

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ZOOLOGIE



**Hypoxií indukovaný faktor (HIF) a jeho uplatnění ve
fyziologii živočichů**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Simona Rydvalová

R21606 – Biologie a ekologie

prezenční studium

Vedoucí práce: doc. Ing. Jiří Bezdíček, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a pod vedením mého školitele.

V Olomouci dne 16.4. 2024

Simona Rydvalová

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala především vedoucímu své bakalářské práce doc. Jiřímu Bezdíčkovi, Ph.D. za výběr tématu, odborné vedení, cenné informace, za ochotu poskytnutí studijní literatury a veškerý věnovaný čas. Dále bych chtěla poděkovat svému příteli a celé rodině za obrovskou podporu během celého studia. Taktéž bych ráda poděkovala všem svým přátelům za rady během psaní této práce.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Simona Rydvalová

Název práce: Hypoxií indukovaný faktor (HIF) a jeho uplatnění ve fyziologii živočichů

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra zoologie PřF UP

Vedoucí práce: doc. Ing. Jiří Bezdíček, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2024

Abstrakt: V této práci shrnuji informace o transkripčním faktoru HIF-1. Hypoxií indukovaný faktor 1 je tvořen dvěma podjednotkami, HIF-1 α a HIF-1 β , a jeho aktivita je ovlivněna různými regulačními mechanismy. Regulační mechanismy mohou působit závisle či naprosto nezávisle na hladině kyslíku. Mezi nejpodstatnější regulační mechanismy patří hypoxie, což je stav snížené koncentrace kyslíku v tkáních organismu. S tímto stavem se musí vypořádávat živočichové, kteří žijí v hypoxickém prostředí. Z obratlovců jsou to například mořští savci a mořští ptáci nebo savci a ptáci, žijící ve vysokých nadmořských polohách. Hypoxie umožňuje stabilizaci alfa podjednotky faktoru v cytosolu buněk. Zabráni totiž proteazomální degradaci, která probíhá za běžných podmínek normoxie. Díky funkčním doménám obou podjednotek pak dochází v jádře buňky k jejich dimerizaci a je utvářen funkční komplex HIF faktoru. Faktor řídí skrze vazbu na promotorovou oblast DNA expresi cílových genů. Produkty těchto genů se následně vážou na specifické receptory a umožní průběh mnoha fyziologických mechanismů. Tyto mechanismy pomáhají organismům v adaptaci na sníženou dostupnost kyslíku. Mezi mechanismy, zajišťující celkovou homeostázu patří tvorba nových cév pro posílení zásobení tkání kyslíkem, zvýšená produkce červených krvinek či metabolické změny. Mechanismy jsou součástí mnoha komplexních fyziologických procesů, jimiž jsou například reprodukce či trávení. Hrají však roli také v patofyziologii. Výzkum HIF faktoru má tak potenciál nejen pro hlubší porozumění jeho biologické role, ale také pro vývoj nových terapeutických přístupů k léčbě nemocí spojených s hypoxií.

Klíčová slova: hypoxií indukovaný faktor, fyziologie, HIF, kyslík

Počet stran: 49

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Simona Rydvalová

Title: Hypoxia-inducible factor (HIF) and its application in animal physiology

Type of thesis: Bachelor thesis

Department: Department of Zoology, Faculty of Science, Palacky University

Supervisor: doc. Ing. Jiří Bezdíček, Ph.D.

The year of presentation: 2024

Abstract: In this thesis I summarized the information about transcription factor HIF-1. Hypoxia-inducible factor 1 is composed of two subunits, HIF-1 α and HIF-1 β , and various regulatory mechanisms affect its activity. Regulatory mechanisms may act dependently or independently of oxygen levels. Hypoxia, which is a condition of reduced oxygen concentration in the organism's tissues, is one of the most significant regulatory mechanisms. Animals living in hypoxic environments must cope with this condition. Among vertebrates, these organisms include marine mammals and seabirds, as well as mammals and birds living at high altitudes. Stabilization of the alpha subunit within the cell's cytosol is enabled by hypoxia. It prevents the alpha subunit from proteasomal degradation, which typically occurs in normoxic conditions. Both subunits then undergo dimerization within the cell nucleus through the functional domains, forming the HIF factor complex. Transcriptional factor controls the expression of target genes by binding to the promoter region of DNA. The products encoded by these genes then bind to specific receptors, facilitating numerous physiological mechanisms. Animals rely on these mechanisms to adjust to decreasing oxygen levels. Among the mechanisms ensuring overall homeostasis are the formation of new blood vessels to enhance tissue oxygen supply, increased production of red blood cells and shifts in metabolism. Reproduction and digestion are just two examples of the many complex physiological processes in which these mechanisms play a role. However, they also play a role in pathophysiology. Studying the HIF factor holds promise for gaining a more profound insight into its biological significance, as well as for advancing novel therapeutic approaches for diseases associated with hypoxia.

Keywords: hypoxia-inducible factor, physiology, HIF, oxygen

Number of pages: 49

Number of appendices: 0

Language: czech

Obsah

Úvod a cíle práce.....	12
1. Hypoxií indukovaný faktor.....	13
1.1 Struktura HIF-1 faktoru	13
1.2 Regulace HIF-1 faktoru.....	14
1.2.1 Regulace při dostatku kyslíku.....	14
1.2.2 Regulace při nedostatku kyslíku	15
1.2.3 Regulace na kyslíku nezávislá.....	17
1.2.3.1 Pozitivní regulace HIF-1 faktoru.....	17
1.2.3.2 Negativní regulace HIF-1 faktoru	18
1.3 Dimerizace HIF-1 α a HIF-1 β	19
1.4 Vazba HIF-1 faktoru na DNA	19
1.5 Vliv HIF-1 faktoru na genovou expresi	20
1.5.1 Angiogeneze	21
1.5.2 Erytropoéza	22
1.5.3 Metabolismus glukózy	23
1.5.4 Metabolismus železa	24
1.5.5 Proliferace a přežití buněk.....	25
2. Účast HIF-1 faktoru na fyziologických a patofyziologických procesech	27
2.1 Fyziologické procesy	27
2.1.1 HIF-1 faktor a reprodukce.....	27
2.1.1.1 Folikulogeneze	27
2.1.1.2 Embryogeneze	29
2.1.2 HIF-1 faktor a trávicí soustava.....	30
2.1.3 HIF-1 faktor a kmenové buňky	31
2.2 Patofyziologické procesy	32
2.2.1 HIF-1 faktor a rakovina.....	33
2.2.2 HIF-1 faktor a ischemické poruchy.....	35

3. HIF-1 faktor a obratlovci, žijící v hypoxickém prostředí.....	36
3.1 Podmořští obratlovci	36
3.2 Obratlovci, žijící ve vysokých nadmořských výškách	39
4. Závěr.....	41
5. Seznam použité literatury	42

Seznam obrázků:

Obr. 1: Struktura HLH domény.....	14
Obr. 2: Struktura HIF-1 α podjednotky a molekulární mechanismus její stability.....	16
Obr. 3: Vývoj ovariálního folikulu.....	28
Obr. 4: Graf rozložení zásob kyslíku v těle mořských savců.....	38

Seznam tabulek:

Tab. I: Pozitivní regulátory HIF-1 faktoru.....	19
Tab. II: Negativní regulátory HIF-1 faktoru.....	21
Tab. III: Cílové geny transkripčně aktivovány HIF faktorem.....	25

Seznam některých použitých zkratek:

ADL	Aerobic dive limit
AHR	Aryl hydrocarbon receptor
ARD1	Arrest-defective-1 protein
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATP	Adenosine triphosphate
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BNIP3	BCL2 interacting protein 3
CBP	CREB-binding protein
CHI1	Cysteine-histidine-rich domain 1
CITED	CBP/p300-interacting transactivator with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 1
CKD	Chronic kidney disease
CL	Corpus luteum
COC	Cumulus-oocyte complex
CP	Ceruloplasmin
CREB	cAMP response element-binding protein
DNA	Deoxyribonucleic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
EPAS1	Endothelial PAS domain-containing protein 1
EPO	Erythropoietin
FIH1	Factor inhibiting HIF-1
FKBP	FK506-binding protein
FRAP	FKBP-rapamycin-associated protein
GLUT1	Glucose transporter 1
HAS	HIF ancillary sequence
HAT	Histone acetyltransferase
HBS	HIF-binding site
HIF	Hypoxia-inducible factor

HREs	Hypoxia response elements
HSC	Hematopoietic stem cells
HSP90	Heat shock protein 90
IEB	Intestinal epithelial barrier
IECs	Intestinal epithelial cells
IGF	Insulin-like growth factor
IGFIR	Insulin-like growth factor 1 receptor
IPAS	Inhibitory PAS domain protein
ITF	Intestinal trefoil factor
IVM	In vitro maturation
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mRNA	Messenger RNA
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NAD ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide
NLS	Nuclear localization sequence
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
ODD	Oxygen-dependent degradation
PAS	Per-Arnt-Sim
PCOS	Polycystic ovary syndrome
PDK	Pyruvate dehydrogenase kinase
PHD	Prolyl hydroxylase domain-containing protein
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
pVHL	von Hippel-Lindau tumor suppressor protein
REPC	Renal EPO-producing cell
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
SCFA	Short-chain fatty acids
SGLT	Sodium-glucose linked transporter

TAD-C C-terminal transactivation domain
TAD-N N-terminal transactivation domain
TNF α Tumor necrosis factor alpha
uPAR Urokinase-type plasminogen activator receptor
VEGF Vascular endothelial growth factor

Úvod a cíle práce

Existují dva mechanismy, které mohou buňky konat za účelem produkce energie ve formě ATP, potřebné k životu každého organismu. Tyto mechanismy se mimo jiné liší nároky na přísun kyslíku. Prvním mechanismem je glykolýza, jež může probíhat zcela anaerobně (bez přístupu kyslíku). Její nízký energetický výtěžek pouze dvě molekuly ATP z jedné molekuly glukózy ji však činí méně efektivní (Thompson, 2016). Druhým mechanismem je oxidační fosforylace, fungující striktně aerobně (za přístupu kyslíku) a produkující přibližně 38 molekul ATP. Tvoří tedy většinu ATP, potřebného pro buněčný metabolismus a další biochemické procesy. Kyslík je tak pro život aerobních bezobratlých a obratlovců zcela nezbytný, jelikož slouží jako konečný příjemce elektronů v elektronovém transportním řetězci v mitochondriích (Čerychová a Pavlínková, 2018).

Existují však situace, kdy je tento substrát ve vzdušném či vodním prostředí méně dostupný. V těle pak nastává tzv. hypoxie, což je stav sníženého množství kyslíku v buňkách a tkáních, vedoucí k poruše funkce buněk nebo dokonce k buněčné smrti (Safran a Kaelin Jr., 2003). Hlavní roli v těchto případech hraje parciální tlak kyslíku, který je ovlivňován tlakem atmosférickým. Představuje podíl tlaku ve směsi plynu vyvinutý kyslíkem a jeho běžná hodnota na úrovni mořské hladiny (159 mmHg) zajišťuje dostatečné množství pro dýchání většiny živočichů, žijících na souši. Pokud je parciální tlak nižší, pak je nízká také koncentrace kyslíku a organismy se vypořádávají s hypoxií. K tomu dochází například ve vysokohorských podmínkách, kde je atmosférický tlak nižší, což snižuje také parciální tlak kyslíku a jeho koncentraci v atmosféře. Nebo naopak v hlubokomořských podmínkách, kde je tlak sice vlivem hmotnosti vodního sloupce vysoký, ale parciální tlak kyslíku vlivem sníženého obsahu rozpuštěného kyslíku nízký. Daleko extrémnějším případem je fungování v naprosto anaerobním prostředí. Takové podmínky volí pro výrobu ATP velká řada buněk jinak aerobně závislých organismů, jelikož jsou nuceny kompletně fungovat či být alespoň střídavě schopny přepínat na anaerobní energetiku. Mezi takové buňky patří buňky trávicího traktu či buňky kmenové. Můžeme tedy říct, že buňky jsou na hladinu kyslíku velmi citlivé a jsou schopny ji regulovat dle svých potřeb (Bezdiček, 2022).

Tato práce se zaměřuje na způsob, jakým se buňky a organismy vypořádávají se striktně či fakultativně anaerobními podmínkami (hypoxie) vůči normálnímu stavu (normoxie). Konají tak pomocí transkripčního faktoru, který zprostředkovává základní homeostatické reakce na situaci snížené dostupnosti kyslíku. Aktivita tohoto faktoru je mimo jiné regulována právě koncentrací kyslíku. Faktor se váže na specifické místo v DNA a ovlivňuje transkripci genů, zodpovědných za přizpůsobení buněk na nedostatek kyslíku. Mezi takové geny patří například geny pro angiogenezi (tvorbu nových cév), glykolýzu nebo erytropoézu (tvorbu červených krvinek). Přestože existuje mnoho transkripčních faktorů indukovaných hypoxií a ovlivňujících expresi genů, v současné době je nejprostudovanějším HIF-1. Jeho význam v rámci fyziologických a patofyziologických procesů v různých oblastech u řady savců, včetně člověka (*Homo sapiens sapiens* Linneanus, 1758) tak bude hlavním předmětem této práce, jelikož je v těchto kontextech studován a je cílem mnoha výzkumných prací.

1 Hypoxií indukovaný faktor

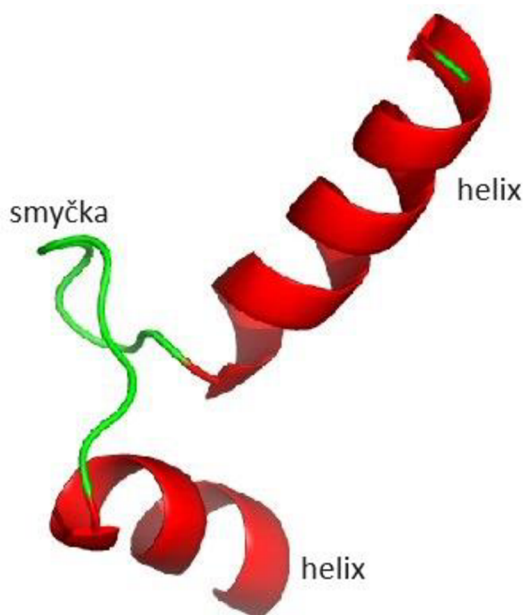
1.1 Struktura HIF-1 faktoru

HIF-1 faktor je heterodimerický komplex, tedy molekula složená ze dvou menších, odlišných monomerů navzájem spojených vazbou. Podjednotky faktoru se nazývají HIF-1 α a HIF-1 β a jsou kódovány geny Hif1a a Hif1b (Čerychová a Pavlínková, 2018). Gassmann a Wenger (1997) uvádějí, že komplex je proteinové povahy a jeho podjednotky se řadí do rodiny dle specifického strukturního motivu, jímž je doména bHLH. Tato doména se skládá ze dvou hlavních částí, základní domény a domény helix-smýčka-helix. Základní doména se nachází na N-terminálním konci a obvykle obsahuje aminokyseliny s kladným nábojem, jako jsou lysin (Lys, K) a arginin (Arg, R), jak uvedli Sadeghi a kol. (2020). Ty jsou díky zápornému náboji fosfátového základu DNA schopné základní doménu navázat na specifické místo v promotorové oblasti genů, sloužící k řízení iniciace transkripce genů. Doména tak zajistí vliv faktoru na expresi cílových genů, což je její primární funkce. Je ale také schopna interagovat s dalšími proteiny, jako například s HIF-1 β , díky čemuž se podílí na formaci funkčního heterodimeru HIF-1. Druhá doména je tvořena dvěma alfa-helixy spojenými smyčkou (Obrázek č. 1). Je klíčová pro vytvoření dimerního komplexu.

Na opačném, C-terminálním konci se nachází druhá dimerizační doména PAS, jejíž název byl odvozen z iniciál prvních tří proteinů, u kterých byla tato doména poprvé objevena. Jsou jimi Per (period–regulátor cirkadiálního rytmu u *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830), Sim (single minded–regulátor vývoje mozku u *D. melanogaster*) a ARNT (Gassmann a Wenger, 1997). Doména obsahuje dvě homologní jednotky zhruba o 50 aminokyselinách, PAS A a PAS B. Semenza a kol. (1997) uvedli, že obě jednotky nesou konzervovaný HXXD motiv (H pro histidin, X pro jakoukoliv aminokyselinu, D pro aspartát), jehož funkce však není stále zcela jasná. Spolu s HLH doménou pak PAS doména HIF-1 α interaguje s PAS doménou HIF-1 β , čímž dochází k utvoření funkčního komplexu HIF faktoru.

