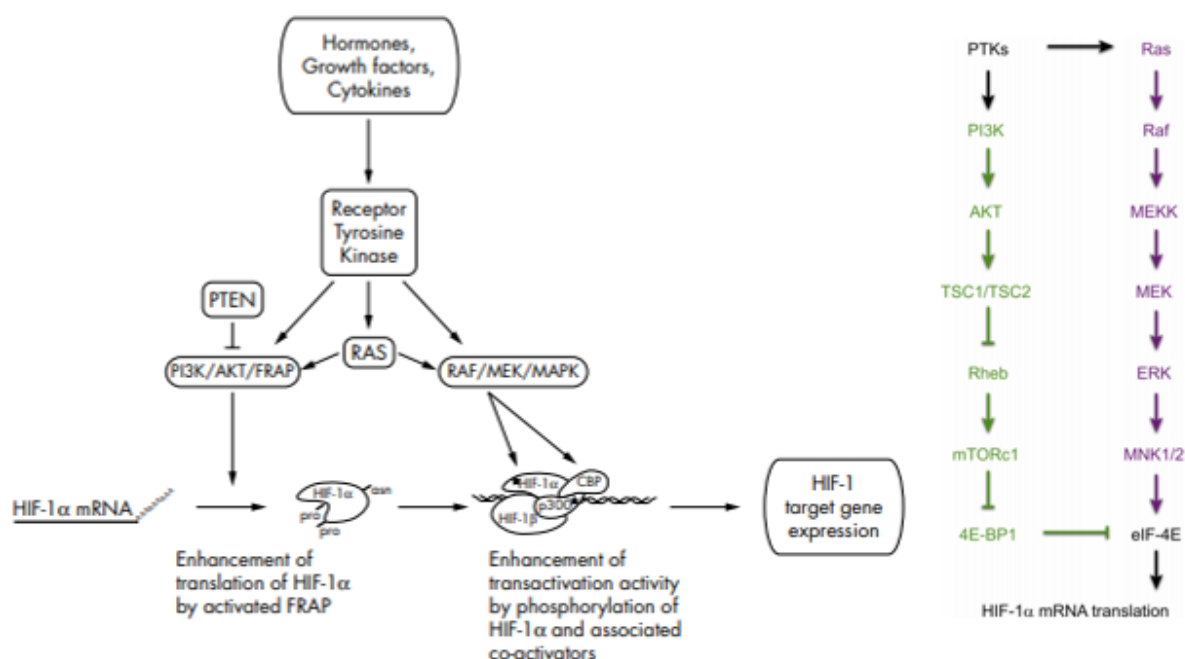
Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) cesta začíná jeho aktivací RTK. Následně PI3K katalyzuje tvorbu *phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate* (PIP3) z *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate* (PIP2) na buněčné membráně. PIP3 se naváže na *protein kinase B* (AKT) a tím jej aktivuje (Luo et al., 2003). Následuje fosforylace *FKBP12-rapamycin associated protein*¹ (FRAP) skrze TSC1/TSC2 komplex a Rheb protein. FRAP kináza způsobí fosforylaci *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein* (4E-BP1 známého také jako PHAS1), který se za normálních okolností váže s podjednotkou *eukaryotic translation initiation factor 4E* (eIF-4E) a inhibuje ji tak. Fosforylací 4E-BP1 se sníží jeho schopnost vázat eIF-4E. Ta se naváže na mRNA čímž vytvoří translační iniciační komplex a umožní tak nasednutí malé ribozomální podjednotky 40S a translaci HIF-1 α proteinu (Laughner et al., 2001). PI3K cesta je regulovaná proteinem *phosphatase and tensin homolog* (PTEN), který mění PIP3 zpátky na PIP2 (Luo et al., 2003).

*Mitogen-activated protein kinase*² (MAPK) cesta rovněž začíná aktivací RTK a také zvyšuje translaci HIF-1 α , ale tím, že stimuluje aktivitu eIF-4E, nikoliv že blokuje jeho inhibitor (viz obrázek 3; Prabhakar & Semenza, 2012). Také zvyšuje transkripční aktivitu HIF α / β dimeru fosforylací C-TAD a příslušných koaktivátorů. Kromě aktivace pomocí RTK může být PI3K i MAPK cesta aktivována RAS proteinem, který je aktivován navázáním GTP (Luo et al., 2003; Gaber et al., 2005).

HIF-1 α je také negativně regulován prostřednictvím proteinu *receptor of activated protein kinase C* (RACK1), který se naváže na HIF-1 α a zprostředkuje jeho E3 ubiquitinaci. Proti tomu je ochráněn vazbou s chaperonem *heat shock protein 90* v bHLH-PAS doméně, čímž se znemožní navázání RACK1 (Prabhakar & Semenza, 2012).

