

Přírodovědecká fakulta  
Univerzita Karlova v Praze  
Katedra fyziologie živočichů



**Mechanismy působení hypoxie na remodelaci koronárního  
oběhu**

**Effect of hypoxia on remodelling of coronary circulation**

Ivana Bučinská

Bakalářská práce

Školitelka: RNDr. Jitka Žurmanová, PhD.

2009

Velmi děkuji RNDr. Jitce Žurmanové, PhD. za její trpělivost a čas, které mi věnovala, prof. RNDr. Václavu Pelouchovi, CSc., svým rodičům, kteří mě v mém studiu podporovali a Ing. Martinu Markovi.

Prohlašuji, že tuto bakalářskou práci jsem zpracovala samostatně s použitím uvedených pramenů.

## **ABSTRAKT**

Schopnost udržet stálou hladinu kyslíku je nezbytná pro přežití organismu. Jedna z účinných strategií během hypoxie zahrnuje zvýšení dodávky kyslíku růstem nových cév a/nebo remodelací cév stávajících. Tyto procesy jsou velmi přísně regulovány časovou a prostorovou expresí růstových faktorů, cytokinů a adhezních molekul a dalších. Mnoho z nich je regulováno aktivitou transkripčního faktoru HIF. HIF je v normoxických podmínkách degradován hydroxylací prolyl hydroxylázami závislými na přítomnosti kyslíku. Aktivita prolyl hydroxyláz je však během hypoxie inhibována, zejména produkcí reaktivních forem kyslíku mitochondriemi a NADPH oxidázami a HIF je stabilizován. Tato práce shrnuje současné poznatky o angiogenním působení jeho cílových genů v myokardu.

**Klíčová slova:** hypoxie, hypoxií indukovaný faktor, prolyl hydroxyláza, reaktivní formy kyslíku, angiogeneze, růstový faktor cévního endotelu, fibroblast růstový faktor, angiopoetin, destičkový růstový faktor, myokard

## **ABSTRACT**

The ability to maintain oxygen homeostasis is essential for survival of organism. One of the efficient strategies during hypoxia includes increasing oxygen delivery by new blood vessel growth and/or by remodeling of the existing vasculature. These processes are tightly controlled by temporally and spatially expressed growth factors, cytokines, adhesion molecules and others. Many of them are controlled by activity of transcription factor HIF. HIF is in normoxia degraded by oxygen dependent hydroxylation of prolyl hydroxylases. Their activity is inhibited by hypoxia induced production of reactive oxygen species by mitochondria and NADHP oxidases and HIF is stabilized. This study summarizes an angiogenic response to HIF activated target genes in myocardium.

**Key words:** hypoxie, hypoxia inducible factor, prolyl hydroxylase, reactive oxygen species, angiogenesis, vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor, angiopoietin, platelet derivated growth factor, myocardium

# SEZNAM ZKRATEK

<b>Angptl</b>	angiopoetinu podobný protein	<b>NO</b>	oxid dusnatý
<b>ANP/BNP</b>	atriální/mozkový natriuretický protein	<b>NRP</b>	neuropilin
<b>BM</b>	bazální membrána	<b>PAI</b>	inhibitor aktivátoru plasminogenu
<b>BNIP3</b>	<i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3</i>	<b>PDGF</b>	destičkový růstový faktor
<b>CBP</b>	Creb vazebný protein	<b>PDGFR</b>	receptory destičkového růstového faktoru
<b>COX</b>	cyklooxygenáza	<b>PDK</b>	kináza pyruvát dehydrogenázy
<b>CRM1</b>	jaderný exportin ( <i>chromosome region maintenance 1</i> )	<b>PGK</b>	fosfoglycerát kináza
<b>EC</b>	endoteliální buňky	<b>PHD</b>	prolyl hydroxyláza
<b>ECM</b>	extracelulární matrix	<b>PI<sub>3</sub>K</b>	fosfoinositid-3-kináza
<b>eNOS</b>	endoteliální syntáza oxidu dusnatého	<b>PKC</b>	protein kináza C
<b>ER</b>	endoplasmatické retikulum	<b>PLC</b>	fosfolipáza C
<b>ET-1</b>	endotelin 1	<b>PIGF</b>	placentární růstový faktor
<b>FGF</b>	fibroblast růstový faktor	<b>pVHL</b>	von Hippel-Lindau protein
<b>FGFR</b>	receptor fibroblastového růstového faktoru	<b>ROS</b>	reaktivní formy kyslíku
<b>FIH</b>	faktor inhibující HIF	<b>SDF-1</b>	<i>stromal cell derivated factor - 1</i>
<b>HIF</b>	hypoxií indukovaný faktor	<b>SDH</b>	sukcinát dehydrogenáza
<b>HRE</b>	<i>hypoxia responsible element</i>	<b>SOD</b>	superoxid dismutáza
<b>HSPG</b>	heparan sulfát glykosaminoglykan	<b>TGF</b>	transformující růstový faktor
<b>IL</b>	interleukin	<b>TIMP</b>	tkáňový inhibitor metaloproteináz
<b>KGDH</b>	ketoglutarát dehydrogenáza	<b>TNF</b>	nádory nekrotizující faktor
<b>MAPK</b>	mitogen aktivující protein kináza	<b>uPA</b>	urokinázový typ aktivátoru plasminogenu
<b>MCP-1</b>	monocyt chemoatrahující protein-1	<b>VEGF</b>	růstový faktor endotelia cév
<b>MMP</b>	metaloproteináza	<b>VEGFR</b>	receptor růstového faktoru endotelia cév

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>2. ANGIOGENEZE</b> .....	<b>7</b>
2.1. DRUHY ANGIOGENEZE .....	7
2.2. ANGIOGENNÍ FAKTORY .....	8
2.2.1. <i>Fibroblast růstový faktor (FGF)</i> .....	9
2.2.1.1. Role v angiogenezi .....	10
2.2.2. <i>Růstový faktor endotelia cév (VEGF)</i> .....	11
2.2.2.1. Role v angiogenezi .....	12
2.2.3. <i>Angiopoetiny (Ang)</i> .....	12
2.2.3.1. Role v angiogenezi .....	13
2.2.4. <i>Destičkový růstový faktor (PDGF)</i> .....	13
2.2.4.1. Role v angiogenezi .....	14
2.2.5. <i>Další faktory</i> .....	14
<b>3. HYPOXIE</b> .....	<b>15</b>
3.1. PŮSOBNÍ HYPOXIE NA MYOKARD .....	16
3.2. SIGNÁLNÍ DRÁHY INDUKOVANÉ HYPOXÍÍ .....	18
3.2.1. <i>HIF: hypoxií indukovaný faktor</i> .....	18
3.2.1.1. Rodina HIF proteinů a jejich role v prenatálním a postnatálním vývoji .....	18
3.2.1.2. Struktura .....	21
3.2.1.3. Přehled cílových genů .....	22
3.2.1.4. Regulace .....	23
3.2.1.4.1. Transkripční aktivita .....	23
3.2.1.4.2. Stabilita .....	24
3.2.2. <i>Prolyl-hydroxylázy</i> .....	25
3.2.2.1. HIF-P4H/PHD .....	26
3.2.2.2. P4H-TM .....	27
3.2.3. <i>Reaktivní formy kyslíku</i> .....	28
<b>4. ZÁVĚR</b> .....	<b>32</b>
<b>5. POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>33</b>

# 1. ÚVOD

Ischemická choroba srdeční je nejpálčivějším problémem moderní civilizace. Představuje většinu z kardiovaskulárních chorob oběhové soustavy, které jsou příčinou téměř poloviny všech úmrtí v evropské unii, navíc nemocným přináší výrazné snížení kvality života.

Již více jak padesát let je znám kardioprotektivní účinek adaptace na sníženou hladinu kyslíku ve vysokých nadmořských výškách a není proto divu, že snahy o pochopení jeho účinku a využití v klinické praxi se poslední dobou stupňují. Jedním z takových adaptačních procesů je mj. i remodelace koronárního oběhu, která zajišťuje v podmínkách déle trvající hypoxie optimální okysličení myokardu.

Remodelace původního řečiště, spojená s přestavbou cév stávajících a vznikem cév nových, je velice složitý proces, který je pod přísným dohledem regulačního systému organismu a jeho deregulace vede ke vzniku mnoha závažných onemocnění. Nedostatečný růst cév nebo jejich abnormální regrese je spojována např. s mozkovou a srdeční ischemií, hypertenzí, neurodegenerativními a dýchacími poruchami a jeho nedostatek ve vývoji končí pro plod fatálně. Nadměrná angiogeneze naopak vede např. k artritidě, slepotě a dále k velmi zkoumanému vzniku nádorů (Carmeliet 2003), pro něž je pochopení angiogenních mechanismů a jejich potlačení příslibem účinné klinické terapie, stejně tak její aktivace v případě nedostatečného cévního zásobení orgánů.

Angiogeneze se aktivuje následkem mechanických (Hudlicka, Brown a Egginton 1992), zánětlivých (Schaper 1993) nebo metabolických stimulů (Adair, Gay a Montani 1990), které jsou vyvolány mj. i hypoxií.

Cílem této práce bylo shrnout mechanismy působení hypoxie na srdce, vedoucí k aktivaci formování nových cév během vývoje nebo rozvojem existujícího řečiště jako adaptaci na dlouhodobé působení hypoxie na zralé srdce, s důrazem na centrální úlohu hypoxií indukovaného transkripčního faktoru HIF a jeho regulaci.