Když byl HIF-1 poprvé objeven, bylo na základě strukturní analýzy obou podjednotek zjištěno, že HIF-1 β byla již dříve identifikována jako ARNT. Jak uvedli Chun a kol. (2002), HIF-1 β je produktem ARNT genu, který prokazatelně kóduje izoformy aryl-hydrokarbonového receptoru (AHR) jaderného translokátoru. Beta podjednotka je tak kromě formace HIF-1 faktoru spojením s HIF-1 α v buňkách s nedostatkem kyslíku schopna tvořit i další komplexy. Je jím například komplex s AHR v buňkách vystavených aryl uhlovodíkům, jako jsou například dioxiny. Alfa podjednotka byla na rozdíl od HIF-1 β nově definovaným proteinem. Ta dále obsahuje dvě transaktivační domény, TAD-C na C-terminálním konci a TAD-N na N-terminálním konci. Ty jsou propojené inhibiční doménou (Ruas a kol., 2002). TAD-N se překrývá s ODD doménou (Obrázek č. 2). TAD-C doména se za účelem kompletní aktivace HIF faktoru pojí s koaktivátory, jimiž jsou p300 a CBP. Kompletní HIF-1 faktor je svou stavbou jedinečný. Přestože existují i další transkripční faktory, konkrétně například HIF-2 (EPAS1) a HIF-3, které s ním sdílejí některé strukturní prvky a mechanismy regulace, každý má své

unikátní vlastnosti a funkce. Patří tedy sice do společné rodiny hypoxií-indukovaných faktorů (HIFs), ale jsou to právě odlišnosti, které je činí nezaměnitelnými.



Obrázek č. 1: Struktura HLH domény (Carr, M. Steven, 2007, Memorial University of Newfoundland, upraveno Rydvalová)

1.2 Regulace HIF-1 faktoru

Pro přežití a správnou funkci buněk a tkání organismů je nutné udržovat optimální podmínky a vnitřní stabilitu prostředí, a to i při změnách vnějších podmínek. K tomu slouží základní biologický mechanismus nazývaný homeostáza, který udržuje konstantní stav fyzikálních či chemických parametrů, v tomto případě množství kyslíku. V reakci na změnu vnějších podmínek se pak spouští řada regulačních mechanismů, zajišťujících co možná nejrychlejší adaptaci na daný stav. Tato kapitola je zaměřena na detailní analýzu regulačních mechanismů faktoru HIF-1, působících při běžném stavu normoxie, v reakci na hypoxii, ale také naprosto nezávisle na aktuální hladině kyslíku.

1.2.1 Regulace při dostatku kyslíku

HIF-1 faktor je hlavním transkripčním faktorem, zapojeným do adaptivní odpovědi na hypoxii. Neméně důležitá je však také jeho regulace za normálních okolností, kdy je kyslíku dostatek. Regulace jednotlivých podjednotek heterodimeru se mezi sebou výrazně liší. HIF-1 β totiž není primárně regulován kyslíkem, tudíž je v cytosolu buňky exprimován nepřetržitě bez ohledu na množství kyslíku v tkáních (Semenza, 2001). Jeho koncentrace v buňkách je tedy vysoká. V případě HIF-1 α sice dochází ke stejné intenzivní expresi, ale tyto vyprodukované

podjednotky jsou následně degradovány v proteazomu. Proteazom je komplex mnoha proteinových podjednotek, které skrze proteolytické reakce ruší peptidové vazby jiných proteinů, čímž je degradují. Podjednotky tedy mají velmi krátký poločas rozpadu (<5 min), jak uvedli Weidemann a Johnson (2008). Při degradaci nejprve dochází k post-translační prolyl hydroxylaci (Obrázek č. 2) na dvou specifických místech domény ODD (Schofield a Ratcliffe, 2004). Tato místa, nazývaná se Pro402 a Pro564, jsou prolylové zbytky HIF-1 α podjednotky a jejich hydroxylace je řízená enzymy s doménou PHD. Patří mezi tzv. prolyl hydroxylázy. Zda hydroxylace proběhne, závisí právě na přítomnosti kyslíku, jelikož atom kyslíku hydroxylové skupiny pochází z kyslíku molekulového (Safran a Kaelin Jr., 2003). Druhý atom kyslíku slouží k rozdělení α -ketoglutarátu a vzniku vedlejších produktů sukcinátu a CO₂. PHD enzymy jsou tedy označovány za kyslíkové senzory, jak uvedli Lee a kol. (2004). Funkčnost těchto enzymů je dále podmíněna také přítomností kofaktorů, jako je již zmiňovaný α -ketoglutarát, vitamín C a železo.

Po proběhnutí této enzymatické reakce je umožněno navázání tumorového supresoru pVHL. Tento protein je složen z několika domén, z nichž konkrétně β -doména zodpovídá za navázání k ODD doméně. Tato β -doména je z velké části hydrofobní, obsahuje však dvě hydrofilní oblasti (His-115 a Ser-111), které mohou interagovat s vodou. Když dojde k hydroxylaci HIF-1 α , voda je vytlačena a oblasti se pojí s podjednotkou pomocí vodíkových můstků. pVHL je součástí E3 ubikvitin-ligázového komplexu jinak také nazývaného VBC dle jeho hlavních částí (VHL/elongin B/elongin C). Dle Brahimi-Horna a Pouyssegura (2009) pojí VBC alfa podjednotku s polyubikvitinovým řetězcem, čímž způsobí její napojení na proteolytický proteazomální komplex. Tento vícepodjednotkový komplex selektivně degraduje proteiny, které byly ubikvitinovány. Na závěr dojde na C-terminálním konci podjednotky k hydroxylaci asparaginylu-803, řízené enzymem FIH1, patřícím do rodiny dioxygenázových enzymů, čímž je zabráněno koaktivátorům p300 a CBP v navázání. Koaktivátory jsou ale pro aktivaci faktoru v tomto případě zcela zásadní (Ziello a kol., 2007). Exprese genů, regulovaných HIF faktorem je tak bez jejich přítomnosti potlačena a buňky fungují v souladu s dostupnými zásobami kyslíku.

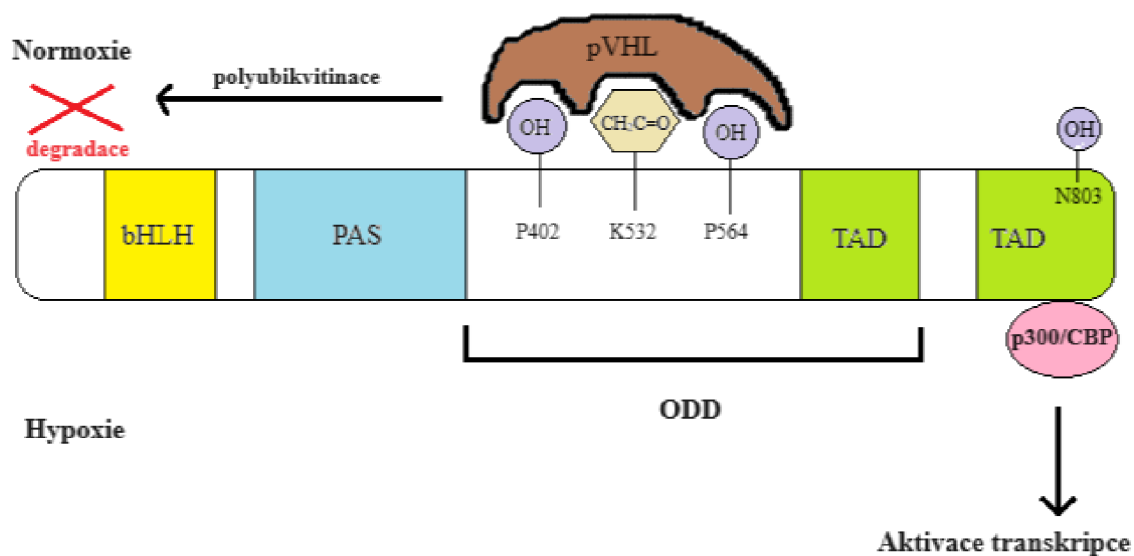
1.2.1 Regulace při nedostatku kyslíku

Pokud jsou buňky vystaveny koncentraci kyslíku nižší než 6 %, což odpovídá hodnotám parciálního tlaku zhruba 40 mmHg na úrovni mořské hladiny, nastává v tkáních hypoxie (Jiang a kol., 1996). Mechanismus, jímž jsou buňky schopny hypoxii vnímat, není stále zcela jasný. Jak ale uvedl Semenza (2001), je možné, že k tomu slouží např. peroxid vodíku, tedy reaktivní forma kyslíku (ROS), vznikající jako vedlejší produkt metabolismu v mitochondriích. Vzniká ze superoxidového aniontu, který je vysoce reaktivní a pojí se s různými molekulami. Tato signální molekula ovlivňuje aktivitu HIF-1 faktoru a transkripci cílových genů. Dle této teorie by pak hladiny ROS při hypoxických podmínkách rostly, jelikož by byla z důvodu nedostatku kyslíku k odstranění elektronů blokována poslední fáze dýchacího řetězce. Ale existují také vědecké teorie, tvrdící opak. Ty říkají, že hladina ROS při hypoxii klesá vlivem působení

NADPH oxidáz. ROS pak mohou dále například inaktivovat enzym PHD2 a tím také zabránit degradaci HIF-1 α (Bezdiček, 2022).

Jakmile jsou buňky vystaveny hypoxickým podmínkám, dochází k výraznému poklesu míry degradace HIF-1 α , což má za následek postupnou akumulaci této podjednotky v cytosolu. Nejprve musí být blokována post-transkripční hydroxylace. S ubývajícím dostupným molekulovým kyslíkem se enzymy skupin PHD a FIH stávají inaktivními, jelikož chybí kyslík jako substrát pro vytvoření samotné hydroxylové skupiny, jak uvedli Brahimi-Horn a Pouyssegur (2009). Inaktivace však neprobíhá u obou skupin najednou. Každá skupina má totiž odlišnou prahovou hodnotu koncentrace kyslíku, při které je ještě schopna aktivovat. Při nastupujících hypoxických podmínkách tak nedochází k přerušení rozpadu podjednotky náhle a kompletně, ale pozvolna. Enzymy s prolyl hydroxylační doménou (PHD) jsou vyřazeny z provozu jako první, čímž dochází ke stabilizaci HIF-1 α . Díky jaderné lokalizační sekvenci (NLS), umístěné na jejím C-terminálním konci, se tak podjednotka váže na proteiny jaderných pórů, jež ji následně přenesou do jádra buňky. Dokud ale není zcela inaktivovaná i skupina FIH enzymů, zůstává HIF-1 α částečně nefunkční.

Nedochází-li k hydroxylaci, pak není von Hippel-Lindau protein schopen podjednotku rozeznat a k jeho navázání za účelem označení k proteazomální degradaci nedojde (Safran a Kaelin Jr., 2003). Hydroxylován není ani asparaginyl-803, a tak je koaktivátorům p300 a CBP umožněno se na tuto karboxy-terminální doménu navázat (Obrázek č. 2). Mezi transaktivační doménou TAD-C a cystein/histidin-rich 1 (CH1) doménou, nacházející se na CREB-binding proteinu (CBP), tak dochází k interakci (Ruas a kol., 2005). Dohromady pak komplex p300/CBP přenáší acetyl na histonové proteiny v okolí exprimovaných genů a skrze tento proces, zvaný histonová acetylace, modifikuje chromatinovou strukturu (Freedman a kol., 2002). Díky funkci histonových acetyltransferáz (HAT) tak může dojít k řádné aktivaci HIF-1 faktoru a následné genové expresi, tedy transkripci a translaci cílových genů.



Obrázek č. 2: Struktura HIF-1 α podjednotky a molekulární mechanismus její stability (Lee a kol., 2004, Seoul National University, upraveno Rydvalová)

Na obrázku č. 2 můžeme vidět průběh mechanismů, odehrávajících se za podmínek normoxie a hypoxie. Při dostatku kyslíku můžeme pozorovat degradaci podjednotky skrze hydroxylaci cílových aminokyselinových zbytků, následné navázání pVHL a označení připojením polyubikvitinového řetězce. Také můžeme pozorovat hydroxylaci asparaginylu-803 pro blokadu navázání koaktivátorů. Při hypoxii nedochází k hydroxylaci, tudíž není podjednotka degradována a dochází k její akumulaci v buňce. Dále je umožněno navázání koaktivátorů, a tak dochází k aktivaci HIF-1.

1.2.3 Regulace na kyslíku nezávislá

Kromě hydroxyláz, závislých na hladině kyslíku, existují i jiné efekторы, které mají schopnost regulovat HIF-1 faktor a jeho aktivitu. Ty mohou působit v různých fázích aktivace faktoru, ať už přímo či nepřímo. Většinou však regulují hlavně translaci faktoru na rozdíl od stimulů, závislých na hladině kyslíku. Ty ovlivňují již exprimované α -podjednotky. Regulační látky pak mohou ovlivnit faktor pozitivně či negativně.

1.2.3.1 Pozitivní regulace HIF-1 faktoru

Mezi pozitivní regulační látky patří kromě hypoxie (Tabulka č. 1) například ionty kovů, a to konkrétně kobaltu či niklu. Ty mohou konkurovat atomu železa při vazbě na hemovou strukturu prolyl hydroxyláz, a tak zabránit jejich schopnosti katalyzovat hydroxylaci, vedoucí k degradaci HIF-1 α (Chun a kol., 2002). Simulují tak hypoxii, a tím pádem mají na HIF-1 α stabilizační účinek. Zvyšují tak aktivitu celého faktoru a genovou expresi. Další takovou látkou je oxid dusný, vznikající prostřednictvím enzymu NOS (nitric oxide synthase), jehož produkce je stimulována hypoxií. Jeho účinek je reciproký a liší se na základě koncentrace NOS, a tedy i samotného oxidu v buňce. Jak uvedli Sogawa a kol. (1998), při vysokých koncentracích transkripční aktivitu faktoru snižuje a blokuje stabilizaci HIF-1 α . V opačném případě akumulaci alfa podjednotky naopak podporuje a podporuje také expresi cílových genů, jako je např. EPO či VEGF. Dále se mezi pozitivní regulátory řadí také již zmíněné ROS molekuly, vznikající jako vedlejší produkt dýchacího řetězce v mitochondriích. Ty se taktéž podílí na stabilizaci alfa podjednotky transkripčního faktoru. Pozitivní vliv má na transkripční faktor také již zmiňovaný koaktivátor p300.

Na stabilizaci HIF-1 α a aktivaci HIF-1 faktoru při normoxii se pozitivně podílejí také buněčné signální dráhy, závislé na růstových faktorech (Bárdos a Ashcroft, 2005). Důležitými enzymy jsou zde proteinové kinázy, jako je např. MAPK. Dalším velmi významným enzymem, figurujícím v signálních drahách, je PI3K. HIF-1 α je ve vysokých hladinách přítomna v lidských nádorech, kde může být exprimována i za podmínek normoxie. Růst těchto nádorů závisí na aktivitě HIF faktoru. Během vývoje nádoru faktor podporuje expresi genů pro angiogenezi (např. VEGF), což umožňuje zásobení nádoru kyslíkem a živinami pro růst a šíření. Dále také zajišťuje přežití nádorových buněk v hypoxických podmínkách skrze expresi

genových produktů, podporujících anaerobní produkci ATP. Ta umožňuje buňkám rychlejší získávání energie. Takovými produkty jsou například insulin-like růstové faktory (IGF) a epiteliální růstové faktory (EGF), sloužící pro přežití nádorových buněk. Dále aldolázy, enolázy, laktát dehydrogenázy a fosfofruktokinázy jako glykolytické enzymy a GLUT 1 a GLUT 3 jako glukózové přenašeče (Semenza, 2000). Aby byla umožněna exprese alfa podjednotky při normoxii, zmíněné růstové faktory nejprve aktivují protein kinázu (PI3K) a FRAP neboli mTOR protein, které translaci a expresi HIF faktoru v nádorových buňkách stimulují (Zhong a kol., 2000). Vzhledem k této podpoře růstu a progresi nádorů se inhibice HIF faktoru stala přední oblastí výzkumu v boji proti nádorovým onemocněním (více v kapitole Patofyziologické procesy).