¹ Někdy označován také *mammalian target of rapamycin* (mTOR)

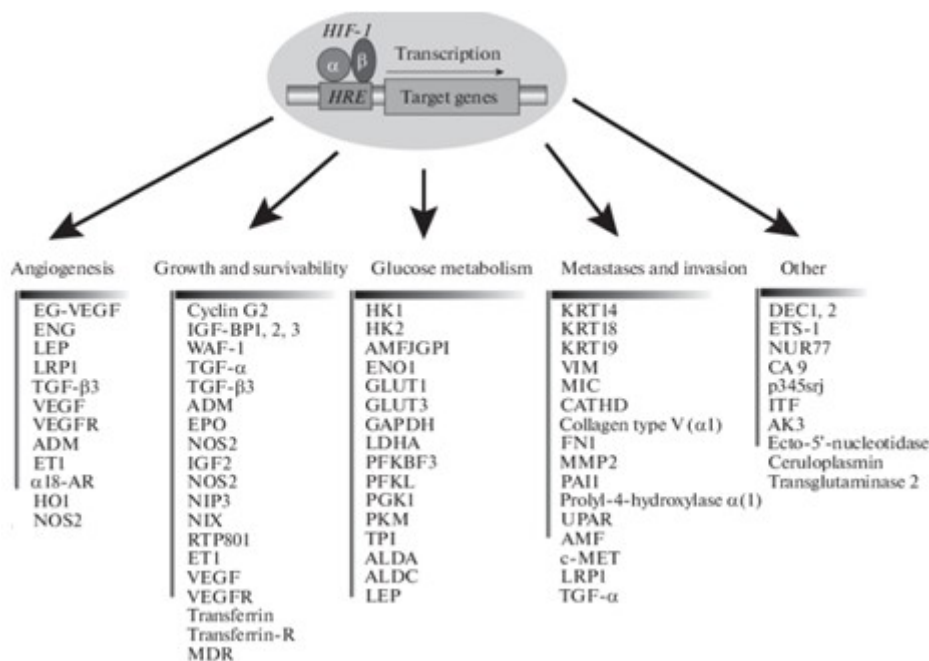
² Někdy označován také *extracellular signal-regulated protein* (ERK)



Obrázek 3 – Schéma na kyslíku nezávislých cest zvyšujících hladinu HIF α (upraveno podle Gaber et al., 2005; Prabhakar & Semenza, 2012)

4.4 Cílové geny HIF-1 α

Připojením HIF heterodimeru na HRE reguluje transkripci cílových genů. Některé geny (např. EPO, VEGF, GLUT1 a EGLN1) mohou být aktivovány jak HIF-1 α tak HIF-2 α , zatímco jiné geny (např. BNIP3 a LDHA) jsou specifické pouze pro HIF-1 α (Prabhakar & Semenza, 2012). Předpokládá se, že vazbou koaktivátorů na C-TAD HIF-1 α jsou přepisovány geny především společné pro obě izoformy a na N-TAD se nachází geny specifické (Hu et al., 2007). Podle Semenzy (2014) HIF-1 α přímo reguluje expresi více než 1 000 lidských genů. Expresi některých cílových genů je spuštěna hypoxií ve všech či ve většině buněčných typů. Většina genů je ovšem indukovaná hypoxií specificky, podle buněčného typu. Kromě přímé genové exprese může HIF regulovat genovou expresi i nepřímo prostřednictvím dalších transkripčních faktorů. V této práci bude zmíněno pouze několik nejvíce probádaných genů ovlivňujících klíčové buněčné děje.



Obrázek 4 – Přehled některých genů ovlivněných HIF-1 α a jejich rozdělení podle funkce (Popravka et al., 2018)

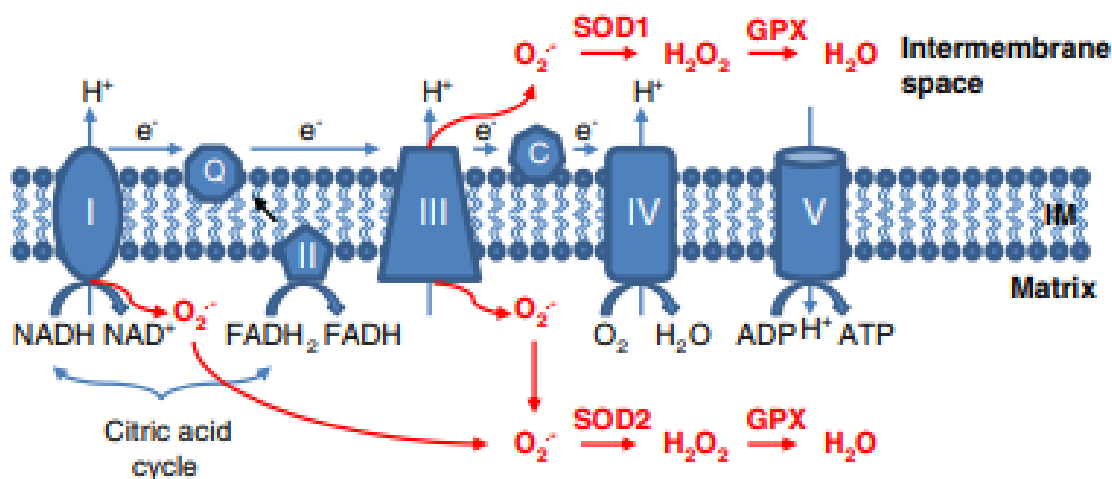
4.4.1. Změny na buněčné úrovni

Vlivem hypoxie jsou v buňce některé metabolické a signální pochody přerušeny, či pozměněny, aby se snížila spotřeba energie. Translace je omezena především na proteiny podílející se na přežití buňky a translace ostatních je inhibována. Následující kapitoly stručně vysvětlují klíčové buněčné a metabolické procesy, na kterých se může významným způsobem podílet HIF-1 α .