## 2. ANGIOGENEZE

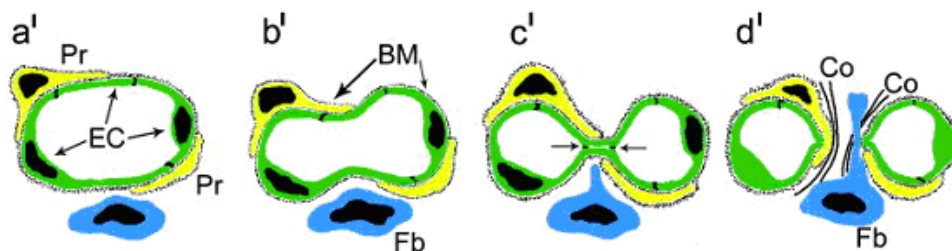
V současné době se rozeznávají tři typy neovaskularizace: *Vaskulogeneze* dává vzniknout cévám *de novo* a vychází z migrace a inkorporace prekursorových buněk, což představuje raný stav vazkularizace u myokardu. K tomuto procesu dochází v průběhu epikardiální a subepikardiální diferenciace buněk v endoteliální buňky (EC), které formují vazkulární tuby, předcházející formaci a funkci koronární cirkulace (Rafii a Lyden 2003). *Angiogeneze* je proces, při kterém dochází ke vzniku nových cév z primární cévní pleteně a její remodelace. Rozeznáváme angiogenezi fyziologickou (menstruační cyklus, remodelace fyzickou zátěží) a patologickou (růst nádoru, hojení ran). Je to tedy proces jehož výsledkem je tvorba nových mikrocév, proliferací a migrací do nitra stávajících cév (*intusseption*) tak, aby vytvořily její rozvětvení do dvou či více malých cév nebo prostý růst dalších větví (*sprouting*). *Arteriogeneze* nebo-li též vazkulární remodelace je další cestou k nárůstu vazkulárního objemu. Dochází zde ke zvýšení průměru cév a tím k možnému zvýšení průtoku (Tomanek, Zheng a Yue 2004).

### 2.1. Druhy angiogeneze

Rozlišujeme tři typy angiogeneze. Nejstarším a nejlépe prozkoumaným mechanismem je *angiogeneze pučením (sprouting angiogenesis)*. V první fázi se váží specifické růstové faktory na receptory EC a aktivují je. Následně je působením sekretovaných proteáz degradována okolní extracelulární matrix (ECM) a bazální membrána (BM), EC proliferují a migrují ve směru atrahujícího signálu, za účelem vytvoření pupenu. Rostoucí pupen formuje lumen a před znovu vytvořením BM buď zůstává ve své jednoduché podobě, a nebo splývá s jiným pupenem za vzniku smyčky (ColvilleNash a Willoughby 1997). Velkou výhodou tohoto typu angiogeneze je její invazivita a schopnost tvořit cévy v místech, kde se žádná vazkulární síť nenachází. Hraje tedy významnou roli při hojení ran. Její nevýhodou je však časová náročnost, která je spojena zejména s nutností buněčné proliferace (Buri, Hlushchuk a Djonov 2004).

*Angiogeneze vchlipováním (intussusceptive angiogenesis)* je velmi častým procesem v jednovrstevných a hustě vaskularizovaných plochách (trachee, cévnatka oka, gastro-intestinální trakt) a sférických sítích kolem ovariálního folikulu. S menší četností se pak vyskytují v dalších tkáních s dvourozměrnými a trojrozměrnými cévními sítěmi, včetně myokardu (Patan *et al.* 1991). Nevyžaduje primárně buněčnou proliferaci a jedná se tedy

o relativně rychlý proces, kdy jsou cévy během hodin či minut schopny značně expandovat do okolí. Vyznačuje se přítomností tzv. sloupků (*pillars*), které vznikají vchlípením EC do lumen cévy, jejich kontaktem a vznikem interendoteliálního mostu (obr. 1c'). Následně dochází v místě jejich kontaktu k perforaci. Sloupek je v té chvíli tvořen složkami intersticiální tkáně, zejména cytoplasmatickými výběžky myofibroblastů, jejichž vlákna jsou ukotvena v adhezivních placích proti EC. V konečné fázi pak dochází k obalení laterální cévní stěny pericyty a stabilizaci sloupku kolagenními vlákny (obr. 1d'). Mechanismus, vedoucí k vytvoření iniciálních výběžků není znám, předpokládá se však, že by v tomto procesu mohly hrát nějakou roli právě pericyty (Burri *et al.* 2004).



Obr. 1. a'-d': Dvojměrná (a'-d') reprezentace procesu vzniku nových vazkulárních úseků vchlípací angiogenezí. a',b': počátek formování výčnělků opačných cévních stěn do lumen. Po ustanovení interendoteliálního kontaktu (c'), endoteliální (EC) dvojitá vrstva a bazální membrána (BM) jsou perforovány a nově vzniklý sloupek je vyplněn fibroblasty (Fb) a pericyty (Pr), které tvoří kolagenní vlákna (Co) a objem sloupku roste (převzato z Kurz, Burri a Djonov 2003).

Zdá se, že tento způsob angiogeneze je převažujícím mechanismem vzniku cév při vývoji, kdy je třeba zvětšit komplexitu krevního řečiště i při remodelaci cévního řečiště a stromovém větvení cév (Djonov *et al.* 2000). S věkem sloupků ubývá, jak bylo ukázáno na myokardu a plicích u potkana. V případě myokardu byla navíc pozorována změna tvaru interkapilárního oka, které se v dospělosti v důsledku prodlužování svalových vláken stávalo více trojúhelníkovitým a protáhlým (Patan *et al.* 1991).

Třetí typ angiogeneze se realizuje podélným dělením. Často je zaměňován s angiogenezí *vchlípacím* a naopak. Na rozdíl od ní je však anisotropická (nové cévy si zachovávají stejný směr jako původní řečiště) a možná proto je vyžadovaná menší proteolytická změna ECM (převzato z Egginton 2009).

## 2.2. Angiogenní faktory

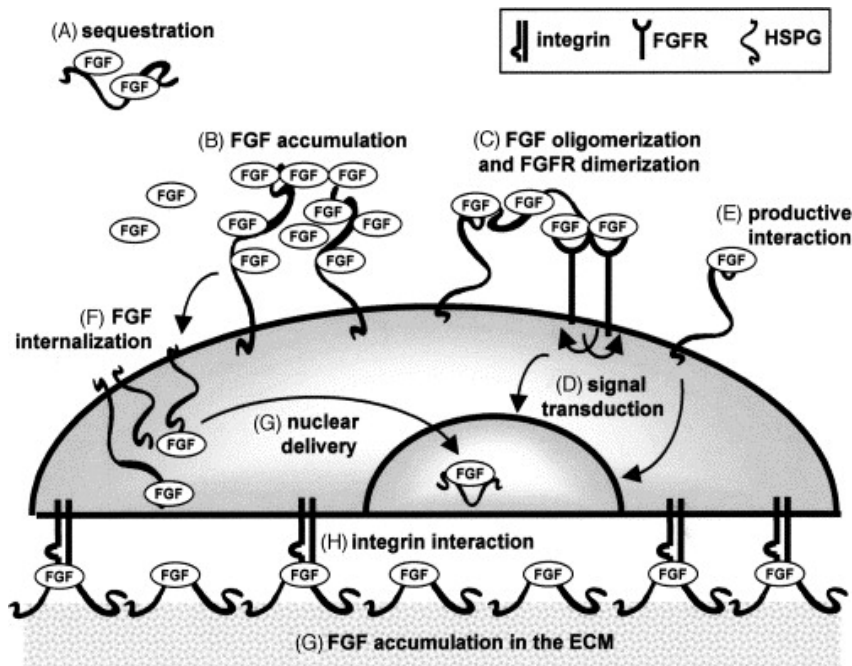
Správný růst a remodelace cév jsou závislé na mnoha krocích, zahrnující degradaci a opětovnou tvorbu ECM, diferenciaci, mobilizaci, migraci a proliferaci účastnících se buněk; jejich vzájemnou komunikaci i komunikaci s extracelulárním prostorem a v neposlední řadě také mechanismy, které tyto činnosti regulují a udržují tak angiogenezi ve fyziologické normě. Řídicími elementy těchto reakcí jsou různé růstové faktory, cytokiny a další signální



molekuly, které jsou exprimovány a secernovány buňkami citlivými na proangiogenní podnět (EC, pericyty, monocyty) a dále ho svými vzájemnými interakcemi rozvíjejí. Takovým proangiogenním podnětem může být elektrické dráždění, mechanický a zánětlivý stres a v neposlední řadě i hypoxie (převzato Hudlicka 1982). Ačkoli se faktory ovlivňující angiogenezi obecně rozdělují na pozitivně a negativně regulující, jen jejich optimální zastoupení nakonec vede k angiogennímu procesu. Na tomto místě se budu zabývat nejdůležitějšími z nich.

### 2.2.1. Fibroblast růstový faktor (FGF)

Rodina FGF čítá na 23 členů, z nichž nejvýznamnější je FGF1 (aFGF- *acidic*) a FGF2 (bFGF- *basic*). Na rozdíl od některých dalších členů není jejich N-sekvence odštěpitelná, což je nezbytný krok k jejich sekreci a není tedy jasné, jakým způsobem dochází k jejich uvolňování do ECM. Mezi jejich producenty patří např. makrofágy a EC.