1.2.3.2 Negativní regulace HIF-1 faktoru

Hlavním příkladem negativní regulace HIF-1 faktoru je proteazomální degradace. Existují však i další mechanismy, potlačující jeho aktivitu nezávisle na koncentraci kyslíku. Přehled těchto mechanismů a jejich funkcí je zobrazen níže (Tabulka č. 2). Jedním z nich je vazba HIF-1 faktoru s jiným proteinem, ať už pro přímé působení, tedy zmíněné označení k degradaci či působení nepřímé (Bárdos a Ashcroft, 2005). To zajišťuje, že díky této vazbě je zabráněno jiné signální molekule se na dané vazebné místo napojit. Mezi proteiny, které tvoří s faktorem vazbu, patří například nádorový supresor VHL. Při hypoxii dochází také k akumulaci dalšího podstatného nádorového supresoru, jímž je p53 (Ashcroft, Taya a Vousden, 2000). Jeho vazba na HIF-1 α způsobuje útlum transkripční aktivity celého faktoru. K tomu je ale pro p53 nejprve nutné se navázat na koaktivátor p300. Významným enzymem, podílejícím se na konečné degradaci faktoru je ARD1. Tato acetyltransferáza snižuje acetylaci lysinu 532, umístěném na ODD doméně transkripční aktivity faktoru. Posiluje totiž vazbu mezi faktorem a proteinem VHL, zprostředkovávajícím jeho polyubikvitinaci (Jeong a kol., 2002).

Dokonce i sám HIF-1, respektive mutant jeho α -podjednotky dnHIF-1 α vzniklý delecí, je schopen snižovat svou aktivitu. Ten postrádá transaktivační a ODD doménu a brání ve formaci funkčního HIF-1 komplexu, jak uvedli Halterman a Federoff (1999). Transaktivační doménu postrádá také IPAS protein, který je svou stavbou velmi podobný samotné HIF-1 α . Ten se na podjednotku váže, a tím jí zabrání v navázání na HIF-1 β a následně na DNA. Snižuje tak transkripční aktivaci faktoru a míru exprese genů pro angiogenezi. Transaktivaci α -podjednotky brání CITED2, což je protein, kompetitivně inhibující vazbu pozitivního regulátoru a koaktivátoru p300 na HIF-1 α . Jeho exprese je stimulována při hypoxii a následně dochází mezi ním a podjednotkou k soutěži o vazbu s koaktivátorem. Podjednotka je ale pravděpodobně při kompetici úspěšnější, jelikož se v buňkách příliš mnoho komplexů CITED2/p300 nevyskytuje (Bhattacharya a kol., 1999). Skrze CH1 doménu se na p300 váže také CITED4, nový člen rodiny CITED proteinů. Oba tyto proteiny tak zamezí transaktivaci HIF faktoru a následné genové expresi. Přesto jsou však za kontrolu transkripční aktivity HIF-1 faktoru primárně zodpovědné regulátory, působící v odpovědi na aktuální koncentraci kyslíku (Lee a kol., 2004).

Tabulka č. 1: Pozitivní regulátory HIF-1 faktoru (Bárdos, I. J., Ashcroft, M. 2005, Cell Growth Regulation and Angiogenesis Laboratory, Cancer Research UK, upraveno Rydvalová).

Efektor	Funkce/následek
Hypoxie/molekuly, navozující hypoxii	Inhibice hydroxylace HIF-1 α , pVHL se neváže, stabilizace, dimerizace s HIF-1 β a transaktivace
PI3K	Stabilizace HIF-1 α , řízena růstovými faktory, zvýšení aktivity HIF- α
MAPK	Zvýšení aktivity HIF-1, stabilizace HIF-1 α při normoxii
P300	Přímá interakce s HIF-1 α , transkripční aktivace
HSP90	Zvýšení aktivity HIF-1 a afinity k DNA
NO	Zvýšení či snížení aktivity HIF-1
ROS	Stabilizace HIF-1 α
Ionty kovu	Stabilizace HIF-1 α , zvýšení aktivity HIF-1

1.3 Dimerizace HIF-1 α a HIF-1 β

Exprimované podjednotky HIF-1 α a HIF-1 β se setkají v jádře buňky a dochází k jejich dimerizaci. K tomu slouží již zmiňované helix-smyčka-helix domény obou podjednotek a obě jednotky (A a B) PAS domény, jež jsou lokalizované na N-terminálních koncích těchto podjednotek. Tyto oblasti, tvořené specifickými sekvencemi aminokyselin spolu interagují a tvoří funkční HIF-1. Dimerizací HIF-1 α a HIF-1 β podjednotek tedy dojde k vytvoření aktivního heterodimeru. Ten má však při vzniku velmi nízkou afinitu, tedy nízkou sílu vazby na DNA (Kallio a kol., 1997). Pro zvýšení afinity k DNA a navázání komplexu musí dojít ke změně konformace HIF-1 α podjednotky. Allosterickou změnu řídí hlavně HSP90 protein, který patří do rodiny tzv. heat shock proteinů (Semenza, 1999). Jejich exprese se zvyšuje v reakci na různé druhy buněčného stresu, jako je např. zvýšená teplota (tepelný šok), radiace nebo právě hypoxie. Tento protein se řadí mezi chaperony, což jsou proteiny, zajišťující mimo jiné správné skládání za účelem schopnosti translokace a interakce s jinými proteiny v jádře. Jelikož se tento protein pojí se stabilizovanou alfa podjednotkou a umožňuje navázání k DNA a genovou expresi, řadí se mezi pozitivní regulátory faktoru (Tabulka č. 1). Jeho inhibice by tedy znamenala snížení aktivity faktoru. Na konformační změně se dále podílí také C-terminální TAD doména ARNT podjednotky. Tato posttranslační modifikace zvyšuje afinitu k DNA a komplex je tak schopen se na molekulu napojit.

1.4 Vazba HIF-1 faktoru na DNA

HIF-1 faktor je nyní kompletní a je připraven se navázat na molekulu DNA. Využívá k tomu specifické sekvence aminokyselin o velikosti <100 párů bází, známé jako HREs, které se nacházejí v cis-regulačních oblastech cílových genů, citlivých na hypoxii. Tyto sekvence byly objeveny dříve než HIF-1 samotný. Jak uvedli Safran a Kaelin Jr. (2003), jejich součástí jsou

základní rozpoznávací sekvence 5'-RCGTG-3', kde R je purinová báze (adenin či guanin). Tyto tzv. HBS sekvence se nacházejí ve velkém žlábků DNA. Druhým typem sekvence jsou HAS, sloužící pro navázání dalších transkripčních faktorů (Lisy a Peet, 2008). Cis-regulační oblast je část DNA, nacházející se v blízkosti genu, jehož transkripci ovlivňuje. Zahrnuje různé cis-regulační elementy včetně enhancerů, silencerů a promotorové oblasti genů. Právě sekvence těchto oblastí jsou rozpoznávány základní doménou transkripčního faktoru za účelem navázání a regulace exprese cílových genů. Doména je bohatá na arginin a lysin, díky čemuž je schopna vazby. Do velkých žlábků HRE sekvencí vkládá alfa helixy, které se připojí pomocí vodíkových můstků či van der Waalových interakcí (Sadeghi a kol., 2020). HIF-1 takto ovlivňuje, ať už přímo či nepřímo, více než 100 genů (Weidemann a Johnson, 2008). Avšak pro úspěšnou genovou expresi není dostatečná vazba pouze jednoho HIF faktoru. Je vyžadována vazba více faktorů najednou, k čemuž slouží přítomnost více HIF vazebných míst s konzervovanými pentanukleotidovými sekvencemi v podobě tandemových repetitiv na promotoru (Gassmann a Wenger, 1997). Pro aktivaci transkripce genů je po navázání faktoru na DNA nezbytná vazba koaktivátorů p300 a CBP. Expresí cílových genů tak faktor usiluje o co nejrychlejší adaptaci na hypoxii, jelikož buňkám při těchto podmínkách hrozí nekróza nebo apoptóza.

1.5 Vliv HIF-1 faktoru na genovou expresi

Hypoxie může nastat vlivem různých fyziologických či patofyziologických podmínek. Mezi fyziologické patří například embryonální vývoj nebo již zmíněná adaptace na podmínky ve vysokých nadmořských výškách či v hlubokomořském prostředí. Patologickými příčinami jsou ischemická onemocnění (srdeční infarkt, mozková mrtvice) nebo nádorové bujení. V těle organismu se za účelem vyrovnání se s hypoxií a obnovení homeostázy odehrává řada systematických a lokálních změn (Wenger, 2002). Ty musí nastat rychle, jelikož nedostatek kyslíku v tkáních může vést k různým následkům a problémům. Hrozí poškození tkání, narušení funkce důležitých orgánů a v extrémních případech také smrt.

Kaluz a kol. (2008) uvedli, že existuje základní sada genů, které jsou vlivem hypoxie exprimovány konstantně. Pak jsou tu také geny, exprimovány specificky dle buněčného typu. Jejich indukce je podmíněna vzájemným působením HIF faktoru s dalšími transkripčními faktory. Celkový poměr genů, indukovaný faktorem se u člověka odhaduje až na 1–5 % z celého genomu. Těch, které jsou aktivovány skrze HREs je ale pouze kolem 70. Mezi nejvýznamnější geny patří například EPO, VEGF, transferin, GLUT1 nebo několik glykolytických enzymů. Funkcí proteinů, exprimovaných z těchto genů je zajištění základních metabolických a životních potřeb buněk při nedostatku kyslíku. Je třeba zvýšit účinnost přenosu kyslíku do míst sinku. Na buněčné úrovni dochází také k poklesu samotné konzumace kyslíku, jelikož buňka přechází na anaerobní výrobu ATP (Chun a kol., 2002). Expresie této široké škály genových produktů může být HIFem také potlačována (Manalo a kol., 2005). Pro přehlednost jsou tyto proteiny rozřazeny do skupin dle jejich hlavní funkce (Tabulka č. 3). V této kapitole budou probráni nejvýznamnější zástupci a jejich působení na organismus.

Tabulka č. 2: Negativní regulátory HIF-1 faktoru (Bárdos, I. J., Ashcroft, M. 2005, Cell Growth Regulation and Angiogenesis Laboratory, Cancer Research UK, upraveno Rydvalová).

Efektor	Funkce/následek
PHD enzymy pVHL	Prolyl hydroxylace HIF-1 α , připojení pVHL Označení HIF-1 α k degradaci, brání transkripční aktivaci
FIH-1	Hydroxylace asparaginyly HIF-1 α , brání p300 v navázání
CITED2/CITED4	Blokuje p300–HIF-1 α interakci, brání transkripční aktivaci
ARD1	Acetylace lysinu HIF-1 α , umožní interakci s pVHL
dnHIF-1 α	Postrádá ODD a transaktivační doménu, brání formaci HIF-1 komplexu
p53	Interakce s HIF-1 α , útlum transkripční aktivity
IPAS	Postrádá transaktivační doménu, snižuje míru genové exprese

1.5.1 Angiogeneze

Aby byly splněny metabolické nároky, vyžadují buňky, konkrétně hlavně rychle se množící nádorové buňky a buňky embryí, velké množství kyslíku (Weidemann a Johnson, 2008). To však při hypoxii není zcela možné. Zásobení tkání kyslíkem se stává neúměrným vzhledem k potřebám. Klíčovým procesem je v tomto případě angiogeneze neboli tvorba nových cév. Ta sestává ze 3 procesů, kterými jsou vaskulogeneze, angiogeneze a arteriogeneze. Vaskulogeneze je proces tvorby nových krevních cév z progenitorových buněk, přítomných v tkáních. Ty jsou konkrétním typem buněk kmenových a mají schopnost se diferencovat na buňky endotelové. Angiogeneze je pak tvorba nových cév z již existujících cév. Buňky se množí a migrují na místa potřeby, kde se shlukují do řetězců a tvoří nové kapiláry. Mohou také tvořit nové větve již existujících cév. Při arteriogenezi dochází k tvorbě nových arterií, jež jsou většího průměru a tvoří hlavní přívod okysličené krve. Proces angiogeneze je klíčový pro mnohé fyziologické procesy, jimiž jsou například hojení ran, regenerace tkáně či orgánů a embryogeneze. Jak uvedli Shi a Fang (2004), účastní se také patofyziologických procesů, jako jsou nádorová onemocnění či retinopatie (onemocnění sítnice).

Důležitým objevem bylo, že tento proces je podmíněn vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem A (VEGF-A). Exprese stejnojmenného genu, produkujícího tento protein, je vyvolána právě hypoxií (Semenza, 2002). Expresi genu reguluje konkrétně HIF-1 α , ale při reprodukci také například tumor nekrotizující faktor (TNF α), jenž je vytvářen makrofágy žlutého tělíska (Bezdiček, 2022). Samotný proces angiogeneze však vyžaduje i mnoho dalších genů a signálních molekul, k nimž patří například syntetáza oxidu dusného (NOS), uPAR, prolyl-4-

hydroxyláza a matrix metalloproteináza. Mnohé typy buněk prodělávají během tohoto procesu změnu. Transformovány jsou hlavně již stávající endotelové buňky, které tvoří stěnu cév. Ty přechází ze stabilního stavu, při kterém nerostou do proliferačního fenotypu. To obnáší také rozrušení bazální membrány a přestavbu extracelulární matrix, což umožní množícím se buňkám migrovat v rámci tkáně (Ziello a kol., 2007). Mezenchymální buňky se taktéž dělí a migrují do nových cév, kde dochází k jejich diferenciaci na pericyty, udržující integritu cévních stěn. Nárůst vaskulární hustoty pak snižuje vzdálenost, na kterou musí kyslík k buňkám difundovat. Samotný průtok okysličené krve je však regulován oxidem dusným či uhelnatým, endothelinem 1, adrenomedulinem či angiotensinem II (Eckhart a kol., 1997). Tyto látky mění vaskulární tonus, což je kontraktilní stav cév, který ovlivňuje průtok krve. Pokud se tonus zvýší, cévy jsou skrze hladkou svalovinu stahovány a průtok se snižuje. Tento proces se nazývá vasokonstrikce a krevní tlak při ní roste. Při poklesu tonusu se cévy naopak rozšiřují a průtok se zvyšuje. Takový proces se nazývá vasodilatace a krevní tlak se při něm snižuje. HIF faktor reguluje produkci molekul, podporujících vasodilataci za účelem zvýšení průtoku krve a intenzivnějšího zásobení tkání kyslíkem. Porozumění interakcím mezi angiogenezí a patofyziologickými procesy má klíčový význam pro vývoj nových léčebných strategií, a tak je jeho působení cílem mnoha výzkumů.

1.5.2 Erythropoéza

Dalším velmi významným procesem, indukovaným hypoxií a dále podporujícím zásobení tkání kyslíkem za účelem udržení homeostázy je erythropoéza. Zvyšuje celkovou kapacitu kyslíku, kterou je možné při průtoku okysličené krve k buňkám transportovat. K tomu slouží erytrocyty, což je typ krevních buněk, schopných přenosu kyslíku. Jejich součástí je protein hemoglobin, jež tvoří s kyslíkem komplex a přenáší ho po celém těle krevním oběhem. V místech potřeby je pak uvolňován a difunduje z krevních cév do tkání. Erythropoéza je proces produkce těchto červených krvinek a při hypoxických podmínkách dochází k jejímu zintenzivnění (Haase, 2013). Klíčovým proteinem, regulovaným vlivem HIF faktoru je v tomto případě glykoproteinový hormon erythropoetin (EPO). Ten je v případě dospělých jedinců produkován primárně v ledvinách specifickými REPC buňkami, jejichž počet při hypoxických podmínkách narůstá (Franke a kol., 2013). Tyto buňky jsou podobné fibroblastům a nacházejí se v kůře a vnější vrstvě dřeně ledvin. Při vývoji embrya jsou hlavním zdrojem erythropoetinu játra, která v reakci na nízké koncentrace kyslíku navyšují počet hepatocytů, produkujících EPO. Při hypoxických podmínkách se pak syntéza hormonu rapidně zvyšuje (Gassmann a Wenger, 1997). K tomu dochází působením HIF faktoru na odpovídající EPO gen. Díky analýze molekulárního mechanismu aktivace transkripce tohoto genu při hypoxii byl HIF-1 také poprvé objeven (Semenza, 1999).