4.4.1.1. Reaktivní formy kyslíku (ROS)

ROS jsou malé a velmi reaktivní kyslíkaté molekuly obsahující nepárový elektron ve valenční vrstvě. Zvýšená hladina ROS může způsobit poškození proteinů, DNA, polysacharidů a lipidů. Při nízkých koncentracích mají naopak pozitivní vliv, jelikož slouží jako signální molekuly. Hlavním producentem ROS v buňce jsou mitochondrie, kde redukcí kyslíku vzniká v elektronovém transportním řetězci superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$), který je prekurzorem většiny dalších. Ten se spontánně, či za pomoci katalyzujících enzymů (např. *superoxiddismutasa* – SOD1) přemění na vodu, anebo na další ROS (Turrens, 2003; Murphy, 2009).

Elektronový transportní řetězec (ETC; viz obrázek 5) je součástí dýchacího řetězce a je lokalizovaný na vnitřní mitochondriální membráně, kde pomocí čtyř enzymových komplexů zpracovává redukované kofaktory z cytoplazmy. V komplexu I dojde k oxidaci NADH na NAD^+ a k přenosu elektronů na ubiquinol. Komplex II oxiduje FADH_2 na FAD a také přenáší elektrony na ubiquinol. Z ubiquinolu jsou elektrony přesunuty na komplex III, který je po jednom transportuje přes vnitřní membránu na cytochrom c. Dále pokračují na komplex IV (cytochrom c oxidáza), kde je přijímá kyslík a vzniká voda. Během jednotlivých přenosů elektronů se uvolňuje energie, která se používá k přesunutí vodíkových iontů do mezimembránového prostoru. Vzniklý protonový gradient je použit k tvorbě ATP fosforylací ADP. Během přenosů elektronů komplexy I – III uvolňují superoxidové radikály, které jsou pomocí mitochondriální SOD (SOD2) v matrixu a SOD1 v mezimembránovém prostoru přeměňovány na H_2O_2 a následně pomocí *glutathione peroxidase* (GPX) na vodu jakožto finální produkt (Turrens, 2003; Li et al., 2013).



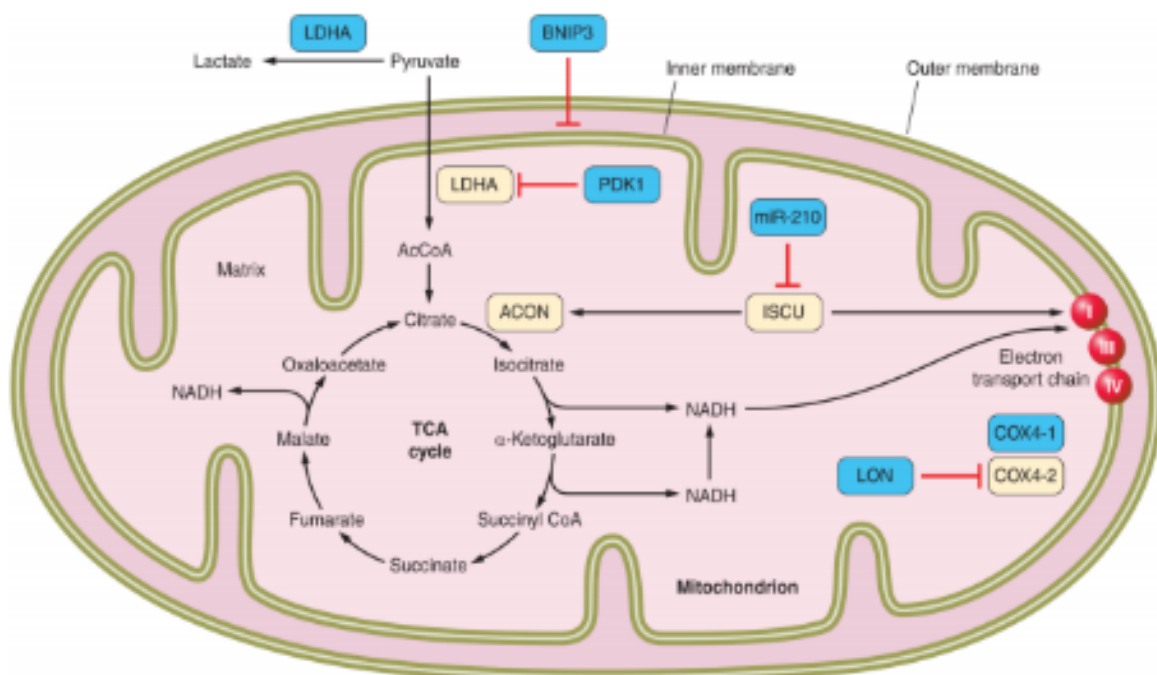
Obrázek 5 – Schéma elektronového transportního řetězce
(Li et al., 2013)

Aby se během hypoxie zamezilo kumulaci ROS v buňkách, a tím jejich poškození, tak se prostřednictvím HIF-1 α spustí exprese různých genů, jejichž produkty zabezpečí adaptivní odpověď. Ke snížení hladiny mitochondriálních ROS (mtROS) se během hypoxie využívá více mechanismů: a) umožnění výměny podjednotky *cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1* (COX4-1) za COX4-2 v komplexu IV ETC, čímž se zvyšuje jeho účinnost b) zvýšení exprese *pyruvate dehydrogenase kinase* (PDC), která odvádí pyruvát pryč od mitochondrií c) indukci *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3* (BNIP3), který spustí selektivní autofáгии mitochondrií d) indukci microRNA-210, která blokuje tvoření shluků Fe/S, které jsou potřebné k aktivitě komplexu I (Li et al., 2013).