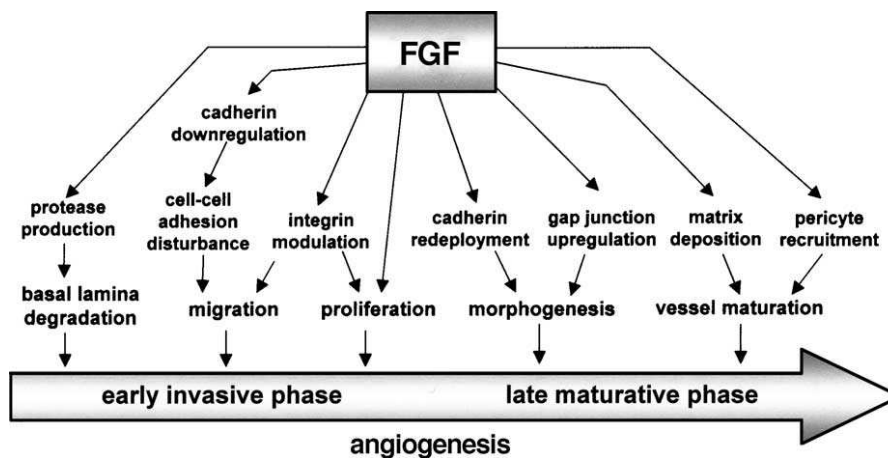
Obr. 2. Mechanismy signalizace FGF: A: volná molekula B: hromadění FGF C: FGF oligomerizace a FGFR dimerizace D: přenos signálu E: produktivní interakce F: internalizace FGF G: přenos do jádra H: interakce s integrinem I: FGF akumulace v extracelulární matrix (ECM), (Itoh a Ornitz 2004).

FGF jsou heparin vázající růstové faktory a aktivují FGF receptory s tyrosin kinásovou aktivitou (FGFR) skrze asociaci s heparan sulfát glykosaminoglykan (HSPG), (obr. 2), který se nachází na povrchu téměř všech buněčných typů, včetně endotelia, kde se vyskytuje v podobě membránově asociovaného receptoru, dále jako součást ECM, či jako volná molekula. Heparin se pak nachází v krevním oběhu během zánětu a váže FGF s nižší afinitou, než předchozí. Vazba na volný heparin či HSPG snižuje titr FGF, kterého se pak

nedostává k aktivaci FGFR. Naopak s buňkou asociované heparin a HSPG jsou nezbytné pro správnou vazbu FGF na FGFR, vyvolávají internalizaci FGF a mohou sami spouštět signální odpověď. Jejich množství se v endotelu zvětšuje působením hypoxie. HSPG nacházející v ECM pak zvyšují lokální koncentraci a navozují dlouhodobou stimulaci EC. Jsou známy čtyři typy FGFR, z nichž FGFR1 a FGFR2 mají afinitu k angiogenním FGF1, FGF2 a FGF4 zatímco FGFR3 a FGFR4 nebyly nikdy v endotelu nalezeny. Aktivace FGFR1 nebo FGFR2 vede k aktivaci několika signálních kaskád, jako důsledek jejich autofosforylace. Ovšem aby došlo k plně FGF2 indukované mitogenní aktivaci, je zapotřebí nejen aktivace MAPK signální dráhy, ale také dlouho trvající aktivace protein kinázy C (PKC).

### 2.2.1.1. Role v angiogenezi

Angiogenní vliv FGF je komplexní (obr. 3). Stimulují proliferaci EC, jejich migraci, produkci kolagenázy a aktivátoru plasminogenu (uPA) a modulaci exprese adhezních molekul, například kadherinů a různých integrinů, včetně  $\alpha_v\beta_3$ , které hrají podstatnou roli při migraci ECM a dále při maturaci cév vznikem endotel-endotel kontaktů. Zvyšuje také produkci oxidu dusnatého (NO).



Obr. 3. Přehled účinků FGF v angiogenezi, (převzato z Itoh a Ornitz 2004).

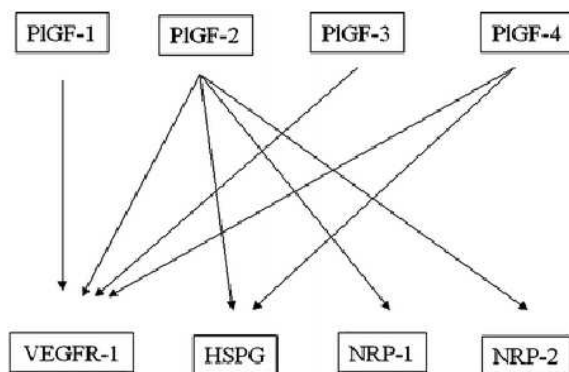
Stimulovaný uPA konvertuje plasminogen na plasmin, serin proteázu, která degraduje fibrin a další složky ECM a aktivuje mnohé metaloproteinázy (MMP), enzymy remodelující ECM, jako stromelysin-1 (MMP-3), kolagenázu-1 (MMP-1) a kolagenázu IV. typu (MMP-2 a MMP-9). Navíc FGF modifikuje expresi uPA receptoru na endoteliálním buněčném povrchu, což umožňuje lokalizovat proteolytickou aktivitu do čela migrace. FGF1 a FGF2 indukují také expresi inhibitoru aktivátoru plasminogenu (PAI)-1, který tuto reakci udržuje v rovnováze. Produkce uPA není závislá na PKC dráze.

Stimulace endoteliálních buněk FGF2 vede k sekreci MMP-2 a MMP-9 spolu s dvěma MMP inhibitory TIMP-1 a TIMP-2 (tkáňové inhibitory metaloproteináz). Ty po přidání k EC umístěných na rozpuštěné BM indukují formování kapilárám podobných struktur (zkráceno z přehledů Presta *et al.* 2005, Itoh a Ornitz 2004, Egginton 2009).

## 2.2.2. Růstový faktor endotelia cév (VEGF)

Rozeznáváme šest členů rodiny VEGF proteinů, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E a placentární růstový faktor (PlGF). Ty pak alternativním sestřihem dávají vzniknout dalším isoformám, lišících se afinitou a sekrečními vlastnostmi.. Ačkoli se i ostatní VEGF jistou měrou účastní na angiogenních procesech, nejdůležitější roli hraje VEGF-A a PlGF. VEGF je produkován pericyty, EC a mnoha dalšími tkáňovými buňkami, jako například kosterním svalu. PlGF je sekretován trofoblastickými obřími buňkami během časné embryogeneze, ale vyskytuje se i v jiných orgánech, např. srdci, plicích, štítné žláze, kosterním svalu a tukové tkáni a ve velkém množství je produkován aktivovanými EC a zánětlivými buňkami.

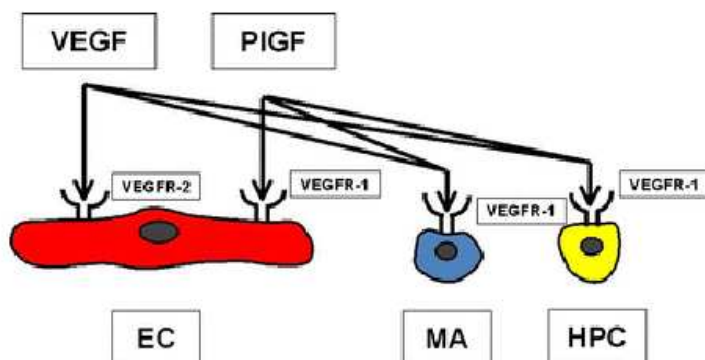
Receptory pro VEGF (VEGFR) mají taktéž tyrosin kinásovou aktivitu a jsou exprimovány na EC, hematopoetických kmenových buňkách, monocitech a neuronech. VEGF-A se váže na VEGFR1 (Flt-1) a VEGFR2 (Flk-1/KDR). Právě VEGFR2 se zdá být hlavním receptorem odpovědným za proangiogenní účinek VEGF-A. PlGF se pak váže na VEGFR1 a další pomocné receptory (obr. 4).



Obr. 4. Vazba PlGF isoform na VEGFR-1 a koreceptory HSPG a neuropilin (NRP): PlGF-2 obsahuje sekvenci schopnou s vysokou afinitou vázat heparin, který je nezbytný pro vznik přídavné vazby s neuropilinem, nesignalizujícího koreceptoru VEGF proteinů. PlGF-4 má také heparin vazebnou doménu, avšak vazby na neuropilin není schopen, (převzato z Ribatti 2008).

Ačkoli se na VEGFR1 váží i jiné isoformy VEGF, pouze PlGF je schopen indukovat autofosforylaci kináz. Působení PlGF na angiogenezi je tedy přičítáno přímému působení přes VEGFR1 a/nebo vytěsněním VEGF z VEGFR1 a tím umožnění jeho vazby na VEGFR2 a/nebo vazbě na VEGFR1, která vede ke zvýšení citlivosti působení VEGF přes VEGFR2 a/nebo využitím monocytů či makrofágů a/nebo mobilizací hematopoetických progenitorů

z kostní dřeně (obr. 5). VEGF spolu s PlGF mohou vytvářet heterodimery, které nemají takovou schopnost aktivovat fosforylaci VEGFR2, ovšem ve vysokých koncentracích se projevuje jejich inhibiční efekt na angiogenezi. Dimerizace a následná autofosforylace VEGFR vede k signálním kaskádám zahrnující aktivaci fosfoinositid-3-kinázy (PI<sub>3</sub>K), fosfolipázy C (PLC)  $\gamma$  a PKC. Mezi další vazebné proteiny patří solubilizovaný VEGFR1 (sFlt-1), který snižuje volný VEGF v oběhu a zřejmě zpětnovazebně reguluje hladinu VEGF.



Obr. 5. Schéma interakce VEGF a PlGF a jejich působení na endoteliální buňky (EC), makrofágy (MA) a hematopoetické progenitory (HPC); (převzato z Ribatti 2008).