Vyprodukovaný hormon se následně v podobě specifického, silně glykosylovaného séra dostává do krevního oběhu a je transportován do kostní dřeně, kde se váže na EPO-R receptor. Důležitá je také koncentrace železa v tomto séru, neboť při hypoxii se jeho potřeba v kostní dřeni zvýší (Haase, 2010). Kostní dřeň je obecně hematopoetickým orgánem, produkujícím

všechny typy krevních buněk. Je to měkká, gelovitá tkáň, nacházející se uvnitř dutých kostí, která se dále dělí na červenou hematopoetickou a žlutou s tukovými buňkami. EPO-R receptor je umístěn na erytroidních, progenitorových, hematopoetických buňkách a vlivem interakce s erythropoetinem a následnou fosforylací je spuštěna signální kaskáda. Ta svým působením zabrání těmto buňkám v apoptóze neboli řízené buněčné smrti. Tím umožní jejich zrání, proliferaci a diferenciaci na plně vyvinuté erythrocyty (červené krvinky). Zrání a diferenciaci červených krvinek zahrnuje několik stádií včetně odstranění jádra, jelikož plně zralé erythrocyty jsou bezjaderné. Erythropoéza probíhá primárně v kostním morku, ale v reakci na stres může tuto funkci dále zastat také slezina či játra (Franke a kol., 2013). Výzkum hypoxicky regulované erythropoézy by mohl mít potenciál v případě léčby anémie či chronické choroby ledvin (CKD).

1.5.3 Metabolismus glukózy

Za běžných podmínek normoxie je metabolismus glukózy závislý na přítomnosti kyslíku a je tak vysoce efektivní. Dochází ke vzniku produktů CO_2 a vody a je vyprodukováno velké množství energie, uložené v makroergických vazbách molekuly ATP. Samotná glukóza je v cytoplazmě přeměna na pyruvát, který je následně přenášen do mitochondrie, kde je dále rozkládán (Weidemann a Johnson, 2008). Tato katabolizace probíhá v rámci Krebsova cyklu, dýchacího řetězce a oxidační fosforylace (OXPHOS). Pokud však buňky trpí nedostatkem kyslíku, musí být stále schopné udržet energetickou homeostázu, čemuž musí svůj metabolismus náležitě přizpůsobit. Není totiž nadále možná úplná oxidace glukózy v mitochondriích vlivem nízké koncentrace kyslíku (Semenza, 2011).

Buňky tedy zvolí méně energeticky efektivní proces, jímž je anaerobní glykolýza, probíhající v cytoplazmě. Jak uvedli Kierans a Taylor (2021), oxidační fosforylace je tedy vlivem HIF faktoru potlačena, aby byla glykolýza plně podpořena. Výsledné množství molekul ATP, bohatých na energii je tak sice nižší, ale glykolýza může na druhou stranu probíhat daleko rychleji a nevyžaduje kyslík. To umožňuje buňkám pokračovat v produkci energie, což je důležité zejména pro buňky s vysokými energetickými nároky, jako např. buňky svalové během intenzivní aktivity. Během glykolýzy je také pomocí enzymu laktát dehydrogenázy regenerován kofaktor NAD^+ z jeho redukované formy, jejíž koncentrace v dýchacím řetězci vlivem hypoxie narůstá. NAD^+ je totiž pro glykolytickou aktivitu zcela zásadní (Kierans a Taylor, 2021). Avšak během glykolýzy dochází k hojně produkci vedlejšího produktu, kterým je laktát. Laktát se hromadí v buňkách a tkáních a způsobuje acidózu, tedy pokles pH, jež může mít škodlivé účinky. Tento proces popsal již v roce 1861 Louis Pasteur. Glykolýzu využívá jako způsob produkce energie pro svůj růst také většina nádorových buněk, a to i při dostatku kyslíku. Tento jev se nazývá Warburgův efekt a je využíván i některými běžnými, dělicími se buňkami za účelem minimalizace oxidačního stresu (Čerychová a Pavlínková, 2018).

Je to právě HIF-1 α podjednotka, jež je zodpovědná za regulaci enzymů, řídících tuto metabolickou změnu. Mezi glykolytické enzymy patří například aldoláza A a C, enoláza 1, fosfofruktokináza L, fosfoglycerát kináza-1 a laktát dehydrogenáza A. HIF faktor ovlivňuje

expresi genů, kódujících tyto enzymy a glukózové transportéry GLUT1 a GLUT3, umístěné v rámci membrány buněk. Transportéry pak zajišťují nárůst koncentrace glukózy v cytoplazmě její difuzí (Lee a kol., 2004). Glukóza může být přenášena dále také aktivně pomocí sodíko-glukózových transportních přenašečů (SGLT). Kromě enzymů ovlivňuje HIF-1 α také mitochondriální respiraci. Zvyšuje totiž expresi PDK, jež skrze fosforylaci blokuje funkci pyruvát dehydrogenázového komplexu, a tudíž není pyruvát přeměňován na acetylCoA (Bezdiček, 2022). Tím je mu zabráněno v iniciaci a vstupu do Krebsova neboli trikarboxylového cyklu, což vede k celkovému poklesu spotřeby kyslíku mitochondriemi (Ziello a kol., 2007). Jelikož elektronový transfer v následném dýchacím řetězci není zcela účinný, dochází v každé jeho fázi k úniku elektronů. Konečným příjemcem těchto elektronů je kyslík (Kaluz a kol., 2008). Volné elektrony redukují molekuly kyslíku na superoxidové anionty, které jsou vysoce reaktivními radikály. Ty se následně mohou spojit s dalšími reaktivními látkami, kterými jsou například oxidy. Vznikají tak oxidanty s vyšší reaktivitou, jako je peroxid vodíku. Ten je schopen poškodit jiné molekuly jako jsou lipidy, proteiny či nukleové kyseliny, čímž narušuje funkci buněk. Změna způsobu produkce energie je tak jakousi dvousečnou zbraní a hladina kyslíku musí být velice důkladně regulována za účelem udržení celkové homeostázy organismu.

1.5.4 Metabolismus železa

HIF faktor ovlivňuje také metabolismus železa, jelikož jak bylo již zmíněno v kapitole Erytropoéza, koncentrace železa je v tomto procesu kriticky významná. Působením faktoru na specifický receptor dochází k nárůstu exprese transferrinu (Lee a kol., 2004). Transferrin je protein, jenž je zodpovědný za přenos železa v krevním řečišti. Koná tak za účelem dodání železa do míst potřeby, jako je například kostní dřev, kde probíhá tvorba hemoglobinu v erytrocytech při erytropoéze. Každá molekula hemoglobinu se totiž skládá ze čtyř podjednotek, z nichž každá obsahuje jeden atom železa, nezbytný pro navázání kyslíku. Železo je transportováno ve formě komplexu nazývaného holotransferrin. Ten vzniká spojením dvou molekul transferrinu s jednou molekulou železa. Nicméně jak uvedl Wenger (2002), aby byla vazba umožněna, musí být železo ve své trojmocné formě (Fe³⁺). K tomu slouží enzym ceruloplasmin neboli ferroxidáza, jejíž množství v krvi je ovlivňováno opět transkripčním faktorem. Ten svým působením na CP gen jeho koncentraci zvyšuje, čímž dochází k oxidaci železa a je umožněno jeho navázání na transferrin. Komplex se následně váže na specifické receptory (TfR1), nacházející se na povrchu cílových buněk v erytroidní tkáni. Železo je uvolněno a náležitě využito.

Aby bylo možné transportovat železo do kostní dřevě za účelem jeho užití při tvorbě nových erytrocytů, musí být jeho hladina v krvi dostatečná. Množství železa je ovlivňováno absorpcí z přijímané potravy ve střevech, recyklací železa z již fagocytovaných erytrocytů či uvolněním zásob železa z určitých orgánů, jako jsou například játra. Když je při hypoxii stimulována erytropoéza, absorpce železa ve střevech zintenzivní a jsou mobilizovány vnitřní zásoby. Z enterocytů, tedy buněk střev je železo následně vypuštěno do krevního oběhu pomocí

ferroportinu (Haase, 2010). Pro proces získání železa z vadných fagocytovaných erytrocytů, při němž je získávána většina železa pro erythropoézu, je klíčový enzym hem oxygenáza-1 (Lee a kol., 1997). Pohyby železa v těle, regulované HIF-1 faktorem, jsou tak dalším procesem, který přispívá k celkové a účinné adaptaci organismu na hypoxické podmínky.

Tabulka č. 3: Cílové geny transkripčně aktivovány HIF faktorem (Lee a kol., 2004, Seoul National University, upraveno Rydvalová).

Funkce	Cílové geny
Buněčné dělení	Cyklin G2, IGF2, IGF-BP-1, IGF-BP-2, IGF-BP-3, WAF-1
Přežití buněk	ADM, EPO, VEGF, TGF- α , IGF2, NOS2, IGF-BP-1
Apoptóza	NIP3, NIX, RTP801
Erythropoéza	EPO
Angiogeneze	VEGF, EG-VEGF, ENG, LEP, LRP1, TGF- β 3
pH regulace	Karbonická anhydráza 9
Metabolismus železa	Transferrin, Ceruloplasmin, Transferrinový receptor
Metabolismus glukózy	HK1, HK2, ENO1, GLUT1, GAPDH, ALDA, ALDC, TPI, PKM, PGK1, PFKL, LDHA, PFKBF3

1.5.5 Proliferace a přežití buněk

Působením hypoxie dochází k poklesu proliferace a nárůstu apoptózy buněk (Carmeliet a kol., 1998). Proliferace je proces množení a dělení buněk, kterým jsou vytvářeny buňky nové. Je klíčový pro růst a vývoj tkání a orgánů, regeneraci poškozených tkání, opravy DNA či produkci velkého množství imunitních buněk, sloužících k obraně proti infekci. Nedostatek kyslíku vede k inhibici buněčného cyklu a zastavení buněk v určité fázi dělení. Mezi buňky, jejichž schopnost proliferace je vlivem hypoxie potlačena patří například embryonální fibroblasty, embryonální kmenové buňky, lymfocyty, keratinocyty a hematopoetické kmenové buňky (Hubbi a Semenza, 2015). Přerušení proliferace buněk má na organismus a procesy v něm probíhající rozsáhlé účinky.

HIF faktor v tomto případě ovlivňuje růstové faktory, které proliferaci buněk podporují (Lee a kol., 2004). Buňky jsou tak schopné buněčný cyklus a svou funkci opět obnovit. Působením na cílové geny dochází k expresi konkrétních růstových faktorů, jako jsou insulin-like růstový faktor-2 (IGF2) a transformující růstový faktor (TGF- α). Faktory pak skrze vazbu na příbuzné receptory IGFIR a EGFR aktivují signální dráhy, vedoucí k expresi HIF-1 α podjednotky a k aktivaci dělení a přežití buněk (Semenza, 2003). Přežití buněk je zajištěno obnovením jejich dělení, ale také blokadou řízené buněčné smrti neboli apoptózy, která by mohla vlivem stresoru nastat. Existují ale také buněčné populace, jejichž intenzita dělení se během hypoxie nemění. Nejtypičtějším příkladem jsou rakovinné buňky nebo některé populace buněk kmenových. Dělení buněk také vyžaduje velké množství živin a adekvátní metabolické procesy. HIF faktor toto zajišťuje expresí cílových genů, které řídí příjem glukózy do buněk a ovlivňují mTOR

signální dráhu, jenž reguluje skrze syntézu proteinů nutriční stav (Brahimi-Horn a Pouyssegur, 2009). Svým vlivem tak transkripční faktor dále přispívá k adaptaci organismu na bezkyslíkaté podmínky.

2 Účast HIF-1 faktoru na fyziologických a patofyziologických procesech

Regulací buněčné odpovědi na nedostatek kyslíku se HIF-1 faktor podílí na mnoha důležitých fyziologických procesech, které se v organismu odehrávají. Tím tak umožňuje jejich správný průběh a funkci daných soustav. Existují ale také tělu méně prospěšné procesy, na něž má transkripční faktor značný vliv. Těmi jsou změny a poruchy fyziologických funkcí organismu, vedoucí k nemoci. V této kapitole se rolí HIF faktoru v patofyziologii, ale i ve zcela běžných fyziologických a vývojových procesech budu zabývat.

2.1 Fyziologické procesy

Deficit kyslíku v tkáních vede k narušení potřebných buněčných funkcí (Lim a kol., 2021). Některá místa v těle jsou však schopna plně fungovat i v tak extrémním fyziologickém stavu, jako je hypoxie, a tudíž i nízký parciální tlak kyslíku. V těchto oblastech, kde je koncentrace kyslíku nižší než 6 % dochází ke zvýšené produkci transkripčního faktoru HIF, který orgánům a soustavám umožňuje správně pracovat. Takovými oblastmi jsou například okolí kmenových buněk, části reprodukční soustavy či trávicí trakt, kde hladina kyslíku kolísá. Některé buňky takto konají cíleně, což vychází ze strategie, že v prostředí bohatém na kyslík vznikají volné radikály, schopné poškodit DNA buněk (Bezdiček, 2022). Tomu se buňky chtějí vyhnout. Přestože je tedy v jejich okolí kyslíku dostatek, volí pro výrobu energie anaerobní způsob. V následujících kapitolách se budu procesům, probíhajícím v těchto oblastech dále věnovat.

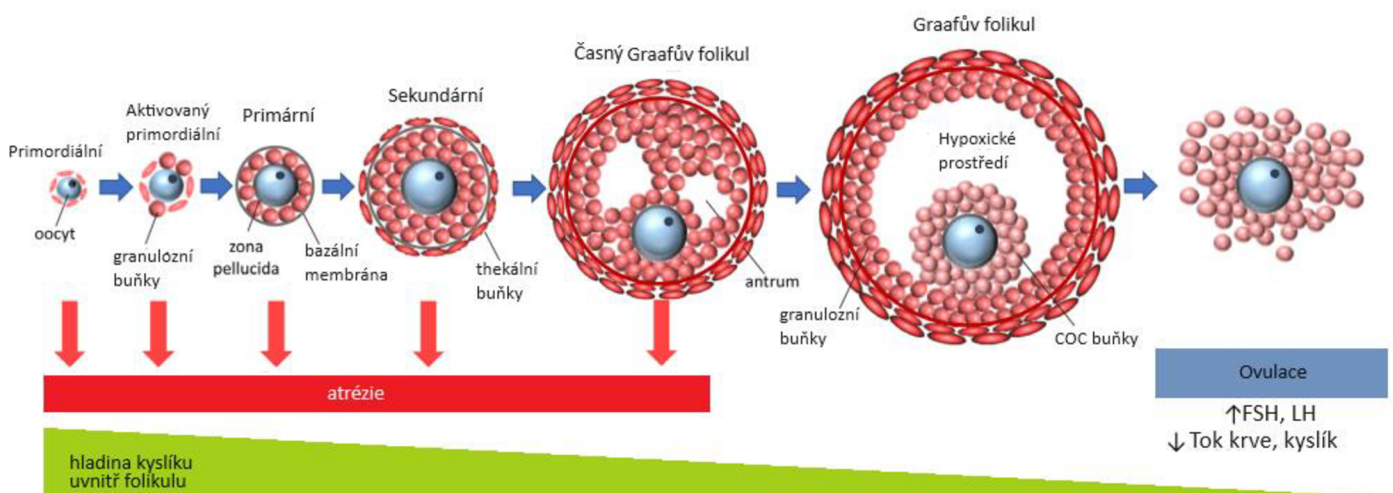
2.1.1 HIF-1 faktor a reprodukce

Reprodukce je komplexní proces, zahrnující řadu buněčných mechanismů, které jsou pro úspěšné početí, těhotenství a následný vývoj potomků zcela nezbytné. Tento řetězec událostí, který zahrnuje ovulaci, oplození, implantaci embrya a vývoj plodu vyžaduje přesnou regulaci. Právě HIF-1 faktor je jedním z klíčových regulátorů těchto procesů. Hraje roli při adaptaci buněk a tkání na hypoxické prostředí, jelikož během reprodukčního procesu dochází v působení kyslíku k dramatickým změnám. Hypoxickým prostředím je například folikulární tekutina ve folikulu, děloha během vývoje embrya či placenta.