Stejně jako HIF-1 α i HIF-2 α může ovlivnit buněčnou produkci ROS. HIF-2 α je transkripčním faktorem pro SOD1, SOD2 a GPX, tudíž během hypoxie může indukovat zvýšení jejich hladiny a tím také regulovat množství ROS a jejich eliminaci přeměnou na vodu (Scortegagna et al., 2003).

4.4.1.2. Metabolismus glukózy

Za normoxických podmínek je glukóza v buňkách přeměňována na ATP. Nejprve probíhá v cytosolu buněk anaerobní glykolýza, kdy dojde k rozpadu jedné molekuly glukózy na dvě molekuly pyruvátu za vzniku 2 ATP. Následuje aerobní glykolýza, kde pyruvát vstupuje do matrixu mitochondrií a je přeměněn pyruvát dehydrogenázou (PDH) na acetylkoenzym A (AcCoA), který s oxalacetátem vytvoří citrát, který vstoupí do citrátového cyklu (Krebsova cyklu; TCA – *tricarbolix acid cycle*), kde vytvoří dalších 36 ATP. Konečným produktem je oxalacetát, který spojením s dalším pyruvátem zahájí nový cyklus. Schéma TCA a některých níže popsaných dějů je vyobrazeno na obrázku 6.



Obrázek 6 – Schéma regulace glukozového metabolismu HIF-1 α (Prabhakar & Semenza, 2012)

Během hypoxie je činnost mitochondrií omezena vlivem genů aktivovaných HIF-1 α . Jednak se tím sníží hladina ROS produkovaných dýchacím řetězcem, ale také je během hypoxie aerobní glykolýza neefektivní. Kromě omezení funkce mitochondrií, HIF-1 α také zvýší přísun glukózy do buněk prostřednictvím exprese *glucose transporter 1/3* (GLUT1, GLUT3) (Chen et al. 2001). Hlavním faktorem, jak tedy snížit činnost mitochondrií je zamezení vstupu pyruvátu vzniklého anaerobní glykolýzou do matrixu mitochondrie. Jednak toho lze docílit aktivací PDC, která odvede pyruvát pryč od mitochondrie a dále aktivací *lactate dehydrogenase A* (LDHA), která přemění pyruvát na laktát a ten je odveden pryč z buňky. Zároveň také HIF-1 α může iniciovat transkripci genu kódujícího *PDH kinase 1* (PDK1), který fosforyluje PDH a tím dojde k inaktivaci → pyruvát nebude přeměněn na AcCoA a nezačíná se tak TCA. Oxidací mastných kyselin v mitochondriích ale přesto může vzniknout AcCoA. Tomu nelze zabránit pomocí PDK1 ani LDHA a musí být exprimován další gen – BNIP3, který spustí selektivní autofagii mitochondrie a je aktivován především při déle trvající hypoxii, např. ICHS (Prabhakar & Semenza, 2012). Další produkty HIF-1 α snižující množství mtROS jsou již více zmíněné COX4-2 podjednotka, miR-210 (microRNA-210) a mitochondriální proteáza (LON), která způsobuje degradaci podjednotky COX4-1.

4.4.2. Změny na orgánové úrovni

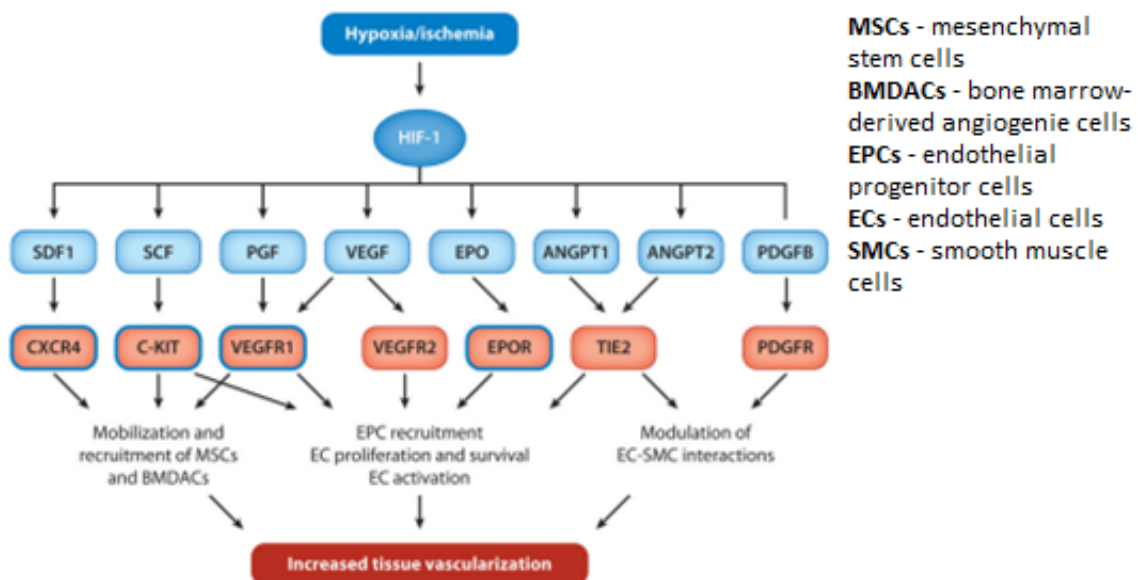
Kromě změny metabolismu uvnitř buněk během hypoxie je nutné pro buňky zajistit přísun kyslíku a navrátit se co nejdříve do normoxie. Toho se docílí především tvorbou nových kapilár a zvýšením proliferace erytrocytů.