### 2.2.2.1. Role v angiogenezi

VEGF je hlavní aktivátor endoteliální proliferace a mobility. Zvyšuje expresi MMP a uPA. Mobilizuje intracelulární vápník a aktivuje endoteliální syntázu oxidu dusnatého (eNOS) a její produkci NO a působí tedy vasodilatačně. NO navíc může recipročně aktivovat produkci VEGF. VEGF je podstatný pro tvoření pupenů (*sprouts*) a formování cévních trubicovitých struktur. Zdá se, že jeho absence je naopak podstatná pro indukci angiogeneze *vchlipováním*. PlGF je primárně exprimován v placentě a jeho produkce je zvýšena v patologických podmínkách, např. v ischemii a zřejmě se nepodílí na fyziologické angiogenezi ani ve vývoji ani v dospělosti. Předpokládá se, že jeho role v angiogenezi je spíše modulační, navzdory tomu je však nezbytný v mobilizaci makrofágů a správné zánětlivé reakci. Zvyšuje produkci protizánětlivých interleukinů IL-1 $\beta$ , IL-8 a monocytní chemoatraktivujícího proteinu-1 (MCP-1) a možná i monocytní produkci VEGF (zkráceno z přehledů Fong 2008, Otrock *et al.* 2007, Ribatti 2008, Egginton 2009, Hillen a Griffioen 2007).

### 2.2.3. Angiopoetiny (Ang)

Rodina Ang obsahuje čtyři isoformy: Ang-1, Ang-2, Ang-3 a Ang-4. V posledních letech pak byly objeveny proteiny podobných struktur, nazývaných angiopoetinu-podobné proteiny (Angptl). Ang-2 je lokálně exprimován v dorzální aortě, v dospělosti pouze v místě

cévní remodelace, Ang-1 je lokalizován již v časně embryogenezi v myokardu a pozdním mezenchymu obklopující cévy.

Receptory pro Ang jsou Tie receptory s tyrosin kinásovou aktivitou, které jsou exprimovány ve velkém množství v embryonálním endotelu cév, angioblastech a endokardu, u dospělců v plicních cévách a naopak velice málo endokardu. Všechny čtyři Ang se váží na Tie-2. Tie-1 váže s velmi malou afinitou Ang-1 a Ang-4 a aktivace Tie-2 tuto vazbu zesiluje. Je otázkou, zda je tato synergie důmyslným regulačním mechanismem, či ligand Tie-2 nebyl dosud objeven. Recentní studie též poukazují na nezbytnost VEGF indukovaného štěpení Tie-1 v aktivaci Tie-2, které zlepšuje vazbu Ang-1 na heterodimer Tie-1:Tie-2, či bez přítomnosti ligandu vede k fosforylaci Tie-2 (Singh *et al.* 2009). VEGF je navíc odpovědný za indukci Tie-1 exprese (McCarthy *et al.* 1998). Receptory pro Angptl zatím také nejsou známy.

### **2.2.3.1. Role v angiogenezi**

Tie-1 je nezbytný pro integritu a přežití EC během angiogeneze a jeho deficiencie vede k otokům a krvácením a nakonec k úmrtí plodu. Tie-2 je naopak nezbytný pro pučení a větvení cév a jeho deficiencie končí také smrtí plodu. Ang-1 se podílí na migraci EC, adhezi a začlenění pericytů a buněk hladké svaloviny a vede k udržení cévní integrity. Zdá se, že během krátké doby embryonálního vývoje je odpovědný za tloušťnutí cév svým mitogenním působením na endotel, který ovšem nebyl v dalších fázích vývoje zaznamenán. Ang-2 je jeho antagonistou, cévy destabilizuje a zabraňuje nadměrnému pučení a větvení jejich rozkladem. In vitro však také po dlouhé expozici může vyvolat fosforylaci Tie-2 a indukovat migraci a pučení EC (zkráceno z přehledů Hillen a Griffioen 2007, Otrrock *et al.* 2007, Morisada *et al.* 2006).

### **2.2.4. Destičkový růstový faktor (PDGF)**

PDGF se vyskytují buď jako heterodimery (PDGF-AB), nebo jako homodimery (PDGF-AA a PDGF-BB) složených z řetězců A a B. Jsou produkovány mnoha buněčnými typy, včetně fibroblastů, buněk hladké svaloviny cév, EC, makrofágů a krevních destiček. PDGF receptory (PDGFR) jsou strukturně podobné  $\alpha$ - a  $\beta$ -receptory s tyrosin kinásovou aktivitou. PDGF- $\alpha$  váže s vysokou afinitou oba A- a B- řetězce, zatímco  $\beta$ -receptor váže s vysokou afinitou pouze B-řetězec. Z toho vyplývá, že PDGF-AA vyvolává vznik  $\alpha\alpha$  dimeru, PDGF-AB  $\alpha\alpha$  a  $\alpha\beta$  dimerů a PDGF-BB všechny kombinace  $\alpha$ - a  $\beta$  receptoru. Exprese receptorů není konstantní a je závislá na působení dalších faktorů. Zvýšená exprese

PDGFR- $\beta$  je typická pro pučící endotel či další složky pojivové tkáně během zánětu. Spolu s PDGFR- $\alpha$  stoupá také v děloze a pochvě pod vlivem estrogenů. FGF-2 zvyšuje PDGFR- $\alpha$  v buňkách hladké svaloviny cév a transformující růstový faktor (TGF)- $\beta$  a PKC ji ve fibroblastech a mezenchymálních buňkách snižuje. PDGF také interagují s dalšími matrixovými molekulami a rozpustnými proteiny, např. 2-makroglobulinem, který váže PDGF-BB, nikoli však PDGF-AA, PDGF-asociovaným proteinem (PAP), který svou nízkou afinitní vazbou zvyšuje účinek PDGF-AA, ovšem potlačuje účinek PDGF-BB a také s rozpustnou částí  $\alpha$ -receptoru, nacházející se v plasmě.

#### **2.2.4.1. Role v angiogenezi**

PDGF-B/PDGFR- $\beta$  signální dráha je nezbytná pro začlenění pericytů do nově formovaných cév. Stimuluje proliferaci pericytů a buněk hladké svaloviny, způsobuje chemotaxi a její zablokování vede ke krvácení, spojené s nedostatečným dozráním a integritou cévní stěny. Aktivace PDGFR- $\alpha$  má také mitogenní účinky a i přes své chemoatrakční působení inhibuje migraci fibroblastů a buněk hladké svaloviny. Stimulace produkce PDGF-AB v mikrovaskulárních buňkách srdce vede k indukci VEGF a VEGFR2 a podání PDGF-BB vede ke vzniku funkčních anastomoz (zkráceno z přehledů Otrrock *et al.* 2007, Heldin a Westermark 1999).

#### **2.2.5. Další faktory**

Mezi další angiogenní faktory patří MCP-1, který zprostředkovává proliferaci EC a po jeho aplikaci transendokardiálně zlepšuje kolaterální perfúzi a fungování srdce v ischemii. Integriny, povrchové adhezní molekuly zprostředkovávají výměnu informací mezi endoteliem a ECM. TGF $\beta$  v nízkých koncentracích zvyšuje angiogenní faktory a proteinázy, zatímco ve vysokých koncentracích inhibuje endoteliální růst, podporuje přestavbu BM a stimuluje diferenciaci a integraci buněk hladké svaloviny. Nádory nekrotizující faktor (TNF) - $\alpha$  ulehčuje působení VEGF a FGF-2. Podstatnou roli druhého posla hraje NO. Jeho produkce je zvyšována mnoha angiogenními faktory (VEGF, TGF $\beta$ , FGF) a je nezbytný pro jejich angiogenní působení. NO také může tlumit produkci angiotensinu, proteinu vznikajícího štěpením plasminogenu působením MMP a jiných proteáz a vyžadujícího extracelulární redukci disulfidických můstků fosfoglycerát kinásou (PGK), (zkráceno z přehledů Otrrock *et al.* 2007, Lay *et al.* 2002, Morbidelli, Donnini a Ziche 2003, Egginton 2009, Tomanek, Zheng a Yue 2004).

### 3. HYPOXIE

Stav, kdy se celému organismu či určité oblasti nedostává kyslíku v dostatečné míře, označujeme jako hypoxii. Ačkoli většina tkání existuje při  $pO_2$  převyšujícím 20 mmHg, jsou i takové, které bez problémů fungují i v nižších parciálních tlacích. Mezi přirozeně hypoxické tkáně patří např. buňky pericentrální vény jater, či myokard při zátěži (Dewhirst, Cao a Moeller 2008), přičemž jeho klidová dodávka se pohybuje mezi 30 a 50 mmHg (Matschke *et al.* 2005). Dá se tedy předpokládat, že odpověď různých tkání na hypoxický stres o různé intenzitě, se bude lišit.

Dostatečný příjem kyslíku je přitom nezbytný k udržení životních funkcí a není proto divu, že v průběhu evoluce se vytvořily mechanismy, které detekují hladinu kyslíku v krvi a tkáních, aktivně regulují jeho hladinu v závislosti na spotřebě a v neposlední řadě je přizpůsobují jeho nedostatku.

Původně se předpokládalo, že za detekci hladiny kyslíku v organismu jsou odpovědné pouze speciální chemoreceptorové buňky karotidových a neuroepiteliálních tělísek nacházející se v dýchacím a krevním řečišti. Hypoxií indukovanou inhibicí  $K^+$  kanálů dochází v těchto buňkách k depolarizaci a přenosu signálu do prodloužené míchy, která zprostředkuje změny krevního tlaku, srdečního tepu a dýchací frekvence. Dnes již ale není pochyb, že schopnost detekovat koncentraci kyslíku a odpovídat na ni, má každá savčí jaderná buňka (Semenza 1999).