2.1.1.1 Folikulogeneze

Folikulogeneze je jedním z prvních procesů v reprodukci, jenž se z části odehrává v podmínkách s nízkou hladinou kyslíku. Je to velice složitý proces, který zahrnuje mnoho stádií (Obrázek č. 3). Tvorba a vývoj vajíčka se odehrává v mikroprostředí folikulu, vyplněném folikulární tekutinou. Ta je produkována okolními granulárními buňkami a poskytuje živiny, minerály a další důležité látky pro růst oocyty, který se ve folikulu nachází. Tekutina je během zrání folikulu v pozdějších stádiích chudá na kyslík, jelikož je zásobena pouze difuzí z okolních tkání. Vajíčko totiž nemá vlastní cévní zásobení, jelikož je během vývoje folikulu vytvořeno tzv.

avaskulární prostor. Ve fázi Graafova folikulu je COC oddělen od granulozních buněk antrem a od thékálních buněk a cévního zásobení bazální membránou. Folikuly jsou však na fungování v takovém prostředí dobře přizpůsobeny a hypoxie hraje v pozdějších fázích folikulogeneze významnou roli. Většina hormonů, které řídí folikulogenezi, zrání oocytů i ovulaci jsou hypoxií nepřímo stimulovány. Mezi tyto hormony patří luteinizační hormon (LH), folikuly-stimulující hormon (FSH), estradiol či progesteron (Lim a kol., 2021). I přesto je však během období růstu nutná přítomnost kyslíku uvnitř folikulu, jelikož oocyt provádí výrobu ATP oxidační fosforylací. Tímto způsobem produkuje energii potřebnou k růstu. Vyhodnocení přítomnosti nebo nepřítomnosti kyslíku zabezpečuje HIF-1 faktor, jenž působí na cílové geny, čímž aktivuje například již zmíněnou angiogenezi skrze stimulaci VEGF genu. Tím dojde ke zvýšení průtoku krve, díky čemuž je k folikulu přiváděno větší množství LH. Tvorba nových cév a působení faktoru jsou tak významné hlavně během utváření žlutého tělíska (CL). Jak již bylo dříve zmíněno, VEGF je aktivován také tumor nekrotizujícím faktorem (TNF α), produkovaným makrofágy CL (Bezdiček, 2022). Vzhledem k tomu, že je HIF-1 schopen podněcovat i apoptózu, je důležitou součástí také při degradaci CL. Poté, co dochází ke zvýšení hladiny kyslíku pro účely metabolismu, aktivita HIFu poklesne (Thompson a kol., 2015). Konkrétně HIF-1 α podjednotka je produkována granulozními buňkami folikulu u řady savců včetně člověka. Experimenty, prováděné na těchto buňkách u laboratorních krys (*Rattus norvegicus domestica*, Berkenhout 1769) ukázaly, že exprese podjednotky je aktivována nárůstem gonadotropinů. Ten se odehrává hlavně během ovulace a luteální fáze (Alam a kol., 2004). Alfa podjednotka tak aktivuje buněčné dělení granulozních buněk folikulu a produkci steroidních hormonů, což jsou procesy pro ovulaci klíčové. Stav hypoxie ve vaječnicích je dnes předmětem mnoha výzkumů, jelikož by mohla být navozením tohoto stavu v *in vitro* podmínkách zvýšena úspěšnost IVM během asistované reprodukce. Takový proces je často využíván u žen s PCOS.



Obrázek č. 3: Vývoj ovariálního folikulu (Lim a kol., 2021, The University of Adelaide, upraveno Rydvalová).

Na obrázku č. 3 můžeme pozorovat ovariální cyklus a jeho jednotlivé fáze. Dochází k přechodu z preantrálního (na gonadotropinu nezávislého) růstu na antrální (na gonadotropinu závislé) zrání. Během toho je oocyt antrem oddělen od cévního zásobení, což vede k poklesu hladiny

kyslíku uvnitř folikulu. S růstem folikulu tak koncentrace kyslíku uvnitř klesá. Během ovulace je snížen také průtok krve, čímž dále klesá zásobení kumulárních buněk kyslíkem. V počátečních stádiích vývoje folikulu může také dojít k zániku folikulu neboli atrézii.

2.1.1.2 Embryogeneze

Po úspěšném oplození (vzniku zygoty) a následné implantaci v děloze počíná období gravidity. Tím je také nastartován proces embryogeneze. Během té se zygota mitoticky dělí, prochází mnoha vývojovými stádii a postupně se diferencuje na tři zárodečné listy: ektoderm, entoderm a mezoderm. Ty slouží jako základ pro organogenezi a utváření nového jedince. Jak již bylo zjištěno pomocí měření hladiny kyslíku uvnitř dělohy a placenty, embryo je již od raného vývoje vystavováno hypoxii (Čerychová a Pavlínková, 2018). Buňky trofoblastu totiž postupně uzavírají vývody spirálních tepen, což např. u člověka redukuje koncentraci kyslíku na $\approx 2,5$ %. Proto je pro výrobu energie využita glykolýza. Nízká koncentrace kyslíku je tak přesně kontrolována pomocí HIF-1 α , díky čemuž je minimalizována produkce volných radikálů, jež by mohly embryo a jeho DNA poškodit. Jak uvádí Bezdíček (2022), obě podjednotky transkripčního faktoru jsou během hypoxie hojně produkovány syncytiotrofoblastem a cytotrofoblastem. Bylo také prokázáno, že v hypoxickém prostředí vznikají kvalitnější blastocysty než při běžné normoxii. Dochází k intenzivní proliferaci buněk a vlivem alfa podjednotky na VEGF je spuštěna angiogeneze za účelem splnění metabolických nároků. Embryo je díky tomu zásobeno novými cévami. Ty vznikají složitým procesem, který začíná diferenciací hemangioblastů na hematopoetické kmenové buňky a prekurzory buněk endotheliálních (ECs). Prekurzory pak formují primitivní cévní síť uvnitř embrya a žloutkového vaku (Hickey a Simon, 2006). Cílená inaktivace HIF-1 α či β u myši pak vede k vyšší úmrtnosti embrya, jelikož ani u žloutkového vaku ani u embrya nedochází k dostatečné vaskularizaci (Weidemann a Johnson, 2008). Během embryogeneze je dále také vlivem produkce EPO stimulována erythropoéza. Z hematopoetických kmenových buněk se formují zralé erytrocyty, čímž je vytvořen efektivní hematopoetický systém. Hlavním zdrojem hormonu jsou během tohoto procesu játra (Franke a kol., 2013). Pokud však není hypoxie způsobena fyziologicky, nýbrž vnějšími vlivy či z důvodu kardiovaskulárních poruch, může mít tato situace na zárodek vážné dopady. Projeví se pak především nízkou porodní vahou či poruchami srdce. V pozdější fázi vývoje embryo získává energii skrze oxidační fosforylaci (Holland a kol., 2017). Spotřeba kyslíku tak s dosažením vývojového stádia blastocysty roste, jelikož jsou spirální arterie odblokovány a přetransformovány pomocí VEGF či placentálního růstového faktoru. Přítomnost HIFu naopak klesá.

Podpůrným orgánem pro vyvíjející se embryo je již od jeho uchycení v děloze placenta. Ta se tvoří v rámci shodných hypoxických podmínek a hladina kyslíku ji též významně ovlivňuje. Placenta je zásobena dvěma přítoky krve. Prvním je zásobení ze strany matky prostřednictvím spirálních arterií, jimiž je přiváděn kyslík a živiny. Druhé zásobení probíhá skrze pupečník ze strany plodu. Tím je přiváděna již odkysličená krev a odpadní látky zpět do placenty. Uvnitř placenty se pak pupečnickové tepny větví do drobných cév, které zajišťují výměnu plynů, živin

a odpadních látek mezi matčinou a plodovou krví. Koncentrace kyslíku v tkáni placenty se během těhotenství mění a koresponduje s vývojovými stádii embrya a fetu. Těhotenství lze tak dle hladiny kyslíku rozdělit na dvě fáze, jimiž jsou první trimestr, trvající zhruba do 12. týdne a druhý a třetí trimestr. Během první fáze není placenta krví matky téměř vůbec zásobena. Prostor je vyplněn pouze čirou tekutinou, kterou tvoří matčina plazma a sekret endometriálních žláz (Burton a kol., 2021). Během této fáze převládají hypoxické podmínky. Dochází tak k aktivaci HIF faktoru, který reguluje buněčný metabolismus a zabraňuje působení hypoxického stresu na placentu tím, že stimuluje angiogenezi. Druhá fáze se vzhledem k počátku cirkulace krve u lidí vyznačuje výrazným nárůstem koncentrace kyslíku a parciálního tlaku až na 8 %. HIF-1 faktor je tak klíčovým pro formaci důležitých fyziologických systémů během embryogeneze a opět představuje hlavní regulátor homeostázy kyslíku v tomto prostředí (Semenza, 1998).

2.1.2 HIF-1 faktor a trávicí soustava

Trávicí trakt je jedním z dalších míst v těle organismu, kde působí hypoxické podmínky, a tudíž také HIF faktor, který tyto podmínky reguluje. Samotný trakt je tvořen několika vrstvami. Mezi ně patří vnitřní vrstva sliznice, podslizniční vazivo, hladká svalovina pro pohyb potravy a serózní membrána. Tato velmi složitá stavba a rozsáhlý povrch mu umožňuje plnit jeho hlavní funkce. Těmi jsou rozklad a vstřebávání živin a odchod odpadních látek.

Hypoxie v trávicím systému ovlivňuje mnoho fyziologických stavů. Hladina kyslíku klesá s postupným průchodem skrze trakt a liší se také v jednotlivých vrstvách. Můžeme tedy pozorovat negativní gradient kyslíku. Uvnitř žaludku se hodnota tlaku, tvořeného kyslíkem pohybuje v rozmezí od 6 % do 10 %, v tenkém střevě pak od 2 % do 5 % a v tlustém střevě od 0 % do 2 %. Vůbec nejméně kyslíku je pak v konečniku, kde parciální tlak kyslíku dosahuje pouze 10 mmHg (Zheng a kol., 2015). Mezi jednotlivými vrstvami od slizničního vaziva, bohatého na kyslík po anoxický lumen střeva lze rovněž pozorovat negativní gradient kyslíku. Ten je vzhledem k tomu, že je sliznice, nacházející se v blízkosti lumenu bohatě zásobená cévami značně strmý. Zásobení tkání kyslíkem se však vzhledem k různé dynamice příjmu potravy a tím také průtoku krve mění (Taylor, 2007). Průtok krve narůstá v reakci na příjem potravy a během hladovění pomalu klesá. Tím pádem kolísá také přívod kyslíku do tkání, a tak musí být buňky schopné se těmito nestálými podmínkami rychle přizpůsobit. Buňky jsou kryté ochrannou mukózní vrstvou, obsahující antimikrobiálními peptidy, jímž je například β -defensin-1. Mezi buňky traktu patří enterocyty, Panethovy buňky, pohárkové buňky či endocyty. Ty mají vlastní specifické funkce a dohromady se označují jako IECs. Schopnost adaptace těchto buněk umožňuje HIF-1 α , jež je díky hypoxickým podmínkám stabilizována a reguluje mnohé buněčné funkce. Jednou z nejdůležitějších funkcí je pro celkovou homeostázu střev udržování integrity intestinální bariéry epitelu (IEB). Bariéra je v kontaktu s živinami a bakteriemi, které zajišťují jejich rozklad. Jejím úkolem je zajistit propustnost pro látky tělu prospěšné a chránit vnitřní tkáň před průnikem nežádoucích mikrobů a toxinů. Alfa podjednotka svým vlivem na expresi cílového genu indukuje tvorbu claudinu-1. Tento protein

řídí komunikaci mezi sousedními buňkami a membránovými proteiny, tudíž má vliv na strukturu a funkci bariéry. Pro obnovu integrity IEB je dále nutná také autofagie, jejíž aktivita je vlivem HIF-1 α na cílové geny zvyšována. Jak uvedli Manresa a Taylor (2017), dysfunkce IEB vede k idiopatickým střevním zánětům. Regulací integrin-dependentních signálních drah či zvýšením exprese ITF, jež se vyskytuje v blízkosti poraněných tkání, podporuje HIF-1 α hojení ran (Di Mattia a kol., 2024). Dále také reguluje glykolytické geny, které podporují anaerobní produkci ATP a tím také adaptaci na kyslíkovou deprivaci. HIF-1 α hraje klíčovou roli také při ochraně střev před patogeny, jelikož stimuluje expresi již zmíněného β -defensinu-1, obsaženého v mukózní vrstvě.

Hypoxické podmínky také vyhovují řadě anaerobních bakterií, tvořících střevní mikrobiom. Jejich výskyt uvnitř střev je umožněn specifickým slizničním imunitním systémem, jež rozpozná neškodné antigeny a bakterie od škodlivých patogenů (Di Mattia a kol., 2024). Na řízení imunitních odpovědí se podílí také HIF faktor, jelikož je exprimován uvnitř imunitních buněk a ovlivňuje jejich funkci. Mikroorganismy v trávicím traktu jsou pro jejich hostitele velkým přínosem, jelikož se podílejí na správném chodu metabolismu, trávení, příjmu vitamínů či na obnově a hojení střev. Dále přeměňují vlákninu a škrob na SCFA, které skrze stimulaci PDK inaktivují pyruvát dehydrogenázový komplex. Nedochází tedy k přeměně pyruvátu na acetyl-CoA a tak je β -oxidací produkována SCFA. Tím je zvýšena oxidační respirace a dále posílena hypoxie, což vede ke stabilizaci alfa podjednotky. Tomu napomáhá také schopnost mikroorganismů produkovat siderofory, které vážou železo a činí ho tak nedostupným pro PHDs, které ho vyžadují jako kofaktor během degradace podjednotky (Golonka a kol., 2019). Ovlivňují ale také hladinu kyslíku. Některé druhy dále snižují koncentraci kyslíku jeho konzumací, čímž tvoří perfektní prostředí pro striktně anaerobní druhy, jímž je například *Bifidobacteria*. Zvláště tlusté střevo je tak těchto anaerobních druhů plné. Obecně se výskyt druhů mikroorganismů liší napříč traktem vzhledem k různé hladině kyslíku. Uvnitř střeva jsou mikroorganismy stratifikovány tak, že blízko okysličeného epitelu se uchylují aerobní druhy a ve středu anoxického lumenu anaerobní druhy. Bakterie produkcí metabolitů, jež zvyšují spotřebu kyslíku v epitelu, dále udržují v traktu hypoxické podmínky (Kelly a kol., 2015). Tím ho chrání před poškozením vlivem ROS. Za účelem předejití poškození střev je tedy potřeba dále prozkoumat korelaci mezi hypoxií a dysbiózou a vliv následků na celkovou homeostázu střev.

2.1.3 HIF-1 faktor a kmenové buňky

Kmenové buňky jsou jedinečné ve své schopnosti diferenciaci. Z nerozlišeného stavu se dokážou přeměnit na různé buněčné typy v těle, jimiž jsou například buňky nervové, svalové, kožní či krevní. Tato vlastnost tzv. pluripotence je tak důležitá pro obnovu poškozených či opotřebovaných tkání, čímž se buňky podílejí na celkové homeostáze. Využívají se proto pro léčbu nejrůznějších nemocí a vad. Dále podstupují mnohočetná mitotická dělení, což jim poskytuje regenerační schopnost. Metabolismus kmenových buněk se v průběhu jejich života mění v závislosti na podmínkách mikroprostředí, ve kterém se vyskytují. HIF-1 faktor je jeho

hlavním regulátorem. V raných stádiích vývoje, kdy mají buňky vysokou regenerační schopnost, je metabolismus zaměřen na udržení jejich nevyvinutého stavu a podporu rychlé proliferace. V takovém případě dochází vlivem HIF faktoru k výrobě ATP anaerobní glykolýzou, jež poskytuje potřebnou energii pro rychlý buněčný růst. Při diferenciaci buněk na specifické buněčné typy se jejich metabolismus mění na oxidační. Tyto buňky dovedou jako jedny z mála existovat ve velmi nízkých až nulových hodnotách parciálního tlaku kyslíku. Je to právě z toho důvodu, že v dýchacím řetězci vznikají reaktivní formy kyslíku, jako je například peroxid vodíku. Ty by mohly vážně poškodit DNA buněk (Bezdiček, 2022). Stav hypoxie je tedy pro kmenové buňky velkým benefitem. Je klíčový pro udržování jejich populací a je schopen navodit buněčné dělení. Jedním z prvních typů, na kterém byl studován vliv parciálního tlaku kyslíku, jsou hematopoetické kmenové buňky (HSCs), nacházející se v kostní dřeni. Ty jsou zodpovědné za tvorbu nových krevních buněk. V kostní dřeni byla naměřena velmi nízká koncentrace kyslíku zhruba od 1 % do 2 %. Bylo zjištěno, že kultivace v *in vitro* prostředí s nízkou hladinou kyslíku skutečně vede ke zvýšené proliferaci buněk (Ma a kol., 2009). Takové výsledky byly potvrzeny také u hematopoetických prekurzorových buněk embryí a jejich žloutkových vaků. V odpovědi na hypoxické podmínky jsou pak buňky schopné se zařadit do vnitřku cévní struktury a produkovat angiogenetické růstové faktory. HSCs jsou také i společně s některými dalšími druhy kmenových buněk schopny během hypoxie zvýšit expresi VEGF. Těmi jsou dále například adipocytární kmenové buňky, vyskytující se v tukové tkáni. Také mezenchymální kmenové buňky, na něž působily hypoxické podmínky, vykazovaly po transplantaci vyšší míru přežití a terapeutický potenciál než buňky kultivované v normoxických podmínkách (Lee a kol., 2019). HIF faktor působí v některých z těchto účinků hypoxie na kmenové buňky jako regulátor. Kmenové buňky se totiž musí přizpůsobovat hypoxickým podmínkám, aby přežily a udržely si svou schopnost pluripotence. HIF-1 α působí například také jako řídicí jednotka buněčného cyklu kmenových buněk. Reguluje totiž expresi genů, kontrolujících vstup a výstup z klidové fáze buněčného cyklu, což vede ke změnám v aktivaci k proliferaci (Hubbi a Semenza, 2015). Dále HIF faktor podporuje v klíčových situacích rychlejší proliferaci, což vede k rychlé regeneraci a hojení ran. Současně má také vliv na diferenciaci, čímž ovlivňuje, jaké typy buněk se vytvoří. V neposlední řadě ovlivňuje také interakci kmenových buněk s jejich mikroprostředím. Moduluje totiž signální dráhy, ovlivňující komunikaci mezi nimi a okolními buňkami a tkáněmi.