4.4.2.1. Neovaskularizace

Neovaskularizace je děj, při kterém dochází k tvorbě nových kapilár. Podle toho, jestli se nové kapiláry tvoří již z kapilár původních, či se nově zakládají, se rozděluje na angiogenezi a vaskulogenezi s tím, že vaskulogeneze často předchází angiogenezi (Klener, 2010). Angiogeneze je komplexní proces zahrnující expresi několika genů v různých buněčných typech vedoucí k tvorbě nových kapilár z již existujících cév. Běžně se angiogeneze uplatňuje při hojení ran či při reakci na ischemické stavy. Pokud je angiogeneze nedostatečná, dochází k srdečním onemocněním, cévním mozkovým příhodám a dalším. Pokud je naopak angiogeneze nadměrná, tak může vést k nádorům či

slepotě (Novotný & Zikán, 2010). Proces je zpuštěn zvýšením hladiny HIF-1 α a HIF-2 α v buňkách vedoucí k aktivaci transkripce mnoha dalších genů jako je *vascular endothelial growth factor* (VEGF), angiopoetiny (ANGPT1 a ANGPT2), EPO a dalších (viz obrázek 7, Pugh & Ratcliffe, 2003). Po aktivaci VEGF stimuluje mnoho typů cévních buněk, ale především stimuluje endotelové buňky, protože v nich probíhá exprese receptorů pro VEGF (VEGFR1 a VEGFR2). Nejprve dojde k narušení bazální membrány původních cév a následně se endotelové buňky od bazální membrány uvolní a začnou se proliferovat a migrovat. Pomocí matrixových metaloproteináz tvořených na svém povrchu částečně rozvolňují extracelulárního matrix pro lehčí migraci vytvoření prvotního pupenu. Následují inhibiční mechanismy, které zastaví proliferaci endotelových buněk, uzavře se bazální membrána a utvoří se lumen cévy, kterou nově protéká krev (Novotný & Zikán, 2010). Krev se nově přivádí do tkáně kyslík a skrze již výše popsané mechanismy je inhibován HIF-1 α a tím i VEGF a je tak angiogeneze ukončena.

Vaskulogeneze má obdobný průběh, ale je zapotřebí nejdříve dostat proangiogenní buňky do požadovaných tkání, kde má nová kapilára vzniknout, např. z kostní dřeně. Toho se stejně jako angiogeneze účastní VEGF a *placental growth factor* (PGF). Dále pak ještě *stromal derived factor-1* (SDF-1) (Prabhakar & Semenza, 2012).



Obrázek 7 – Schéma neovaskularizace. Modře označené jsou označené geny přímo aktivované HIF-1 α , červeně jsou jejich příslušné receptory. Modře orámované jsou receptory, které jsou rovněž aktivované prostřednictvím HIF-1 α (upraveno podle Semenza, 2014)

4.4.2.2. Erytropoéza

Zatímco stimulací angiogeneze HIF-1 α podporuje dodávku kyslíku lokálně podle tkáně, kde je aktivován, tak erytropoéza zvyšuje přísun kyslíku do celého těla proliferací erytrocytů. Kromě exprese EPO a jeho receptoru v buňkách ledvin a játrech spouštějících erytropoézu ovlivňuje HIF-1 α transkripce dalších genů, které regulují absorpci železa ze střev a jeho transport a využití v kostní dřeni. Absorpci železa ovlivňuje aktivací *divalent metal transporter* a inhibicí hormonu hepcidin, který jinak inhibuje protein ferroportin, jenž je zodpovědný za transport železa z buňky. Dále HIF-1 α aktivuje transkripce transferinu a transferinového receptoru nezbytných pro přenos železa do kostní dřeně, kde dochází prostřednictvím EPO a jeho receptoru k erytropoéze. Předpokládá se, že erytropoéza je v dospělosti ovlivněna především HIF-2 α , ale HIF-1 α je nezbytný pro erytropoézu v embryonálním vývoji a pro produkci EPO v ledvinách při akutní hypoxii (Prabhakar & Semenza, 2012).

5. HIF-1 α a srdeční selhání

Srdeční selhání je hlavní příčinou úmrtí ve vyspělých zemích. Nejčastěji je způsobeno ischemickou chorobou srdeční spolu se zvýšeným krevním tlakem. Systémová hypertenze vede k hypertrofii levé komory jako adaptační změně v důsledku zvýšeného *afterloadu*. Snahou srdce je zvýšit ejekční frakci a udržet dostatečný minutový objem. Nakonec ovšem kompenzace nestačí, sníží se ejekční frakce, zvětší se end-diastolický objem a začnou se projevovat klinické signály a symptomy srdečního selhání.

Molekulární patofyziologie srdečního selhání se při výzkumu zaměřuje hlavně na funkci srdce v průběhu rozvoje onemocnění. To lze studovat u laboratorních zvířat podrobených konstrikci hrudní aorty (TAC – *transaortic constriction*). Co se týká HIF-1 α a srdečního selhání, u myší, kterým byla geneticky inhibována exprese HIF-1 α v kardiomyocytech, docházelo ke snížení hladiny VEGF a neovaskularizaci srdce. To způsobilo, že nebylo možné rychle hypertrofující srdce zásobit dostatečně kyslíkem, což vedlo k akceleraci srdečního selhání tři týdny po TAC. Tím se ukázalo, že aktivita HIF-1 α v kardiomyocytech je nezbytná pro zachování kyslíkové homeostázy během adaptačních procesů spojených s tlakovým přetížením srdce (Semenza, 2014).