Kompenzace hypoxických podmínek aktivuje mechanismy, které vedou k zefektivnění metabolismu a energetického hospodaření a dále ke zvětšení schopnosti přenášet kyslík. Tyto reakce jsou rychlé, ovšem jejich účinnost při dlouhotrvající hypoxii je omezená. Dlouhodobějším řešením dostatečného zásobení kyslíkem během hypoxie je pak růst nových cév, či remodelace stávajícího řečiště (Covello a Simon 2004). Některé z konkrétních příkladů akutní a chronických odpovědí na hypoxii jsou uvedeny v tab. 1.

Tab.1. Příklady akutní a chronické odpovědi na hypoxii, (převzato z Semenza 1999)

<b>Akutní</b>	<b>Chronická</b>
zvýšení srdečního výdeje	srdeční hypertrofie
vazodilatace systemické artérie	neovaskularizace
vazokonstrikce plicní artérie	plicní remodelace cév
snížení aktivity $K^+$ kanálu	snížení kanálu $K^+$ (mRNA/proteinu)
snížení aktivity glykolitických enzymů	zvýšení glykolitických enzymů (mRNA/proteinu)

Tradičně se hypoxie dělí na čtyři typy: *hypoxickou (anoxickou)*, která se vyznačuje sníženým parciálním tlakem kyslíku v arteriích, *anemickou*, kdy je množství hemoglobinu schopného transportovat kyslík sníženo, *ischemickou (stagnační)*, při které je snížen průtok krve natolik, že není schopen dodat dostatek kyslíku, a *histotoxickou*, kdy je hladina přiváděného kyslíku v normě, ale tkáň jej není schopna využít vzhledem k již vzniklému poškození toxickými látkami.

### **3.1. Působení hypoxie na myokard**

Detailní souhrn hypoxií vyvolaných morfologických a fyziologických změn srdce je poměrně komplikovaný, neboť v literatuře existuje mnoho experimentálních modelů, které se liší nejen použitým druhem hypoxie (viz. výše), délkou jejího trvání a jejím stupněm, ale i druhem zvířete, jeho pohlavím, či stářím. Zaměřuji se tedy na výškovou hypoxii, která se často využívá ke studiu hypoxie v experimentálních podmínkách, a která bude modelem pro moji diplomovou práci.

Přirozeným modelem pro výzkum výškové hypoxie je vysokohorské prostředí, které může být simulováno v laboratorních podmínkách normobarickými (řízená změna složení plynů) a hypobarickými (snížení  $pO_2$  částečným odčerpáním vzduchu) komorami. Tyto modely umožňují studovat příznivé i nepříznivé adaptační změny. Příznivým dopadem hypoxie zvýšená tolerance srdečních buněk k ischemii (Ostadal a Kolar 1999).

Negativním dopadem tohoto modelu je vznik plicní hypertenze. Hypoxie působí jako stimulus pro remodelaci plicních cév, která vede ke zvýšení jejich rezistence. Zvyšuje tak celkový odpor plicního oběhu, který následně pravá komora při své činnosti překonává. Vyrovnává se tedy nejen se sníženou dostupností kyslíku, ale současně se zvýšeným mechanickým stresem. Dopady hypoxie jsou tedy rozdílné u levé (LV) a pravé komory (RV), a proto je třeba je zkoumat odděleně. Ačkoli se výsledky studií v některých aspektech liší, můžeme obecně říci následující:

Se zvyšující zátěží RV dochází k její hypertrofii (Setty *et al.* 2008, Rumsey *et al.* 1999, Nouette-Gaulain *et al.* 2005), která je způsobena v srdci dospělého zvětšováním průměru myocytů v důsledku zvýšené proteinové syntézy, nikoli buněčnou proliferací, typickou spíše pro srdce nezralé (Sharma *et al.* 2004).

Následkem tlakového přetížení dochází ke zvýšené produkci extracelulárních proteinů, zejména kolagenu I a III (Chouabe *et al.* 2002, Pelouch *et al.* 1997). ECM udržuje integritu srdeční architektury, slouží jako ochrana myocytů před vysokými tlaky srdečních dutin (Factor *et al.* 1988), spojuje navzájem myocyty a tím napomáhá synchronizaci a zefektivnění



kontraktilního stahu, kdy jejich elastické napětí následně přispívá ke svalové relaxaci (Factor a Robinson 1988). Zvyšující se podíl kolagenu naopak snižuje elasticitu myokardu (Jalil *et al.* 1989), snižuje vazodilatační kapacitu koronárních cév (Schwartzkopff *et al.* 1993) a je spojováno se vznikem srdečních dysfunkcí a selhání.

V některých případech dochází také k hypertrofii LV (Pelouch *et al.* 1997, Lee *et al.* 2006), která je ovšem dávána do souvislosti se zvyšujícím smykovým napětím jako důsledku zvýšeného hematokritu (Nakanishi *et al.* 2002), či aktivací adrenergní signalizace v reakci těla na hypoxický stres (převzato z Ostadal a Kolar 2007).

Mění se také exprese a aktivita dalších metabolických enzymů, jako např. cytochromu c (Lee *et al.* 2006), což napomáhá efektivnějšímu využití energetických zdrojů za hypoxických podmínek. Dále se aktivuje anaerobní oxidace glukózy na úkor oxidace mastných kyselin (Sharma *et al.* 2004) a hlavním zdrojem se stává glykogen (Opie 1969). Negativním dopadem anaerobní glykolýzy je však zvyšování protonů, které kompetují s vápníkem o vazbu s kalmodulinovým komplexem a snižují srdeční kontraktilitu (prof. Pelouch ústní sdělení).

Omezení energetického výdeje při stahu se uplatňuje změnou zastoupení isoform těžkých řetězců myosinu (MHC), kdy je u dospělého potkana dominantní  $\alpha$ -MHC isoforma částečně nahrazena  $\beta$ -MHC isoformou s nižší ATPásovou aktivitou (Nakanishi *et al.* 2002).

Dochází také ke změně složení membrán. Ačkoli ty se mezi LV a RV mírně liší, předpokládá se, že společným jmenovatelem je právě hypoxický stimulus (Jezkova *et al.* 2002). Mění se vodivost některých iontových kanálů ( $I_{to1}$ ,  $I_{Ca,L}$ ), (Chouabe *et al.* 1997, Chouabe *et al.* 2002) a tím se prodlužuje trvání akčního potenciálu (Chouabe *et al.* 1997). Navíc dochází ke snížení exprese Ca-ATPázy2a sarkoplazmatického retikula (SERCA2a), (Sharma *et al.* 2004) a k dalším modifikacím její činnosti následnou fosforylací (Xie *et al.* 2005). To vše vede k prodloužení doby trvání zvýšené koncentrace vápenatých iontů v cytoplazmě a kompenzuje tak snížení svalové kontraktility.

Ačkoli existuje celá řada studií dokládající angiogenezi (k níž dochází spíše přestavbou a zřídka pučením (Mitsuma *et al.* 2007)) a zvýšenou expresi angiogenních faktorů v ischemickém myokardu (Li *et al.* 1996, Willam *et al.* 2006, Matsunaga *et al.* 2003), dokladů o způsobu vazkularizace a remodelace cév v RV a LV dospělého srdce na modelu výškové hypoxie je poskromnu. Na modelu potkanů od narození vyrůstajících v hypoxii odpovídající 3500 m.n.m. bylo v RV zjištěno zvýšení hustoty kapilár a snížení hustoty svalových vláken a poměru svalových vláken ku kapilárám. Tyto změny nebyly v LV detekovány. U obou však byl zvětšen průměr svalových vláken, ačkoli u RV výrazněji (Turek, Kreuzer a Grandtne

1972). Difúzní vzdálenost (tj. max. oblast, která je dostupná pro kyslík přivedený určitou cévou) u LV se také nezměnila, zatímco difúzní vzdálenost u RV byla kratší (Grandtne, Turek a Kreuzer 1974). Jestliže dochází v obou komorách ke zvětšení průměru svalových vláken a tedy ke zvětšování vzdálenosti myocytů a kapilár a difúzní vzdálenost LV přesto zůstala zachována, dá se předpokládat, že k angiogenezi dochází v malé míře i v LV, ačkoli tento proces je dominantní v RV. To potvrzuje i studie na potkanech chovaných 34 dní při  $pO_2$  380 mmHg ( 10,5 %), která zaznamenala nárůst poměru kapilár ku počtu svalových vláken v RV nikoli v LV. Hustota cév se však s ohledem na dvojnásobný nárůst objemu svalových vláken snížila (Clark a Smith 1978). Recentní studie (Deindl *et al.* 2003) navíc ukázala zvýšenou expresi VEGF a TGF $\beta$  v obou komorách, ovšem nárůst VEGFR2 byl zaznamenán pouze v RV. Je tedy otázkou do jaké míry se liší citlivost růstu cév LV a RV a zda je tento rozdíl dán molekulárně-morfologickými odlišnostmi obou komor, zvýšenou mechanickou zátěží RV, zátěží prohloubenou hypoxií RV, či kombinací některých z uvedených faktorů.

## **3.2. Signální dráhy indukované hypoxií**

### **3.2.1. HIF: hypoxií indukovaný faktor**

V roce 1992 byla poprvé popsána molekula *hypoxií indukovaného faktoru* (HIF), aktivujícího signalizační kaskády spuštěné působením hypoxie (Semenza a Wang 1992). Od té doby bylo mnohé poznáno o její struktuře, isoformách, biologických a molekulárních funkcích i procesech, které bezprostředně s funkcí HIF souvisí, jde o schopnosti detekce hladiny kyslíku a aktivaci adaptačních procesů buňky na jeho sníženou hladinu. Dnes je tento transkripční faktor považován za centrální regulátor buněčných reakcí za sníženého příjmu kyslíku a klíčovým transkripčním faktorem mnoha angiogenních faktorů a jiných významných genů.