2.2 Patofyziologické procesy

Přestože je tato práce zaměřená primárně na uplatnění HIF faktoru ve fyziologii, jeho potenciál v patofyziologických procesech mi nedovolil tuto kapitolu vynechat. Stav hypoxie je totiž charakteristický také pro mnohá onemocnění. Nedostatek kyslíku může být v těchto případech způsoben nedostatečným cévním zásobením či poruchami tohoto cévního systému (Brahimi-Horn a Pouyssegur, 2009). Dále může být způsoben také nízkou oxygenací krve (Safran a Kaelin Jr., 2003). Hypoxie může mít buď krátké či dlouhé trvání. Při krátkém hovoříme o tzv. akutní hypoxii, která nastává například při ischemických poruchách. Při dlouhém hovoříme o

tzv. chronické hypoxii, jež působí během rakoviny. V těchto podmínkách je klíčovou molekulou HIF-1 faktor, který je aktivován v odpovědi na nedostatek kyslíku. Ovlivňuje širokou škálu patofyziologických procesů, které se uplatňují v různých chorobách. Reguluje totiž buněčné procesy a geny, které jsou esenciální pro přežití a funkci buněk v hypoxii. Tyto procesy mohou zahrnovat změny v krevním oběhu, energetickém metabolismu buněk, progresi nádorů, imunitní odpovědi či reakci na ischemické poškození. Porozumění úloze faktoru v těchto procesech je klíčové pro léčbu a prevenci onemocnění, spojených s úbytkem kyslíku. V této kapitole se zaměřím na hlavní představitele těchto onemocnění, mezi něž patří například rakovina a ischemické choroby srdce či mozku (Semenza, 2000). Patří totiž mezi jedny z nejběžnějších příčin úmrtí v dnešním světě.

2.2.1 HIF-1 faktor a rakovina

Rakovina je nádorové onemocnění, jež je v současné době jedním z nejčastějších příčin úmrtí po celém světě (Gassmann a Wenger, 1997). Nádorové bujení může být v některých případech i zcela neškodné. Rakovina však produkuje hlavně zhoubné neboli maligní nádory. Dle buněčného původu se rakovina skládá hned z několika doprovodných chorob, které mají společný rys nekontrolovatelného růstu a šíření abnormálních buněk v těle (Brahimi-Horn a kol., 2007). Běžně se totiž buňky dělí a umírají v určeném cyklu, aby nahradily buňky staré či poškozené. U rakoviny však tento proces kontroly selže a dochází k hyperproliferaci buněk na úkor okolní tkáně. Hyperproliferace je totiž často spojena s aktivací signálních drah a genetických i epigenetických změn. Ty zahrnují nadměrnou aktivaci onkogenů, inhibici tumor-supresorových genů či mutace genů, jež jsou zapojeny do regulace buněčného cyklu. Rakovinné buňky mohou také pronikat do okolních tkání, narušovat jejich strukturu a vytvářet invazivní léze. Tento proces může mít katastrofální důsledky v případě, že buňky proniknou do krevního řečiště a lymfatických cév. Mohou se pak dále šířit i do vzdálenějších orgánů a způsobit tzv. metastázy. Metastázy jsou nově vzniklé nádory a jsou často spojeny s horší prognózou a obtížnější léčbou. Rakovina postihuje převážně jedince staršího věku, ačkoliv některé druhy rakoviny se vyskytují i u mladých jedinců.

V mikroprostředí nádoru působí hypoxické podmínky, jež mají pozitivní vliv na progresi nádoru. Mezi konkrétní buněčné reakce, podporující progresi patří přežití buněk, proliferace, angiogeneze, rezistence, EMT či metastáze. EMT je proces, během kterého se těsně propojené buňky epitelu transformují do buněk mezenchymu, které mají volnější strukturu a větší schopnost migrace a invaze. Hypoxie je způsobená zvýšenou spotřebou kyslíku a zároveň narušením jeho dodávky. Nově vzniklé buňky totiž vytvářejí poptávku po kyslíku, která přesahuje schopnost cév dodat ho v dostatečném množství (Chen a kol., 2020). Masa buněk, vzniklá hyperproliferací dále oddaluje buňky od cévního systému, což vede k nedostatečnému zásobení prostředí živinami a kyslíkem. Nádory totiž rostou rychleji než samotné cévy. Proto existuje uvnitř tumoru gradient kyslíku, jelikož jeho dostupnost klesá s rostoucí vzdáleností od nejbližších cév. Nádory pak mohou ve svém středu obsahovat také nekrotické oblasti. Jsou to místa, která jsou od zdroje nejvzdálenější a vlivem nedostatku kyslíku a živin odumírají.

Hypoxie byla prokázána například měřením parciálního kyslíku v nádorech při rakovině prsu. Hodnoty dosahovaly <2,5 mmHg na rozdíl od hodnot 65 mmHg v běžné prsní tkáni (Semenza, 2014).

Vlivem hypoxie dochází ke stabilizaci HIF faktoru, který buňkám skrze transaktivaci cílových genů pomáhá v adaptaci na hypoxické podmínky. Vůbec nejvyšší jsou hladiny HIF faktoru v žijících buňkách, které jsou nejvzdálenější od cévního systému. Aktivita HIF faktoru je kromě hypoxie indukována také skrze aktivaci onkogenů, které zvýší expresi HIF-1 α působením na mTOR signální dráhu. To vede k nárůstu translace HIF-1 α mRNA do proteinové podoby. Aktivita HIF faktor je tedy zvyšována jak fyziologicky, tak epigeneticky. HIF faktor pak reguluje širokou škálu genů, odpovědných za expresi proteinů, klíčových pro adaptaci na hypoxii. Jedním z nejdůležitějších procesů je angiogeneze. Nedostatečné zásobení tkání nádorů difuzí kyslíku je totiž velice limitující pro jejich růst. Vlivem HIF faktoru tedy dochází k expresi genových produktů VEGF a angiopoetinu-2. Ty se následně navážou na specifické receptory na povrchu endotelových buněk, čímž aktivují jejich proliferaci, migraci a utváření nových cév (Chen a kol., 2020). Tím dochází k urychlení růstu cévní sítě a k obnově zásoby kyslíku a živin, což vede k opětovnému růstu nádoru, a tedy i jeho přežití. Avšak nově vzniklé cévy jsou často deformované, a proto jsou méně efektivní (Brahimi-Horn a kol., 2007). Co se týče zdroje energie, spoléhají se buňky na způsob výroby ATP skrze anaerobní glykolýzu. Přesto že je tento způsob energeticky méně efektivní, konají tak i během normoxie, jak bylo zjištěno Otto Warburgem před více než 80 lety (Weidemann a Johnson, 2008). To je přisuzováno faktu, že dělící se buňky potřebují kromě ATP také uhlovodíky jako stavební materiál. Anaerobní glykolýza umožňuje přeměnění některých uhlovodíků k výrobě základních stavebních bloků, jimiž jsou například nukleotidy či aminokyseliny. Rakovinné buňky dále tento méně produktivní způsob výroby energie kompenzují vyšším příjmem glukózy pomocí HIF faktorem regulovaných glukózových přenašečů. Za metabolickou změnu z kyslíkaté na bezkyslíkatou produkci energie je pak zodpovědných několik glykolytických enzymů, řízených alfa podjednotkou HIF faktoru. Jak již bylo popsáno v kapitole Metabolismus glukózy, pyruvát je pomocí laktát dehydrogenázy A přeměňován na laktát a pomocí PDK1 je inhibována pyruvát dehydrogenáza. Tím je potlačena přeměna pyruvátu na acetyl-CoA, a tudíž i oxidační fosforylace. Alfa podjednotka je zodpovědná také za regulaci pH mikroprostředí nádoru. Vlivem produkce laktátu totiž nastává v extracelulárním prostoru acidóza, tedy pH klesá. Ačkoliv je pH ve vnějším prostředí nízké, uvnitř buněk zůstává relativně v normě či je dokonce slabě zásadité. To je způsobeno díky HIF faktoru. Faktor totiž aktivuje membránové pumpy a přenašeče, které skrze přenos iontů, jako jsou např. H⁺, Na⁺, Cl⁻ nebo HCO₃⁻ udržují homeostázu pH. Tím je dále podpořena proliferace a invaze buněk do dalších tkání. HIF faktor totiž hraje roli také v invazi buněk a tvorbě metastáz.

Inhibice proteinů, které HIF faktor ovlivňuje či inhibice samotného faktoru by pak měla blokovat růst nádoru a progresi rakoviny. Nádoru je totiž tímto zamezen přístup ke kyslíku a živinám. Již bylo prokázáno, že genová terapie, vedoucí k zabránění vazby koaktivátoru CBP/p300 na HIF-1 α , vedla u tzv. xenograft modelu myši (implantace lidských nádorových buněk do těla zvířete) k inhibici růstu nádoru. HIF faktor by mohl být takto deaktivován

několika možnými způsoby. To by mohlo mít do budoucna významný terapeutický potenciál pro léčbu rakoviny, a proto by měl být HIF faktor v tomto ohledu dále zkoumán.

2.2.2 HIF-1 faktor a ischemické poruchy

Ischemické poruchy jsou vážná onemocnění spojená s nedostatečným prokrvením tkání, způsobeným obstrukcí či zúžením cév, které tkáň zásobují. To má za následek nedostatek kyslíku a živin. Dále se ischemické poruchy vyznačují také nedostatečným odvodem, a tudíž hromaděním toxických metabolitů. Mezi tyto poruchy patří srdeční infarkt či mozková mrtvice. Srdečnímu infarktu předchází ateroskleróza neboli kornatění tepen, což je proces ukládání tukových látek a vápníku do stěn tepen (Chen a kol. 2020). Příkladem tukových látek je cholesterol, jenž je přítomen hlavně v potravinách živočišné výroby. Cévní stěna se tak mění a vytváří se aterosklerotický plát, čímž dojde ke zúžení cév a ztrátě jejich pružnosti. Průtok krve se tak sníží, srdce není zásobeno dostatečným množstvím kyslíku a glukózy a dochází k jeho nevratnému poškození a k infarktu. Samotný infarkt je nekróza srdečního svalu. Ischemie/hypoxie vyvolává expresi HIF-1 α a ta následně indukuje expresi dalších proteinů, jako je např. VEGF. U mladých jedinců má ischemie na angiogenezi silné stimulační účinky. Tudíž dochází k růstu koronárních i periferních cév, jež obnovují či zvyšují zásobení tkání kyslíkem. Tím lze infarktu předejít. S rostoucím věkem však dochází k narušení produkce VEGF a ke snížení reaktivity epiteliálních buněk na něj. Tím pádem probíhá angiogeneze v mnohem menší míře a pomaleji. To je způsobeno nižší aktivitou HIF-1 faktoru. Právě průběh angiogeneze pak ovlivní, jak závažný infarkt je či zda se vůbec odehraje. Rychlá obnova průtoku krve jeho rozsah snižuje (Semenza, 2014). Proto existují také další látky, které jsou schopny zvýšit expresi HIF-1 α a tím také zvýšit intenzitu angiogeneze uvnitř ischemického myokardu. Takovou látkou je např. PR39, což je peptid, který skrze inhibici degradace HIF-1 α podporuje angiogenezi (Semenza, 2000). Mozková mrtvice neboli cévní mozková příhoda je dalším typem ischemické poruchy. Pokud je tepna, která vede do mozku ucpána například krevní sraženinou (trombóza), nedostává se do mozku dostatek kyslíku. V takovém případě nastává ischemie, jejímž vlivem dochází k poškození mozku a jeho postupnému odumírání. Během jedné minuty odumře až milion neuronů. Hypoxické podmínky pak aktivují HIF-1 α , která řídí adaptaci neuronů. Hlavním procesem, který HIF-1 α ovlivňuje, je opět angiogeneze. Dále reguluje také buněčné přežití a metabolismus glukózy. I v tomto ohledu je však potřeba HIF faktor dále studovat, aby mohl být v tomto odvětví v budoucnu terapeuticky využíván.

3 HIF-1 faktor a obratlovci, žijící v hypoxickém prostředí

Někteří savci se kvůli podmínkám, ve kterých žijí, musí přizpůsobovat různým extrémům. Mohou to být například vysoké či nízké teploty, temnota nebo právě hypoxie. Aby byly tyto organismy schopné vést v hypoxickém prostředí kvalitní život, musí k tomu být patřičně přizpůsobeny. K tomu patří vysoce koordinovaná systémová rekonfigurace těla, zahrnující částečné vypnutí některých orgánů. Některé buňky zůstávají metabolicky aktivní, zatímco jiné přepínají na anaerobní způsob výroby energie nebo se úplně deaktivují (Ramirez a kol., 2006). Tato rekonfigurace závisí na proměnných, jako je prostředí, stupeň hypoxického stresu či chování organismu. Obratlovcům, žijícím ve vysokých nadmořských výškách či potápějícím se do velkých hloubek pomáhá při adaptaci také HIF-1 faktor. Ten reguluje expresi cílových genů, jejichž produkty hrají klíčovou roli při buněčných odpovědích na nízkou hladinu kyslíku (Graham a McCracken, 2019). V této kapitole se budu věnovat vybraným druhům mořských či horských obratlovců a jejich přizpůsobením pro život v hypoxii.