Jiné transgenní myši, které měly HIF-1 α deletovaný kromě kardiomyocytů také v endotelových buňkách, vykazovaly mnohem vážnější fenotyp srdeční dekompenzace s výrazně sníženou ejekční frakcí a zvýšeným end-systolickým objemem komory již po prvním týdnu od TAC. Zhoršený stav byl způsoben zvýšením apoptózy endotelových buněk, což zapříčinilo snížení hustoty kapilár a myokard se stal více hypoxickým. Analýzou buněčných signálních drah transgenních myší podrobených TAC se ukázalo, že zde významnou roli hraje zvýšená signalizace zprostředkovaná *transforming growth factor β* (TGF- β) a jeho kanonické cesty vedoucí k aktivaci SMAD2/3 proteinu a nekanonické cesty vedoucí k aktivaci MAPK (Semenza, 2014).

Po podání neutralizační protilátky proti TGF- β nebo inhibicí MAPK signalizační cesty nedošlo ke snížení hustoty kapilár a kontraktility po TAC. Tento nálezn lze pravděpodobně vysvětlit inhibicí aktivace MAPK v endotelových buňkách, neboť použitá protilátka není schopná proniknout z cévního řečiště ke kardiomyocytům. Mechanismus, kterým je indukovaná nadměrná signalizace TGF- β v endotelových buňkách transgenních myší po TAC, není dosud zcela zřejmý. Stejně tak není známo, zda se jedná o mechanismus autonomie, či je vyvolán signalizací z kardiomyocytů a také jakým mechanismem zabraňuje HIF-1 α nadměrné signalizaci TGF- β v endotelových buňkách u *wild type* (WT) myší vystavených TAC (Semenza 2014).

Další významné změny spojené se srdečním selháním jsou modifikace glukózového a lipidového metabolismu. Zatímco zdravé srdce má jako hlavní zdroj ATP oxidaci mastných kyselin, tak u selhávajícího srdce je hlavním zdrojem produkce ATP anaerobní glykolýza. Za tuto změnu, kvůli které není možné produkovat dostatečné množství ATP pro udržení srdeční činnosti, je rovněž zodpovědný HIF-1 α (viz kapitola 5.4.1.2.). Nevyužité mastné kyseliny jsou přeměněny na lipidy pomocí *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR- γ), jenž je také aktivován prostřednictvím HIF-1 α (Semenza, 2014). PPAR jsou transkripční faktory regulující metabolismus lipidů. Zatímco PPAR- α zprostředkuje beta-oxidaci mastných kyselin za vzniku AcCoA, tak PPAR- γ je jeho antagonistou a přeměňuje vyšší mastné kyseliny na lipidy a reguluje diferenciaci adipocytů (Ye et al., 2001).

Tyto výsledky ukazují, že HIF-1 α může mít během rozvoje srdeční hypertrofie roli protektivní, protože zvyšuje neovaskularizaci. V terminálních stádiích srdečního selhání se však jeho úloha může změnit na škodlivou v důsledku změn energetického

metabolismu. U transgenních myší, heterozygotů pro HIF-1 α (kmen HIF-1 $\alpha^{+/-}$), se ukázalo, že částečná delece HIF-1 α může jak zabránit rozvoji CHSS, tak jej zhoršit oproti WT myším. Tento nejasný výsledek by mohl být v důsledku složitosti adaptivních reakcí indukovaných HIF-1 α . Jak bylo zmíněno výše, tak HIF-2 α má některé geny s HIF-1 α společné a jiné specifické. Například geny zodpovědné za neovaskularizaci jsou regulovány jak HIF-1 α tak HIF-2 α , zatímco geny zprostředkávající změnu v metabolismu glukózy jsou specifické jen pro HIF-1 α . Tím pádem by bylo teoreticky možné zlepšit léčbu selhávajícího srdce, kdyby se dala selektivně zvýšit aktivita pouze HIF-2 α (Semenza, 2014).

6. Závěr

Chronické srdeční selhání představuje v současné době nejzávažnější kardiovaskulární onemocnění ve vyspělých zemích světa. Je proto logické, že se současný výzkum zaměřuje na hledání možností kardioprotekce, které by tomuto onemocnění předcházely nebo alespoň zpomalily jeho rozvoj a byly co nejprospěšnější pro pacienty a prodloužila jim život či jim jej alespoň zlepšila. Nezastupitelnou roli zde bude mít výzkum HIF jakožto hlavního regulátoru kyslíkové homeostázy a transkripčního faktoru pro stovky různých genů. HIF-1 α je za normoxických podmínek degradována prolyl hydroxylázami závislými na kyslíku. Za hypoxických podmínek jsou prolyl hydroxylázy nefunkční a zvyšuje se hladina HIF-1 α , který zprostředkovává transkripci mnohých genů zlepšujících adaptivní odpověď buněk na nedostatek kyslíku. Kromě pro srdce pozitivních procesů jako je neovaskularizace, má ale aktivace HIF-1 α i negativní dopad při terminálních stádiích chronického srdečního selhání změnou energetického metabolismu z oxidace mastných kyselin na anaerobní glykolýzu. Z tohoto pohledu je podstatný HIF-2 α , který se stejně jako také HIF-1 α podílí na neovaskularizaci v počátečním stádiu srdečního selhání a může zde zastoupit HIF-1 α , zatímco na změnách v energetickém metabolismu způsobující kolaps a vznik akutního srdečního selhání se nijak významně nepodílí.