#### **3.2.1.1. Rodina HIF proteinů a jejich role v prenatálním a postnatálním vývoji**

Z rodiny HIF proteinů rozeznáváme tři HIF $\alpha$  podjednotky (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ /HLF/EPAS-1, HIF-3 $\alpha$ ) a tři HIF $\beta$  podjednotky (HIF-1 $\beta$  /ARNT, ARNT2, ARNT3). Beta podjednotky jsou receptory jaderného translokátoru a jsou v závislosti na hladině kyslíku stabilní, naproti tomu, alfa podjednotky jsou v přítomnosti kyslíku ve většině případů rychle degradovány. Podjednotka HIF $\alpha$  spolu s HIF $\beta$  dimerizuje, což je nezbytný předpoklad pro jeho transkripční aktivitu. Jednotlivé podjednotky se od sebe liší a to jak místem a mírou

exprese, tak schopností reagovat na hladinu kyslíku a vzájemně tvořit dimery. Tyto odlišnosti zřejmě hrají významnou roli při citlivé reakci tkáně a jemném nastavení zpětnovazebných, regulačních mechanismů při morfogenezi a jiných fyziologických či patologických stavech, kdy dochází k hypoxii. Studie skupiny Jaina (Jain *et al.* 1998) jasně ukazuje časové i místní rozdíly exprese jednotlivých HIF podjednotek v průběhu embryogeneze u myši.

HIF-1 $\alpha$  je nejvíce prozkoumaným proteinem. Byla na něm poprvé popsána struktura a nejpodstatnější způsob regulace HIF proteinů proteosomální degradací. Spolu s HIF-1 $\beta$  jsou běžné ve všech buněčných typech, na rozdíl od HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ , ARNT2, ARNT3, které jsou více specifické pro určitou tkáň. Wiesener *et al.* (2002) detekoval zvýšenou koncentraci HIF-2 $\alpha$  za hypoxických podmínek v myokardu, epitelu ledvin, a neparenchymální tkáni mozku či pankreatu. V embryu pak byla nalezena zvýšená hladina mRNA HIF-2 $\alpha$  např. v endotelu mozkových i jiných cév a bronchiálním epitelu (Flamme *et al.* 1997).

Rozdílnou funkci můžeme také sledovat na knock-down modelech. Kompletní ztráta HIF-1 $\alpha$  u HIF-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup> myši vedla k fatálním poruchám nervové trubice, malformacím cévní soustavy a výrazné buněčné smrti buněk cephalického mezenchymu (Iyer *et al.* 1998). To je nejspíše zapříčiněno buněčnou smrtí mezenchymálních buněk neurální lišty (Kotch *et al.* 1999), které slouží jako progenitory pericytů, nezbytných pro cévní integritu. Naproti tomu, HIF-1 $\alpha$ <sup>+/-</sup> myši se za normoxických podmínek vyvíjí normálně bez žádných rozdílů oproti kontrole. Během hypoxie (10% O<sub>2</sub>, 1-6 týdnů) u nich však dochází ke zpoždění zvýšení hematokritu a tlaku pravé komory, relativnímu nárůstu pravé komory vzhledem k levé a septu, úbytku tělesné hmotnosti, aj. oproti kontrole (Yu *et al.* 1999).

Výsledky pokusů na HIF-2 $\alpha$ <sup>-/-</sup> myších ukázaly mnohočetné orgánové patologie (retinopatii, srdeční hypertrofii, jaterní steatózu, myopatii kosterních svalů, ztrátu pohyblivosti spermií), biochemické abnormality (mitochondriální anomálie, hypoglykémie, laktózová acidóza, pozměněný Krebsův cyklus, snížená oxidace mastných kyselin) a změny v genové expresi. U části pokusných zvířat však tyto poruchy nebyly letální a zvířata se dožila dospělosti. Docházelo také ke snížení exprese primárních antioxidantů (katalázy, glutathion peroxidázy 1 a superoxid dismutáz (SOD)) a nárůstu reaktivních forem kyslíku (ROS), o jejichž významu v buněčné signalizaci bude pojednáno později. Podání SOD v prenatalním i postnatalním stádiu pak vedlo k eliminaci mnohých negativních důsledků HIF-2 $\alpha$  deficience a zdá se tedy, že HIF-2 $\alpha$  hraje důležitou roli při homeostázi ROS (Scortegagna *et al.* 2003). Byly však popsány případy, kdy HIF-2 $\alpha$  deficience vedla k letálním poruchám cév, doprovázenou sníženou expresí Tie-2 receptoru (Duan, Zhang-Benoit a Fong 2005), tvorbě

fetálního syndromu respirační tísně, který je charakterizován nedostatečnou tvorbou plicního surfaktantu jako důsledku sníženého titru VEGF (164) a VEGF (188), který k jeho tvorbě stimuluje pneumocyty typu 2 (Compernelle *et al.* 2002). Neboť HIF-2 $\alpha$  ovlivňuje expresi i dalších angiogenních faktorů, jako VEGFR1, VEGFR2, eNOS a erythropoetin (Epo), (Fong 2008), dá se předpokládat jeho účast na angiogenezi. Peng *et al.* (2000) ukazuje na modelu HIF-2 $\alpha$ <sup>-/-</sup> myši neschopnost správné fúze cév, za vzniku cév větších a spíše než v procesu vazkulogeneze samotné, předpokládá úlohu HIF-2 $\alpha$  v následné remodelaci. Navíc další studie (Tian *et al.* 1998) nezaznamenala žádný rozdíl ve vývoji cév a letální důsledky přičítala nedostatečné produkci katecholaminů fetálními paraganglii (Zuckermandlův orgán) které jsou jejich hlavním zdrojem ve fetálním stádiu, zejména v časně embryogenezi, kdy ani sympatické nervy ani dřeň nadledvin dosud nejsou vyvinuty. Přitom katecholaminy jsou nezbytné pro normální kardiovaskulární činnost. Letální důsledky, které se po podání prekurzorů katecholaminů neprojeví, jsou pak zřejmě důsledkem vzniklé bradykardie. Příčina takto kontroverzních výsledků však není známa.

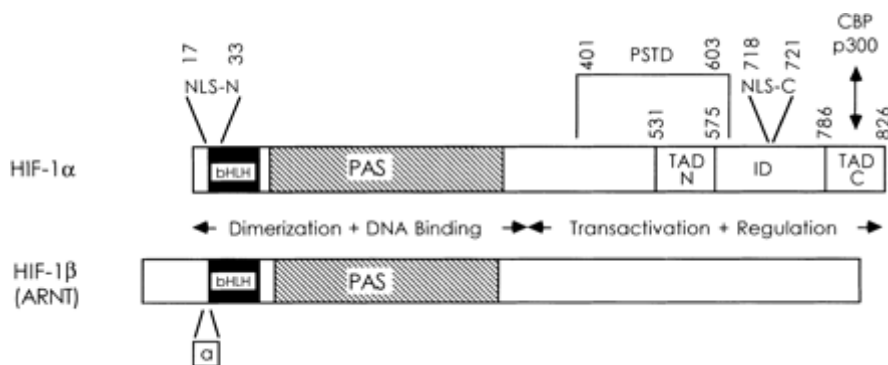
Vliv knock-down HIF-3 $\alpha$ <sup>-/-</sup> na vývoj nebyl dosud příliš studován. Studie japonského týmu ukazuje, že homozygotní mutanti HIF-3 $\alpha$ <sup>-/-</sup> jsou životaschopní, ale trpí hypertrofií pravé srdeční komory a nestandardní plicní přestavbou. U těchto zvířat byla také naměřena zvýšená hladina endotelinu-I (ET-1) a PDGF (Yamashita *et al.* 2008). Zdá se tedy, že významnou biologickou funkcí HIF-3 $\alpha$  je inhibice dalších alfa podjednotek, zřejmě kompeticí o vazbu s beta podjednotkou, či jiných regulačních molekul. Tomuto předpokladu odpovídá i výsledek studie, ve které bylo prokázáno, že za hypoxických podmínek 6% O<sub>2</sub> trvajících 6 h, podstupuje alternativní sestřih, kdy ztrácí oblasti schopné vázat se na HRE doménu (*hypoxia responsible element*), (Makino *et al.* 2002), dimer, který z této podjednotky pak vznikne, ztrácí svoji transkripční aktivitu. Beta podjednotek se nedostává pro vazbu jiných alfa podjednotek a tím je jejich vliv utlumen. Významná role HIF-3 $\alpha$  byla prokázána ve vztahu k srdečnímu preconditioningu (Portnychenko *et al.* 2008). Zůstává však otázkou, zda je tento efekt vyvolán jeho přímým působením na genovou expresi, či jeho regulační funkcí.

HIF se také významně účastní odpovědi na změny hladiny kyslíku během postnatálního stádia. Vztah a způsob regulace HIFu v závislosti na kyslíkových podmínkách bude načrtnut v kapitole věnující se regulaci. Ovšem z analýzy normoxických dospělých HIF-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup> myši vyplynulo, že exprese HIF-1 $\alpha$  v kardiomocyty je nezbytná pro udržení správné kontraktilní funkce srdce, její deficiencie vede k nedostatečné srdeční vazkularizaci

a zřejmě jako kompenzační mechanismus k udržení příjmu kyslíku vede ke ztenčení srdečních stěn a zmenšení průměru LV. Dochází také k poklesu ATP, laktátu a kreatinfosfátu a změně genové exprese snížením např. SERCA2, glukózového transportéru Glut-1 či PGK (Huang *et al.* 2004). HIF má tedy svůj význam nejen při hypoxii. Vysvětlením jeho aktivity v přítomnosti kyslíku může být existence přirozeně hypoxických tkání a také tkáňově specifické zastoupení jeho regulačních proteinů. Exprese HIF-1 $\alpha$  je také specificky zvýšena v oblasti hranice infarktu a HIF-2 $\alpha$  ve zbývající tkáni myokardu (Jurgensen *et al.* 2004), což nasvědčuje tomu, že HIF hraje důležitou roli ve snížení poškození myokardu a v adaptační remodelaci.