3.1 Podmořští obratlovci

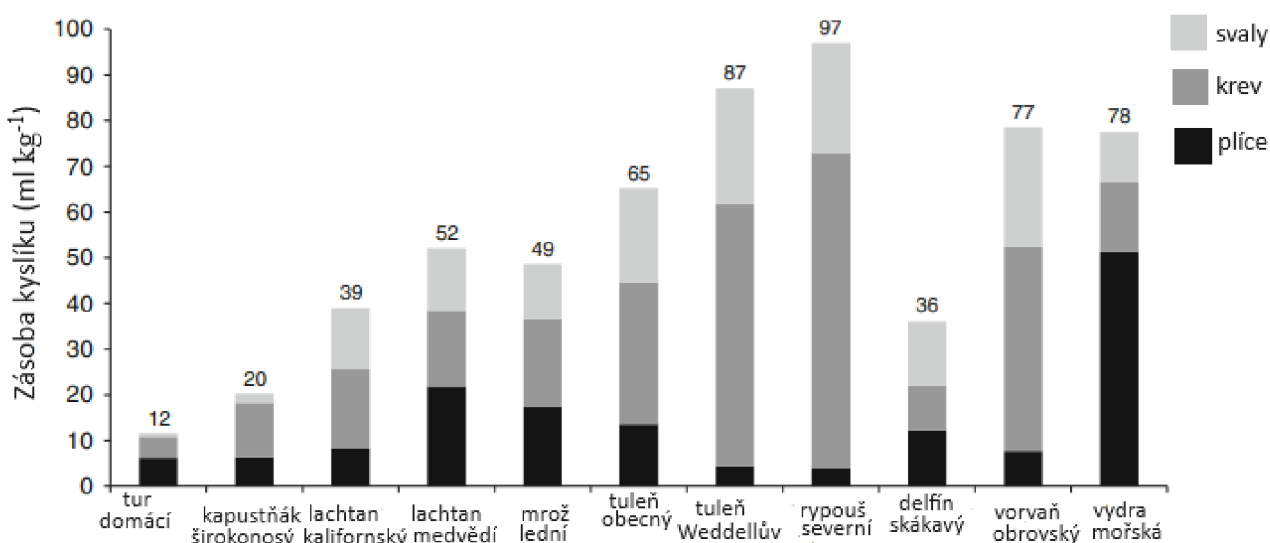
Podmořské prostředí je jedním z nejdynamičtějším a představuje velkou výzvu pro jeho obyvatele, zejména z hlediska dostupnosti kyslíku. Dostupnost kyslíku je totiž jedním z klíčových faktorů, ovlivňujících podmořský ekosystém. Ve velkých hloubkách na živočichy často působí hypoxické podmínky, vzhledem k vysokému tlaku vody a omezenému přísunu kyslíku z atmosféry. S rostoucí hloubkou se tak množství kyslíku rozpuštěného ve vodě snižuje. Na živočichy jsou kladeny extrémní nároky, které vyžadují fyziologické, anatomické či behaviorální adaptace. Díky těmto adaptacím jsou tak schopni maximalizovat délku ponoru. Hrozí ale, že nastane tzv. asfyxie, což je stav nedostatečného přísunu kyslíku do těla či nedostatečného odvodu oxidu uhličitého z těla (Davis, 2014). Asfyxie vede k hypoxii v tkáních a narušení metabolismu a fyziologické homeostázy. Potápějící se savci a ptáci jsou na dlouhá přerušování dýchání přizpůsobeni. To jim umožňuje zachovat si na určitý čas kyslíkatý metabolismus a homeostázu i pod vodou. Souhrn fyziologických změn v reakci na ponor se označuje jako tzv. potápěčská odezva (odezva na ponor). Ta chrání živočichy před asfyxií. Mezi plicní a kardiovaskulární změny patří zástava dýchání (apnoe), snížení srdeční frekvence (bradykardie), pokles srdečního výdeje a periferní vazokonstrikce, jež zachovává arteriální krevní tlak a prokrvení důležitých orgánů. Bradykardie může při nuceném ponoru dosahovat až méně než 10 % z celkové klidové srdeční frekvence. Prokrvovány jsou pak pouze nejdůležitější orgány, kterými jsou mozek, srdce, plíce a nadledviny. Tyto fyziologické změny slouží hlavně k zachování kyslíku pro orgány, které jsou na jeho deficit nejcitlivější a jsou esenciální pro přežití. Tyto fyziologické změny však mohou trvat pouze omezený čas a liší se dle toho, zda byl ponor dobrovolný či nucený. To bylo zkoumáno například u tuleně Weddellova (*Leptonychotes weddellii* Lesson, 1826). Co se týče změny metabolismu, při nuceném ponoru se mění na anaerobní. V případě dobrovolného ponoru si však mořští savci zachovávají kyslíkatou výrobu ATP ve většině částí těla. Bylo totiž prokázáno, že při dobrovolném ponoru, kratším než 16 minut, nedošlo k nárůstu laktátu v krvi, tudíž se tuleni potápěli pouze v rámci

svého aerobního limitu (ADL). V kosterních svalech, kde je cíleně vytvořené hypoxické prostředí, dochází k výrobě energie jiným způsobem. Tím je β -oxidace mastných kyselin. Jak uvedli Kooyman a kol. (1980), aerobní limit se v případě tohoto druhu pohybuje v rozmezí od 16 do 18 minut. Vzhledem k tomu, že při dobrovolném ponoru nedochází ani k dočasnému neprokrvení některých orgánů, je třeba potápějící se živočichy studovat v jejich přirozeném prostředí, nikoliv nuceně. V případě nucení se totiž jedná pouze o primitivní reakci na hrozbu asfyxie. Takovou fyziologickou reakci má společnou většina obratlovců. Tyto fyziologické reakce, jako je například změna srdeční frekvence se liší také dle náročnosti a rychlosti vykonávaného pohybu ve vodě. S rostoucí náročností při plavání se zvyšuje srdeční frekvence, aby mohly být aktivní svaly dostatečně zásobeny kyslíkem. Tuleni Weddellovi, kteří se potápějí na dlouhé časové úseky, si skrze na výdej energie nenáročný pohyb udržují nízkou úroveň metabolismu a mají tak výraznější fyziologickou odezvu na ponor. Naopak živočichové, potápějící se na krátké úseky, kterými jsou například delfini skákaví (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821), vykonají více pohybu ploutvemi, pohybují se rychleji a mají nižší zásobu kyslíku ve svalech. Mají tudíž méně výraznou odezvu na ponor.

Aby byl ADL prodloužen, využívají živočichové veškerou zásobu kyslíku, uloženou v krvi a svalech. V krvi je kyslík uložen ve formě oxy-hemoglobinu (oxy-Hb), zatímco v kosterních svalech a myokardu je uložen ve formě oxy-myoglobinu (oxy-Mb). Afinita kyslíku k Hb je různá vzhledem k celkové tělesné hmotě. P_{50} hemoglobinu se u mořských dravců, jako jsou tuleni, lachtani, mroži či vydry mořské (*Enhydra lutris* Linneaus, 1758) pohybuje od 25 do 31 mmHg. P_{50} myoglobinu je mnohem nižší. Živočichové používají oxy-Mb k ukládání zhruba třetiny až poloviny celkového množství kyslíku, použitého během ponoru. Aby byl kyslík uvolněn, musí dosahovat vnitrobuněčný parciální tlak kyslíku ve svalech méně než 10 mmHg, tedy musí působit silná hypoxie. Hypoxický stav v kosterních svalech zajišťuje periferní vazokonstrikce, jelikož přerušuje zásobení těchto tkání kyslíkem. Tím je umožněno uvolnění kyslíku z oxymyoglobinového komplexu (Davis a Kanatous, 1999). Uvolněný kyslík pak putuje do mitochondrií. Čím je zásoba kyslíku ve svalech vyšší, tím výhodnější odezva na ponor. Obecně mají mořští savci těchto globinů v těle více než suchozemští savci. To jim umožňuje ukládat v těle velké množství kyslíku, které jim je následně během ponoru k dispozici. Ploutvonožci a kytovci, kteří vykonávají vůbec nejhlubší ponory, nesou obrovské množství kyslíku v krvi a svalech, zatímco v plicích mají kyslíku minimum (Obrázek č. 4). To jim umožňuje na začátku ponoru vydechnout, aby byl snížen objem plic během potápění. Mezi ně patří například tuleň Weddellův, rypouš severní (*Mirounga Angustirostris* Gill, 1866) či vorvaň obrovský (*Physeter macrocephalus* Linneaus, 1758). U živočichů, potápějících se na kratší časové úseky je kyslík rovnoměrněji rozložený mezi plicemi, krví a svaly. Výjimkou jsou kapustňáci, kteří mají v těle nízké koncentrace Hb i Mb, tudíž mají velmi malou zásobu kyslíku. Pouze díky velmi nízkému energetickému výdeji a nízké intenzitě metabolismu jsou schopni delších aerobních ponorů. Mořská vydra má zase naopak neobvykle velké plíce, jež jí slouží jako významný zásobník kyslíku během kratších ponorů (Obrázek č. 4). Výrazně ji však nadnáší. Proto musí vyvinout výrazně vyšší úsilí a větší množství energie, aby se potopila, a tudíž má vysokou intenzitu metabolismu. Existují také behaviorální adaptace, které snižují

výdej energie během ponoru. Živočichové například neplavou příliš blízko hladiny za účelem eliminace odporu, který působí vlivem vln. Dále lze během ponoru využívat také změnu vztlaku k minimalizaci energetických nákladů. Při ponoru je díky změně kladného vztlaku na záporný zvířeti umožněno klouzat do hloubky bez nutnosti pohybu ploutvemi. To může být dále podpořeno tím, že živočichové provedou ještě před ponorem výdech, aby snížili počáteční objem plic (Davis, 2014). Takto mohou snadno klesnout až do hloubky 300 metrů, aniž by vyvinuli mnoho úsilí. Vůbec nejdůležitější behaviorální adaptací je potápět se v rámci ADL, tedy aerobně. Tím minimalizují čas strávený na hladině, jelikož obnova zásoby kyslíku v krvi a svalech zabere pouze pár minut. Aerobní ponor je tak dvakrát efektivnější z hlediska doby ponoru, což zvyšuje příležitost k lovu.

V adaptaci na nízkou hladinu kyslíku pomáhá živočichům HIF faktor. Ten je hlavním regulátorem buněčných odpovědí a celkové homeostázy. Faktor reguluje expresi proteinů, které buněčné odpovědi řídí. Takovým proteinem je například VEGF, jež zajišťuje angiogenezi. Ta umožňuje efektivnější průtok krve, přenos oxyhemoglobinového komplexu a okysličování tkání živočichů. VEGF dále zajišťuje také periferní vazokonstrikci, jež pomáhá přeměrovat krev z periferních tkání do důležitých orgánů (Bi a kol., 2015). HIF-1 α hraje roli také při obraně organismu proti oxidačnímu stresu. Ten je totiž vzhledem k opakovaným cyklům ischemie a následné obnovy povrchového průtoku krve zvýšený. Alfa podjednotka také reguluje expresi BNIP3, což je apoptotický protein, podílející se na mitochondriální autofagii. Ta zabrání růstu hladiny ROS ve tkáni například u tuleňů. Společně s dalšími enzymatickými (gluthation S-transferáza) a neenzymatickými (gluthation) antioxidanty tak chrání živočichy před oxidačním poškozením (Davis, 2014). HIF-1 α zprostředkovává také produkci EPO, čímž zvyšuje intenzitu erythropoézy (Johnson a kol., 2009). To bylo prokázáno vzhledem ke zvýšenému množství hematokritu u tuleňů kroužkovaného (*Pusa hispida* Schreber, 1775). Je tedy patrné, že podmořští savci konají složité fyziologické či metabolické adaptace, které jim umožňují přežít v podmínkách hypoxie.



Obrázek č. 4: Graf rozložení zásob kyslíku v těle mořských savců (Davis, 2014, Department of Marine Biology, Texas A&M University, upraveno Rydvalová).

Na obrázku č. 4 můžeme vidět sloupcový graf, který ukazuje, jak jsou v těle mořských savců rozloženy zásoby kyslíku mezi svaly, krví a plícemi. Pro porovnání zde slouží rozložení kyslíku v těle tura domácího (*Bos taurus*, 450 kg). Dále graf zobrazuje zásoby kyslíku u vydry mořské (*Enhydra lutris*, 28 kg), lachtana kalifornského (*Zalophus californianus*, 35 kg), lachtana medvědího (*Callorhinus ursinus*, 154 kg), tuleně obecného (*Phoca vitulina*, 24 kg), tuleně Weddellova (*Leptonychotes weddellii*, 450 kg), rypouše severního (*Mirounga angustirostris*, 1 500 kg), mrože ledního (*Odobenus rosmarus*, 65 kg), delfína skákavého (*Tursiops truncatus*, 200 kg), vorvaně obrovského (*Physeter macrocephalus*, 10 000 kg) a kapustňáka širokonosého (*Trichechus manatus*, 350 kg).

3.2 Obratlovci, žijící ve vysokých nadmořských výškách

Prostředí, nacházející se ve vysokých nadmořských výškách, představuje stejně jako podmořské prostředí řadu fyziologických výzev. Typickým je pro tato prostředí nízký parciální tlak kyslíku a snížená teplota. Do plic živočichů, žijících v těchto podmínkách se vlivem nízkého parciálního tlaku kyslíku dostává méně kyslíku (Storz, 2007). To způsobuje, že je krví přenášeno méně kyslíku ke tkáním a buňkám. Hypoxie v tkáních pak značně omezuje průběh aerobního metabolismu, což následně ovlivňuje požadavky na příjem potravy a tekutin. Dále také mění celkovou kapacitu energie pro pohybovou aktivitu a pro vnitřní produkci tepla u endotermů. Živočichové tak musí využívat řadu adaptací, jež jim pomáhají se v hypoxických podmínkách vypořádat se stresem. Jedním z důležitých proteinů, podílejících se na adaptaci na nízký parciální tlak kyslíku v krvi je hemoglobin. Zvýšením afinity kyslíku k Hb totiž dochází ke zvýšení celkové oběhové a krevní kapacity k přenosu kyslíku. Tím je při hypoxii zachována efektivní hnací síla pro difuzi kyslíku do tkání. I při nižším parciálním tlaku kyslíku musí transport kyslíku krví plnit dvě vzájemně související funkce. Musí být zachován dostatečný přísun kyslíku, aby byly splněny metabolické nároky. Aby byly tkáně efektivně zásobeny difuzí, musí být také udržován adekvátní tlakový gradient. Důležitým mechanismem je v tomto případě změna tvaru oxygen-hemoglobinové disociační křivky (ODC). Je tak kompenzován nižší parciální tlak kyslíku. Tato křivka popisuje, jak závisí vratné navázání kyslíku hemoglobinem na P_{O_2} v krvi. Pokud je parciální tlak nízký, dochází automaticky k nárůstu kyslíkové vodivosti krve, čímž je zabráněno parciálnímu tlaku během hypoxie dále klesnout. P_{50} , což je parciální tlak kyslíku, při kterém je polovina Hb v krvi nasycená kyslíkem však klesá. Změny v koncentraci hemoglobinu či změny afinity kyslíku k Hb mohou vodivost dále modifikovat. Nárůst koncentrace hemoglobinu je důležitý hlavně u živočichů, kteří jsou původem z nížinných oblastí a potřebují se podmínkám ve vyšších nadmořských výškách přizpůsobit pouze dočasně. Zvýšení afinity kyslíku k Hb je naopak důležité u živočichů, trvale žijících ve vysokohorských oblastech. Ti jsou na chronickou hypoxii adaptováni také geneticky. Při mírnější hypoxii a vyšším parciálním tlaku kyslíku je zvýšen index celkového okysličení tkání. Roste také P_{50} . Díky výzkumům prováděným Bancherem a Groverem (1972), byly demonstrovány výhody vysokého či nízkého P_{50} během silné či mírné hypoxie. Při výzkumu byly porovnávány lamy krotké (*Lama glama* Linneanus, 1758), žijící ve vysokých

nadmořských výškách (nízké P_{50}) s ovci domácí (*Ovis aries* Linneanus, 1758). Ovce mají v porovnání s lamami mnohem vyšší P_{50} , a tak byla i kyslíková vodivost krve u ovci, vyskytujících se v nadmořských výškách 1 600–2 800 metrů, kde působí mírná hypoxie značně vysoká. U lam, vyskytujících se v nadmořských výškách až 6 400 metrů však byla kyslíková vodivost ještě vyšší. Pro většinu druhů je obtížné specifikovat, kdy se nízký P_{50} stává výhodným. U menších savců, kteří mají obecně vyšší intenzitu metabolismu, a proto také vyšší spotřebu kyslíku, se stává nízký P_{50} výhodnější již při nižších nadmořských výškách, než tomu je u velkých savců. U alpských savců, žijících vysoko v horách, jako jsou například již zmiňované lamy (*L. glama*) nebo vikuňi (*Vicugna vicugna* Molina, 1782) se očekává vyšší afinita kyslíku k Hb. V porovnání se svými příbuznými taxony z čeledi velbloudovitých tomu tak opravdu je. Velbloud dvouhrbý (*Camelus bactrianus* Linneanus, 1758) a velbloud jednohrbý (*Camelus dromedaris* Linneanus, 1758), kteří žijí v nížinných pouštích, mají oproti lamám mnohem nižší afinitu. Biochemie krve velbloudovitých, žijící v Andách je tak přizpůsobena pro obývání těchto vysoko položených míst. Jedná se navíc pouze o substituci několika málo aminokyselin, jež zajistí adaptaci funkce hemoglobinu na hypoxii ve vysokých nadmořských výškách. Stejně tomu je také u ptáků, létajících ve vysokých nadmořských výškách. Ti mají v porovnání se sesterskými taxony, létajícími v nížinách mnohem vyšší afinitu kyslíku k Hb (Black a Tenny, 1980).