Přestože je úloha HIF v rozvoji CHSS komplikovaná, její bližší objasnění může odkrýt nové terapeutické možnosti léčby a zkvalitnit život pacientů postižených tímto závažným kardiovaskulárním onemocněním.

7. Seznam literatury

7.1 Internetové zdroje:

- 1 – Stránky Evropské unie
- 2 – Stránky Světové zdravotnické organizace (WHO)
- 3 – Srdeční selhání | IKEM. [online]. Copyright © Institut klinické a experimentální medicíny 2015 [cit. 07.04.2019]. Dostupné z: <https://www.ikem.cz/cs/srdecni-selhani/a-414/>
- 4 – Ischemická choroba srdeční - ICHS | IKEM. [online]. Copyright © Institut klinické a experimentální medicíny 2015 [cit. 09.04.2019]. Dostupné z: <https://www.ikem.cz/cs/ischemicka-choroba-srdecni-ichs/a-420/>
- 5 – hypoxia | Definition, Types, & Physiological Effects | Britannica.com. Encyclopedia Britannica | Britannica.com [online]. Copyright ©2019 Encyclop [cit. 18.03.2019]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/hypoxia>
- 6 – Overview and Types of Hypoxia. Verywell - Know More. Feel Better. [online]. Dostupné z: <https://www.verywellhealth.com/hypoxia-types-symptoms-and-causes-2248929>
- 7 – methemoglobinemia | Symptoms, Congenital, Acquired, & Treatment | Britannica.com. Encyclopedia Britannica | Britannica.com [online]. Copyright ©2019 Encyclop [cit. 08.04.2019]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/methemoglobinemia>
- 8 – Carbon monoxide poisoning | medicine | Britannica.com. Encyclopedia Britannica | Britannica.com [online]. Copyright ©2019 Encyclop [cit. 08.04.2019]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/carbon-monoxide-poisoning>

7.2 Knižní zdroje:

- BOROVANSKÝ, Ladislav. Soustavná anatomie člověka. Vyd. 3., přepr, obr. dopl. a v nové (pařížské) nomenklatuře. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1967.
- NEČAS, Emanuel. Patologická fyziologie orgánových systémů. Praha: Karolinum, 2003. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0615-1.
- WIDIMSKÝ, Jiří. Srdeční selhání. 2. rozšíř. a přeprac. vyd. Praha: Triton, 2003. ISBN 80-7254-385-7.

7.3 Odborné články:

- Appelhoff, R. J., Tian, Y. M., Raval, R. R., Turley, H., Harris, A. L., Pugh, C. W., ... & Gleadle, J. M. (2004). Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37), 38458-38465.
- Barrett, K. E., Barman, S. M., Boitano, S., & Brooks, H. (2016). *Ganong's review of medical physiology*. 25. NY: McGraw-Hill Medical.
- Beaudry, M., Hidalgo, M., Launay, T., Bello, V., & Darribère, T. (2016). Regulation of myogenesis by environmental hypoxia. *J Cell Sci*, 129(15), 2887-2896.
- Bugg, T. D. (2003). Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron*, 59(36), 7075-7101.
- Carrero, P., Okamoto, K., Coumailleau, P., O'Brien, S., Tanaka, H., & Poellinger, L. (2000). Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1 α . *Molecular and cellular biology*, 20(1), 402-415.
- Crews, S. T. (1998). Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes & development*, 12(5), 607-620.
- Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y., & Fujii-Kuriyama, Y. (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(9), 4273-4278.
- Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., ... & Tian, Y. M. (2001). *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 107(1), 43-54.
- Gaber, T., Dziurla, R., Tripmacher, R., Burmester, G. R., & Buttgerit, F. (2005). Hypoxia inducible factor (HIF) in rheumatology: low O₂! See what HIF can do!. *Annals of the rheumatic diseases*, 64(7), 971-980.
- Goldberg, M. A., Dunning, S. P., & Bunn, H. F. (1988). Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science*, 242(4884), 1412-1415.
- Gu, Y. Z., Hogenesch, J. B., & Bradfield, C. A. (2000). The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 40(1), 519-561.
- Hara, S., Hamada, J., Kobayashi, C., Kondo, Y., & Imura, N. (2001). Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3 α . *Biochemical and biophysical research communications*, 287(4), 808-813.
- Henry, J. T., & Crosson, S. (2011). Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annual review of microbiology*, 65, 261-286.