### 3.2.1.2. Struktura

HIF-1 $\alpha$  je považován za senzor hladiny kyslíku ve tkáni. V normoxickém prostředí degradován díky doménám, které umožňují jeho degradaci nebo inhibici za přítomnosti kyslíku. Jedná se o ODDD (*oxygen dependent degradation domain*), která obsahuje dva motivy pro prolyl hydroxylaci, bazické helix-loop-helix (bHLH) a PER-ARNT- SIM (PAS), na N-terminální konci transaktivační doménu (N-TAD) a na C-konci transaktivační doménu s asparagyl hydroxylačním místem (C-TAD). Za normoxických podmínek jsou aktivní hydroxylázy, které pro svoji aktivitu potřebují kyslík a 2-oxoglutarát jako kosubstrát k hydroxylaci dvou prolinových zbytků (Pro402 a Pro564) v oblasti ODDD a asparaginylový zbytek (Asp 803) na C-TAD doméně.



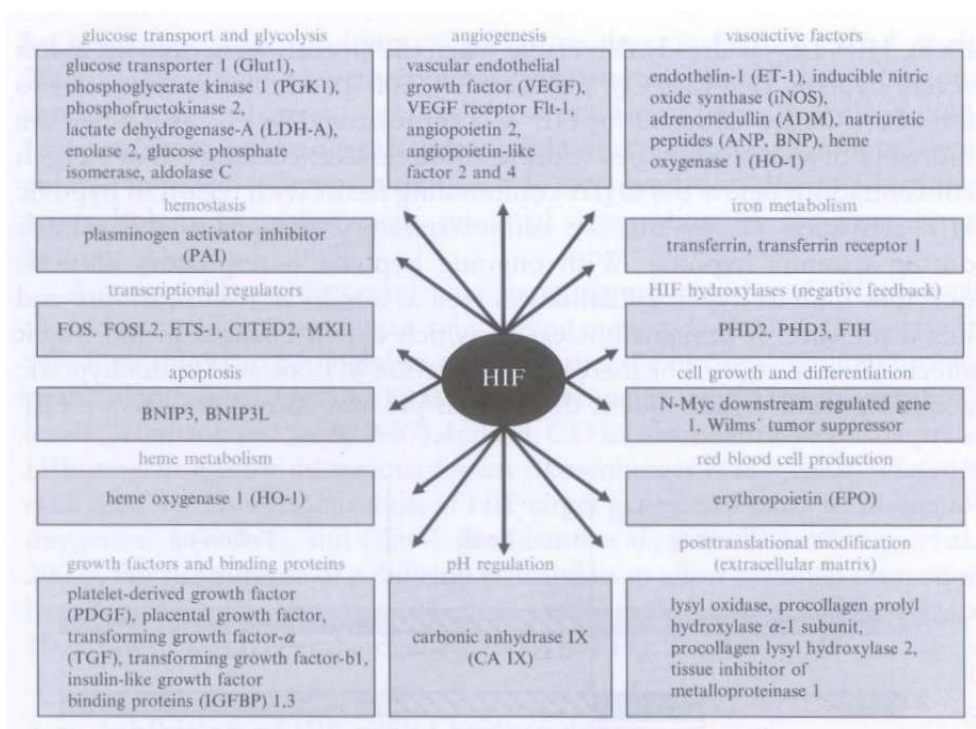
Obr. 6. Schématické znázornění HIF-1 $\alpha$  a HIF-1 $\beta$ : bHLH: bazický helix-loop-helix, PAS: PER-ANT-SIM homologie, TAD C/N: transaktivační doména C/N-konce; NLS-C/N: přídatné regulační domény C/N- konce, CBP/p300: transkripční koaktivátory, (převzato Semenza 2000).

Zmíněné dvě domény bHLH a PAS jsou společné všem HIF proteinům a jsou nezbytné pro tvorbu heterodimerů a tedy jejich vazbu na DNA. Mezi další oblasti popsané na HIF-1 $\alpha$  a potvrzené u HIF-2 $\alpha$  patří amino- a karboxy- terminální jaderný signál (NLS-N, NLS-C), který umožňuje lokalizaci proteinu z cytoplasmy do jádra, prolin-serin-threonin-

bohatou stabilizační doménu (PSTD), amino- a karboxy-terminální transaktivační doménu (TAD-N, TAD-C) a inhibiční oblast transkripce (obr. 6), (Semenza 2000)

### 3.2.1.3. Přehled cílových genů

Mezi geny regulované HIFem patří celá řada genů, jenž se podílí na fungování buňky při nedostatku kyslíku. Jejich přehled je znázorněn na obr. 7. Zajišťují přepnutí oxidativní fosforylace na anaerobní glykolýzu (kináza pyruvát dehydrogenázy (PDK), zvyšují transport glukózy (Glut-1) a zlepšují efektivnost glykolytického metabolismu (PGK1, aldoláza C aj.). Zvyšují počet červených krvinek (Epo), ovlivňují vasodilataci cév (ET-1, NOS, natriuretické peptidy (ANP, BNP) aj.) a zvyšují expresi celé řady růstových faktorů (PDGF, PIGF, TGF- $\alpha$ , TGF $\beta$ , VEGF, Ang-2, aj.), jejich receptorů (VEGFR1, VEGFR2, Tie -2, aj.), které společně s geny ovlivňující ECM (TIM-1, PAI, aj.) indukují angiogenezi a tak zlepšují přísun kyslíku. Zvyšují však také proapoptický BNIP3 a také prolyl hydroxylázy 2 a 3 (PHD2, PHD3) a faktor inhibující HIF (FIH), které svou negativně zpětnovazebnou aktivitou transkripční aktivitu HIFu inhibuje (Bernardt *et al.* 2007).



Obr. 7. Cílové geny HIF, (převzato Bernardt *et al.* 2007)

Ačkoli HIF reguluje uvedené geny, jen část z nich je ovlivněna přímo. Tyto geny obsahují HRE či jemu podobnou vazebnou oblast. Ta prozatím byla potvrzena u VEGF-A, Epo, VEGFR1, VEGFR2, PIGF, eNOS, *stromal derivated factor-1* (SDF-1) a jeho receptoru

CXCR-4, ET-1, cyklooxygenázy (COX) -2, kinázy sfingokinázy 1 (Fong 2008), Ang-2 (Simon, Tournaire a Pouyssegur 2008) a FGF-2 (Black, DeVol a Wedgwood 2008). Ostatní buďto obsahují dosud nerozpoznanou HRE sekvenci, či jsou HIFem regulovány nepřímo. Takovým případem by mohlo být např. působení VEGF na Tie receptory (viz. kapitola angiopoetiny). Dá se však předpokládat, že v regulaci angiogenních faktorů se budou významně uplatňovat interakce a zpětnovazebné vazby, nejen s proteiny HIF indukovaných, ale i dalších signálních drah, které se aktivují působením hypoxie a je otázkou dalšího výzkumu tyto vztahy objasnit.

### **3.2.1.4. Regulace**

Regulace HIF $\alpha$  probíhá na úrovních: transkripce, translace, jeho transkripční aktivity a stability proteinu, přičemž právě regulace závislá na hladině kyslíku se nejvíce uplatňuje v souvislosti jeho stabilitou a transkripční aktivitou.

#### **3.2.1.4.1. Transkripční aktivita**

Heterodimer HIF rozeznává na DNA oblast obsahující (A/G)CGTG sekvenci, která je označována jako jádro HRE či jako HBS (HIF- binding site). Pro aktivaci transkripce je však nezbytná přítomnost další koaktivátorů, které se váží na jeho domény TAD-N a TAD-C a umožňují vznik transkripčního komplexu a navázání polymerázy. Přímá interakce s TAD-C byla dokázána v případě paralogů p300 a CBP (Creb vazebný protein), které mají mimo jiné i histon acetyltransferázovou aktivitu. Jako podstatný mediátor interakce DNA a CBP/p300 slouží thioredoxin/Ref-1, faktory regulující redox stav buňky, kteří reagují s jediným cysteinovým zbytkem v TAD-C, zřejmě za vzniku sulfhydrylové skupiny. Bez této modifikace se CBP nenaváže. Je také zajímavé, že na rozdíl od Ref-1, který se za normoxických podmínek nachází v jádře, je thioredoxin lokalizován v cytoplasmě a až během hypoxie je přemístěn do jádra, kde může s Ref-1 interagovat (Ema *et al.* 1999).

Interakce CBP/p300 s HIF $\alpha$  je regulována dalšími mechanismy. Zvýšení transkripční aktivity HIF $\alpha$  byl způsoben vazbou mTOR na N-konec. Pokud byla tato oblast odstraněna, HIF $\alpha$  nebyl schopen navázat CBP/p300 (Land a Tee 2007). Je příhodné připomenout, že mTOR, regulovaný Ras proteinem, se hojně vyskytuje ve velmi dobře vazkularizovaných nádorech. Za kompetitivní vazbu s p300 je naopak odpovědný CITED2 (Freedman *et al.* 2003). Jeho neodmyslitelná úloha při regulaci aktivity HIF $\alpha$  byla ukázána ve studii na knock-down modelech, kdy taková modifikace vedla ke smrti embrya v důsledku

chybného vývoje srdce a neurální trubice a exprese HIF cílových genů, např. VEGF, Glut-1, aj. byla zvýšena (Yin *et al.* 2002).