Mnozí živočichové jsou v prostředí se sníženou dostupností kyslíku schopni za účelem snížení požadavků na kyslík utlumit celkový metabolismus. To však není možné u endotermních živočichů, žijících ve vysoko položených oblastech. Je tomu tak vzhledem k energetickým nárokům aerobní netřesové termogeneze či fyzické aktivity. Například během letu ptáků stoupne spotřeba kyslíku až dvacetinásobně (Storz a kol., 2010). Tím může dojít i k tomu, že spotřeba kyslíku převyšuje jeho příjem. V takovém případě je vyžadována zvýšená kapacita průtoku kyslíku transportní drahou. Tato kaskáda je tvořena několika kroky od vdechnutí kyslíku až k mitochondriím a zahrnuje například změny v plicní ventilaci, plicní difuzi kyslíku, cirkulaci kyslíku v krvi a difuzi kyslíku do tkání. Toho je dosaženo díky fenotypové plasticitě a dědičným modifikacím. Takovou modifikací je například zvětšení vnitřního povrchu plic či nárůst cévního zásobení v periferních tkáních. Genetickou adaptací, jež je přítomna pouze u živočichů s původem ve vysokohorských oblastech je také dýchání s větším objemem nádechu. Tímto efektivnějším způsobem dýchá například pěnkavice severní (*Leucosticte arctoa* Pallas, 1811) z ptáků nebo pišťucha černolící (*Ochotona curzoniae* Hodgson, 1858) a lidé ze savců. Hlubší a méně frekventované nádechy provádějí také husy indické (*Anser indicus* Latham, 1790), které migrují přes Himaláj. V reakci na nízký parciální tlak kyslíku v alveolách dochází u savců, kteří běžně žijí v nížinách také k plicní vazokonstrikci. Ta zajišťuje optimální okysličení krve v plicích (Ivy a Scott, 2015). Vazokonstrikce však úplně chybí u živočichů, žijících pouze ve vysokých nadmořských výškách, jímž je například jak domácí (*Bos grunniens* Linneanus, 1766). Stále však zůstává mnoho otázek ohledně adaptací na vysokohorské podmínky a důležitosti adaptace, aklimatizace a transgeneračního přenosu u obyvatel vysokých nadmořských výšek. Většina změn v genové expresi v reakci na hypoxii ve vysokých nadmořských výškách je však řízena opět HIF faktorem.

4 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo charakterizovat transkripční faktor HIF-1, jeho působení v různých fyziologických a patofyziologických mechanismech a jeho podíl na komplexních procesech, probíhajících v těle živočichů.

Ve své práci jsem shrnula většinu dostupných informací o HIF-1 faktoru. V úvodu práce bylo pojednáno o struktuře této molekuly. Ta se skládá ze dvou podjednotek, které jsou v běžných podmínkách odděleny a odlišně regulovány. Pouze při hypoxických podmínkách je umožněn jejich střet v jádru buňky. Dochází pak k jejich dimerizaci, což je umožněno díky dimerizačním doménám PAS. Dále byly popsány způsoby regulace aktivity faktoru skrze různé regulační molekuly. Ty mohou transkripční aktivitu buď podpořit nebo potlačit. HIF faktor je pak schopen řídit expresi cílových genů, tím že se naváže na DNA. Aktivuje tak fyziologické mechanismy, jež jsou klíčové pro adaptaci na hypoxické podmínky. Mezi tyto mechanismy patří angiogeneze, erytropoéza, metabolické změny či proliferace buněk. Veškeré tyto procesy byly v této práci podrobně popsány. Následně byla rozebrána účast těchto buněčných mechanismů v rozsáhlých tělních procesech, jimiž je například trávení či reprodukce. Tyto procesy nebo alespoň jejich části se totiž odehrávají v podmínkách snížené dostupnosti kyslíku, což má pozitivní i negativní účinky. Dále bylo pojednáno o tom, jak významná je role HIF faktoru také v patofyziologických procesech, jimiž jsou například rakovina, ischemické poruchy, střevní záněty či anémie. V závěru práce jsem zpracovala, jak se obratlovci přizpůsobují hypoxickým podmínkám v extrémním prostředí, kde žijí.

Do budoucna je tak potřeba se dále zaměřit hlavně na potenciál HIF-1 faktoru při léčbě mnoha nemocí. Například inhibice HIF faktoru uvnitř nádorů by mohla mít pozitivní vliv na zpomalení či dokonce léčbu rakoviny. Lepší pochopení, jak funguje faktor při ischemických poruchách by mohlo umožnit jejich předejití. Dále je třeba více prostudovat adaptační mechanismy u živočichů, žijících a přirozeně se vyskytujících v extrémních podmínkách, jako je podmořské či vysokohorské prostředí. Studium těchto adaptací přináší nejen zajímavé poznatky, ale také inspiraci dalšího výzkumu v této oblasti.

5 Použitá literatura

Alam, H., Maizels, E. T., Park, Y., Ghaey, S., Feiger, Z. J., Chandel, N. S., Hunzicker-Dunn, M. (2004): Folicle-stimulating hormone activation of hypoxia inducible factor-1 by the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/Ras homolog enriched in brain (Rheb)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway is necessary for induction of select protein markers of follicular differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 19431–19440.

Ashcroft, M., Taya, Y., Vousden, H. K. (2000): Stress Signals Utilize Multiple Pathways To Stabilize p53. *Mol. Cell Biol.*, 20: 3224–3233.

Banchero, N., Grover, R. F. (1972): Effect of different levels of simulated altitude on O₂ transport in llama and sheep. *American Journal of Physiology*, 222: 1239–1245.

Bárdos, I. J., Ashcroft, M. (2005): Negative and positive regulation of HIF-1: A complex network. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1775: 107–120.

Bezdíček, J. (2022): Hypoxií indukovaný faktor (HIF) a jeho význam v reprodukci. *Cattle Research J.*, 4: 37–40.

Bhattacharya, S., Michels, L. C., Leung, M.-K., Arany, P. Z., Kung, L. A., Livingston, M. D. (1999): Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. *Genes Dev.*, 13: 64–75.

Bi, J., Hu, B., Zheng, J., Wang, J., Xiao, W., Wang, D. (2015): Characterization of the hypoxia-inducible factor 1 alpha gene in the sperm whale, beluga whale, and Yangtze finless porpoise. *Mar. Biol.*, 162: 1201–1213.

Black, C. P., Tenny, S. M. (1980): Oxygen transport during progressive hypoxia in high-altitude and sea-level waterfowl. *Respiratory Physiology*, 39: 217–239.

Brahimi-Horn, M. C., Pouyssegur, J. (2009): HIF at a glance. *Journal of Cell Science*, 122: 1055–1057.

Brahimi-Horn, M. C., Chiche, J., Pouyssegur, J. (2007): Hypoxia and cancer. *J. Mol. Med.*, 85: 1301–1307.

Burton, J. G., Cindrova-Davies, T., Yung, H. W., Jauniaux, E. (2021): Oxygen and development of the human placenta., *Reproduction*, 161: F53–F65.

Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.-M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R. (1998): Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, 394: 485–490.

Carr, M. S. Transcriptional factors (online), 2007 (cit. 2024-02-26). Dostupné z: https://www.mun.ca/biology/scarr/4241_Devo_TranscriptionFactors.html

Čerychová, R., Pavlínková, G. (2018): HIF-1 Metabolism, and Diabetes in the Embryonic and Adult Heart. *Frontiers in Endocrinology*, 9: 1–14.

Davis, W. R. (2014): A review of the multi-level adaptations for maximizing aerobic dive duration in marine mammals: from biochemistry to behavior. *J. Comp. Physiol. B.*, 184: 23–53.

Davis, W. R., Kanatous, S. B. (1999): Convective oxygen transport and tissue oxygen consumption in Weddell seals during aerobic dives. *J. Exp. Biol.*, 202: 1091–1113.

Di Mattia, M., Sallese, M., Neri, M., Lopetuso, L. R. (2024): Hypoxic Functional Regulation Pathways in the GI Tract: Focus on the HIF-1 α and Microbiota's Crosstalk. *Inflamm. Bowel Dis.*, 20: 1–13.

Eckhart, A. D., Yang, N., Xin, X., Faber, J. E. (1997): Characterisation of the α 1B-adrenergic receptor gene promoter region and hypoxia regulatory elements in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 9487–9492.

Franke, K., Gassmann, M., Wielockx, B. (2013): Erythrocytosis: the HIF pathway control. *Blood*, 122: 1122–1128.

Freedman, J. S., Sun, J. Z., Poy F., Kung, L. A. (2002): Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 α . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 5367–5372.

Gassmann, M., Wenger, R. (1997): HIF-1, a Mediator of the Molecular Response to Hypoxia. *News Physiol. Sci.*, 12: 214–218.

Golonka, R., Yeoh, B. S., Vijay-Kumar, M. (2019): The iron tug-of-war between bacterial siderophores and innate immunity. *J. Innate Immun.*, 11: 249–262.

Graham, M. A., McCracken, G. K. (2019): Convergent evolution on the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway genes EGLN1 and EPAS1 in high-altitude ducks. *Heredity*, 122: 819–832.

Haase, H. V. (2010): Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 299: 1–13.

Haase, H. V. (2013): Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Reviews*, 27: 41–53.

Halterman, W. M., Federoff, J. H. (1999): HIF-1 α and p53 Promote Hypoxia-Induced Delayed Neuronal Deaths in Models of CNS Ischemia. *Exp. Neurol.*, 159: 65–72.

Hickey, M. M., Simon, M. C. (2006): Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 76: 217–257.

Holland, O. J., Hickey, A. J. R., Alvsaker, A., Moran, S., Hedges, C., Chamley, L. W., Perkins, A. V. (2017): Changes in mitochondrial respiration in the human placenta over gestation. *Placenta*, 57: 102–112.

Hubbi, E. M., Semenza, L. G. (2015): Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 309: 775–782.

Chen, S. P., Chiu, T. W., Hsu, L. P., Lin, C. S., Peng, C. I., Wang, Y. C., Tsai, J. S. (2020): Pathophysiological implications of hypoxia in human diseases. *Journal of Biomedical Science*, 27: 1–19.

Chun, Y.-S., Kim, M.-S., Park, J.-W. (2002): Oxygen-Dependent and -Independent Regulation of HIF-1 α . *J Korean Med. Sci.*, 17: 581–588.

Ivy, M. C., Scott, R. G. (2015): Control of breathing and the circulation in high-altitude mammals and birds. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 186: 66–74.

Jeong, W.-J., Bae, K.-M., Ahn, Y.-M., Kim, H.-S., Sohn, K.-T., Bae, H.-M., Yoo, A.-M. (2002): Regulation and Destabilization of HIF-1 α by ARD1-Mediated Acetylation. *Cell*, 111: 709–720.

Jiang, B.-H., Semenza, G.L., Bauer, C., Marti, HH. (1996): Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am. J. Physiol.*, 271: C1172–C1180.

Johnson, P., Elsner, R., Zenteno-Savín, T. (2009): Hypoxia-Inducible Factor in Ringed Seal (*Phoca hispida*) Tissues. *Free Radical Research*, 38: 847–854.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 5667–5672.

Kaluz, S., Kaluzová, M., Stanbridge, J. E. (2008): Regulation of gene expression by hypoxia: Integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hypoxia-responsive element. *Clinica Chimica Acta*, 395: 6–13.

Kelly, J. C., Zheng, L., Campbell, E. L. (2015): Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. *Cell Host Microbe*, 17: 662–671.

Kierans, J. S., Taylor, T. C. (2021): Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *J Physiol.*, 599: 23–37.

Kooyman, G. L., Wahrenbrock, E. A., Castellini, M. A., Davis, R. W., Sinnett, E. E. (1980): Aerobic and anaerobic metabolism during voluntary diving in Weddell seals: evidence of preferred pathways from blood chemistry and behavior. *J. Comp. Physiol. B.*, 138: 335–346.

Lee, J. P., Jiang, H. B., Chin, Y. B., Iyer, V. N., Alam, J., Semenza, L. G., Choi, M. A. (1997): Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activity of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J. Biol. Chem.*, 272: 5375–5381.

Lee, J. W., Bae, S. H., Jeong, J. W., Kim, S. H., Kim, K. W. (2004): Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp. Mol. Med.*, 36: 1–12.

Lim, M., Thompson, J. G., Dunning, K. R. (2021): Hypoxia and ovarian function: follicle development, ovulation, oocyte maturation. *Reproduction*, 161: F33–F40.

Lisy, K., Peet, D. J. (2008): Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell Death and Differentiation*, 15: 642–649.

Ma, T., Grayson, W. L., Fröhlich, M., Vunjak-Novakovic, G. (2009): Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues. *Biotechnol. Prog.*, 25: 32–42.

Manalo, J. D., Rowan, A., Lavoie, T., Natarajan, L., Kelly, D. B., Ye, Q. S., Garcia, N. G. J., Semenza, L. G. (2005): Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*, 105: 659–669.

Manresa, C. M., Taylor, C. T. (2017): Hypoxia Inducible Factor (HIF) Hydroxylases as Regulators of Intestinal Epithelial Barrier Function. *Cell Mol. Gastroenterol Hepatol.*, 3: 303–315.

Ramirez, M. J., Folkow, P. L., Blix, S. A. (2006): Hypoxia Tolerance in Mammals and Birds: From the Wilderness to the Clinic. *Annual Rev. Of Physiol.*, 69: 113–143.

Ruas, L. J., Poellinger, L., Pereira, T. (2005): Role of CBP in regulating HIF-1 mediated activation of transcription. *Journal of Cell Science*, 118: 301–311.

Ruas, L. J., Poellinger, L., Pereira, T., (2002): Functional Analysis of Hypoxia-inducible Factor-1 α -mediated Transactivation. *J. Biol. Chem.*, 277: 38723–38729.

Sadeghi, F., Kardar, G., Bolouri M. (2020): Overexpression of bHLH domain of HIF-1 failed to inhibit the HIF-1 transcriptional activity in hypoxia. *Biological Research*, 53: 1–11.

Safran, M., Kaelin Jr., G.W. (2003): HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *J. Clin. Invest.*, 111: 779–783.

Semenza, G. L. (2000): HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.*, 14: 1983–1991.

Semenza, L. G. (1998): Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev.*, 8: 588–594.

Semenza, L. G. (1999): Regulation of Mammalian O₂ Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 15: 551–578.

Semenza, L. G. (2001): HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13: 167–171.

Semenza, L. G. (2002): HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol. Med.*, 8: 62–67.

Semenza, L. G. (2003): Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.*, 3: 721–732.

Semenza, L. G. (2011): Regulation of Metabolism by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 76: 347–353.

Semenza, L. G. (2014): Oxygen Sensing, Hypoxia-Inducible Factors, and Disease Pathophysiology. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 9: 47–71.

Semenza, L. G., Agani, F., Booth, G. (1997): Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney International*, 51: 553–555.

Shi, Y. H., Fang, W. H. (2004): Hypoxia-inducible factor 1 in tumour angiogenesis. *World J. Gastroenterol.*, 10: 1082–1087.

Schofield, C. J., Ratcliffe, P. J. (2004): Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 5: 343–354.

Sogawa, K., Numayama-Tsuruta, K., Ema, M., Abe, M., Abe, H., Fujii-Kuriyama, Y. (1998): Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 7368–7373.

Storz, F. J. (2007): Hemoglobin function and physiological adaptation to hypoxia in high-altitude mammals. *Journal of Mammalogy*, 88: 24–31.

Storz, F. J., Scott, R. G., Cheviron, A. Z. (2010): Phenotypic plasticity and genetic adaptation to high-altitude hypoxia in vertebrates. *The Journal of Experimental Biology*, 213: 4125–4136.

Taylor, C. T. (2007): Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *Biochem. J.*, 409: 19–26.

Thompson, B. Craig. (2016): Into thin air: How we Sense and Respond to Hypoxia. *Cell*, 167: 9–11.

Thompson, J. G., Brown, H. M., Kind, K. L., Russell, D. L. (2015): The ovarian antral follicle: living on the edge of hypoxia or not? *Biology of Reproduction*, 92: 1–6.

Weidemann, A., Johnson, R. S. (2008): Biology of HIF-1 α . *Cell Death Differ.*, 15: 621–627.

Wenger, H. R. (2002): Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J.*, 16: 1151–1162.

Zheng, L., Kelly, J. C., Colgan, P. S. (2015): Physiologic Hypoxia and Oxygen Homeostasis in the Healthy Intestines. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 309: C350–C360.

Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Semenza, G.L. (2000): Modulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP protein pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Research*, 60: 1541–1545.

Ziello, E. J., Jovin, S. I., Huang, Y. (2007): Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Regulatory Pathway and its Potential for Therapeutic Intervention in Malignancy and Ischemia. *The Yale journal of biology and medicine*, 80: 51-60.