- Hu, C. J., Sataur, A., Wang, L., Chen, H., & Simon, M. C. (2007). The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α . *Molecular biology of the cell*, 18(11), 4528-4542.
- Huang, J., Zhao, Q., Mooney, S. M., & Lee, F. S. (2002). Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1 α for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 39792-39800.
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., & Bunn, H. F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(14), 7987-7992.
- Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F., & Maity, A. (2001). Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1 Interaction between H-ras and hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 276(12), 9519-9525.
- Isaacs, J. S., Jung, Y. J., & Neckers, L. (2004). Aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) promotes oxygen-independent stabilization of hypoxia-inducible factor-1 α by modulating an Hsp90-dependent regulatory pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 16128-16135.
- Jeong, J. W., Bae, M. K., Ahn, M. Y., Kim, S. H., Sohn, T. K., Bae, M. H., ... & Kim, K. W. (2002). Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, 111(5), 709-720.
- Jiang, B. H., Zheng, J. Z., Leung, S. W., Roe, R., & Semenza, G. L. (1997). Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *Journal of Biological Chemistry*, 272(31), 19253-19260.
- Kallio, P. J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J., & Poellinger, L. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(11), 5667-5672.
- Kamura, T., Sato, S., Iwai, K., Czyzyk-Krzeska, M., Conaway, R. C., & Conaway, J. W. (2000). Activation of HIF1 α ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(19), 10430-10435.
- Klener, P. (2010). Angiogeneze jako součást nádorového „ekosystému“ a možnosti jejího ovlivnění. *klinická onkologie*, 14.
- Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M. L., & Bruick, R. K. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & development*, 16(12), 1466-1471.
- Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P. C., & Semenza, G. L. (2001). HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Molecular and cellular biology*, 21(12), 3995-4004.

- Leung, S. K., & Ohh, M. (2002). Playing tag with HIF: the VHL story. *BioMed Research International*, 2(3), 131-135.
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., Wang, H., & Yang, X. F. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of hematology & oncology*, 6(1), 19.
- Lisy, K., & Peet, D. J. (2008). Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell death and differentiation*, 15(4), 642.
- Luo, J., Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2003). Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer cell*, 4(4), 257-262.
- Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., ... & Poellinger, L. (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*, 414(6863), 550.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical journal*, 417(1), 1-13.
- Novotný, J., & Zikán, M. (2010). Nádorová angiogeneze. *Klinická farmakologie a farmacie*, 24(3), 124-126.
- Popravka, E. S., Linkova, N. S., Trofimova, S. V., & Khavinson, V. K. (2018). HIF-1 as a Marker of Age-Related Diseases Associated with Tissue Hypoxia. *Biology Bulletin Reviews*, 8(6), 497-508.
- Prabhakar, N. R., & Semenza, G. L. (2012). Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiological reviews*, 92(3), 967-1003.
- Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature medicine*, 9(6), 677.
- Reyes, H., Reisz-Porszasz, S., & Hankinson, O. (1992). Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science*, 256(5060), 1193-1195.
- Ruas, J. L., Poellinger, L., & Pereira, T. (2002). Functional Analysis of Hypoxia-inducible Factor-1 α -mediated Transactivation IDENTIFICATION OF AMINO ACID RESIDUES CRITICAL FOR TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION AND/OR INTERACTION WITH CREB-BINDING PROTEIN. *Journal of Biological Chemistry*, 277(41), 38723-38730.
- Salceda, S., & Caro, J. (1997). Hypoxia-inducible Factor 1 α (HIF-1 α) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions ITS STABILIZATION BY HYPOXIA DEPENDS ON REDOX-INDUCED CHANGES. *Journal of Biological Chemistry*, 272(36), 22642-22647.
- Scortegagna, M., Ding, K., Oktay, Y., Gaur, A., Thurmond, F., Yan, L. J., ... & Bennett, M. J. (2003). Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice. *Nature genetics*, 35(4), 331.
- Semenza, G. L. (2002). Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical pharmacology*, 64(5-6), 993-998.

- Semenza, G. L. (2014). Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annual review of physiology*, 76, 39-56.
- Semenza, G. L., & Wang, G. L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and cellular biology*, 12(12), 5447-5454.
- Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J. P., Maire, P., & Giallongo, A. (1996). Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 271(51), 32529-32537.
- Sogawa, K., Nakano, R., Kobayashi, A., Kikuchi, Y., Ohe, N., Matsushita, N., & Fujii-Kuriyama, Y. (1995). Possible function of Ah receptor nuclear translocator (Arnt) homodimer in transcriptional regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(6), 1936-1940.
- Špinar, J., Janský, P., Kettner, J., & Málek, I. (2006). Doporučení pro diagnostiku a léčbu akutního srdečního selhání. *Cor Vasa*, 48(1), 3-31.
- Špinar, J., Vítovec, J., Hradec, J., Málek, I., Meluzín, J., Špinarová, L., ... & Táborský, M. (2012). Doporučený postup České kardiologické společnosti pro diagnostiku a léčbu chronického srdečního selhání, 2011. *Cor et vasa*, 54, e113-e134.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*, 552(2), 335-344.
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., & Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the national academy of sciences*, 92(12), 5510-5514.
- Webb, J. D., Coleman, M. L., & Pugh, C. W. (2009). Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing. *Cellular and molecular life sciences*, 66(22), 3539.
- Widimský, P., Hlinomaz, O., Kala, P., & Jirmář, R. (2009). Diagnostika a léčba akutního infarktu myokardu s elevacemi ST. *Cor Vasa*, 51(10), 724-740.
- Wiesener, M. S., JÜRGENSEN, J. S., Rosenberger, C., SCHOLZE, C. K., HÖRSTRUP, J. H., Warnecke, C., ... & Ratcliffe, P. J. (2003). Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *The FASEB Journal*, 17(2), 271-273.
- Wu, J., Chen, P., Li, Y., Ardell, C., Der, T., Shohet, R. V., ... & Wright, G. L. (2013). HIF-1 α in heart: protective mechanisms. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*.
- Yang, M., Su, H., Soga, T., Kranc, K. R., & Pollard, P. J. (2014). Prolyl hydroxylase domain enzymes: important regulators of cancer metabolism. *Hypoxia*, 2, 127.