Na tomto místě je vhodné zmínit úlohu přímého inhibitoru HIFu, což je peptid-  
aspartát beta-dioxygenáza (FIH nebo též HIF1AN), který přímo ovlivňuje transkripční  
aktivitu HIFu a je v současnosti znám jako jedna ze dvou asparagynyl hydroxyláz u savců  
vedle asparagynyl beta hydroxylázy (BAH), (Wang *et al.* 1991). FIH-1 vytváří dimery, které  
jsou nutné pro efektivní hydroxylaci jeho substrátu a hydroxyluje HIF-1 $\alpha$  na 'Asp-803'  
v C-terminální transaktivační doméně (C-TAD). Plní zde funkci senzoru hladiny O<sub>2</sub>, kdy  
v normoxických podmínkách zabraňuje hydroxylací HIF-1 $\alpha$  interakci s transkripčními  
koaktivátory včetně CBP/p300. Účastní se tedy potlačení transkripce skrze HIF-1 $\alpha$ , VHL  
a deacetylaci histonů .

Další složkou schopnou svou vazby na CBP/p300 transkripční komplex  
zprostředkující inhibici transkripční aktivity HIFu je p53 (Blagosklonny *et al.* 1998). Jedná se  
o transkripční faktor, pro jehož aktivitu je taktéž zapotřebí komplexu CBP/p300. Reguluje  
buněčný cyklus a hraje ústřední roli ve vstupu buňky do apoptózy indukovanou mj. hypoxií.  
Mechanismus, kterým apoptóza indukovaná hypoxií probíhá, však není znám.

Mezi další způsoby modifikace transkripční aktivity patří fosforylace různých  
regulačních míst. V první řadě bylo ukázáno, že schopnost fosforylovat HIF-1 $\alpha$  postrádá p38  
MAPK a c-Jun N-terminální kináza, naopak MAPK p42/p44 zvyšuje transkripční aktivitu  
HIFu (Richard *et al.* 1999). Novější studie ukázala, že znemožnění fosforylace bodovou  
mutací 'Ser-641' a 'Ser-643' kinázou p42/p44, vedla k interakci s CRM1, hlavním jaderným  
exportinem a transportu HIFu zpět do cytoplasmy a tedy zamezení jeho funkce transkripčního  
faktoru (Mylonis *et al.* 2006). Sluší se podotknout, že přímá aktivace p42/p44 hypoxií  
(1% O<sub>2</sub>, 5-60 min) ve fibroblastech nebyla dokázána (na rozdíl od HeLa buňek, jež jsou  
ovšem vzhledem k velkým modifikacím nevhodným modelem), (Richard *et al.* 1999).  
V případě HIF-2 $\alpha$  bylo identifikováno několik míst fosforylace na C-konci, z nichž 'Thr-844'  
je nezbytný pro zlepšení aktivity díky vazbě CBP/p300 (Gradin *et al.* 2002).

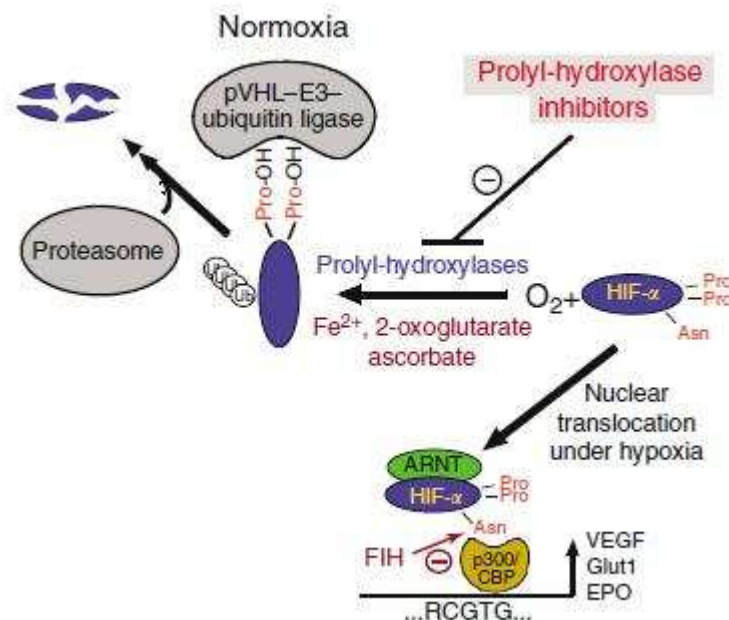
#### **3.2.1.4.2. Stabilita**

Nejdůležitějším mechanismem regulace množství HIF $\alpha$  proteinu je jeho stabilita. Jak  
již bylo výše zmíněno, HIF $\beta$  podjednotka je za normoxických podmínek stabilní, zatímco  
HIF $\alpha$  je degradována. Právě stabilita alfa podjednotky během hypoxie je tedy klíčovým  
dějem vzniku funkčního heterodimeru a tím spojené reakce buňky na snížený příjem kyslíku.



Během normoxie je HIF $\alpha$  v průběhu minut hydroxylován hydroxylázami, které jsou citlivé na kyslík, ubiquitován E3 ubiquitin ligázovým komplexem obsahujícím pVHL (VHLE3) a degradován ve 26S proteasomu (Covello a Simon 2004), (obr.7).

Místem hydroxylace jsou dva prolinové zbytky na C a N konci: 'Pro564' a 'Pro402'. Oba mají ve svém okolí charakteristický motiv LXXLAP, ale jak se zdá, průběh hydroxylace je závislý na širším okolí i na dalších faktorech. Zejména v případě 'Pro402' se uvažuje např. o modifikacích VHLE3 komplexu. S ohledem na výsledky pokusů různých buněčných linií mohou hrát jistou roli i tkáňové odlišnosti v dostupnosti dalších proteinů/enzymů – kofaktorů/modifikátorů (Masson *et al.* 2001). Ačkoli o přesných mechanismech není mnoho známo, skutečnost, že HIF $\alpha$  obsahuje dvě regulační oblasti lišící se citlivostí k ubiquitinylaci, by mohla zvyšovat plasticitu reakce buňky na změnu hladiny kyslíku. Za vlastní proces hydroxylace je odpovědná prolyl-hydroxyláza (PHD).



Obr. 7. pVHL-E3-ubiquitin ligáza směřuje hydroxylovaný HIF- $\alpha$  cestou proteosomální degradace: Hydroxylace HIF- $\alpha$  prolyl hydroxylázou je během normoxie nezbytná pro navázání pVHL-E3 ubiquitin ligázového komplexu. Po následné polyubiquitinylaci je HIF- $\alpha$  degradován v proteasomu. Během hypoxie, či v případě inhibice PHD, nebo absence funkčního pVHL neschopného vazby na vazebná místa HIF- $\alpha$ , se zvyšuje transkripce HIF cílových genů (Epo, VEGF, Glut-1). Faktor inhibující HIF je asparagin hydroxyláza (FIH), která moduluje vazbu nezbytných kofaktorů na HIF, (převzato Haase 2006).

### 3.2.2. Prolyl-hydroxylázy

Z rodiny prolyl-4- hydroxyláz rozlišujeme dvě skupiny. Kolagen-prolyl-4-hydroxylázy (C-P4H), které jsou odpovědné za hydroxylaci prolinu v kolagenu a tzv. HIF-P4H, které hydroxylují HIF a začínají tak jeho cestu proteosomální degradace. Rozeznávají tři typy: PHD-1 (HPH-3/EGLN2), PHD-2 (HPH-2/EGLN1) a PHD-3 (HPH-1/EGLN3). Nedávno byla objevena další prolyl-4-hydroxyláza, označována jako P4H-TM (Koivunen *et al.* 2007).

Aktivita P4H je závislá na kyslíku a mezi další kofaktory nezbytné pro její činnost se řadí 2-oxoglutarát (2-OG), Fe (II) a askorbát. Právě k jejímu vztahu ke kyslíku byla dlouho

považovaná za přímý senzor hladiny kyslíku v buňce. Protože se ale v regulaci jejich aktivity významně uplatňují nosiči informace o redox stavu buňky: ROS, je dnes tato funkce přisuzována jiným mechanismům (Chandel *et al.* 2000). Úloha ROS v regulaci angiogeneze bude probrána později.

### 3.2.2.1. HIF-P4H/PHD

Jedná se o hlavní skupinu prolyl-hydroxyláz, jenž se podílí na regulaci stability HIF $\alpha$ . Ačkoli všechny tři PHD 1-3 jsou schopny hydroxylovat HIF-1 $\alpha$  a HIF-2 $\alpha$  v kritických prolinech, nejdůležitějším regulátorem je PHD2 (Berra *et al.* 2003) a ostatní zaujímají minoritní funkci (Koivunen *et al.* 2007). Nenahraditelná pozice PHD2 je zřetelná během embryonálního vývoje, kdy na rozdíl od PHD1 a PHD3, PHD2 deficientní myší embrya umírali na letální poruchy placenty a srdce. Zajímavé ovšem je, že na rozdíl od placenty, v srdci nebyly zaznamenány vyšší hodnoty HIFu (Takeda *et al.* 2006). Zda v tomto případě plní PHD2 nějakou další úlohu než regulaci HIFu, nebo zda se jedná o důsledek systematické reakce embrya, však zůstává otázkou. Inhibice PHD2 se však zdá nezbytnou podmínkou k aktivaci HIFu a jím zprostředkované angiogenní reakce (Takeda, Cowan a Fong 2007). Vzhledem k tomu, že činnost jednotlivých PHD není redundantní, jak vyplývá např. z nezastupitelnosti PHD2 ve vývoji i tkáňově specifické expresní předlohy jednotlivých PHD (Lieb *et al.* 2002), je význam PHD1 a PHD3 nejasný. Poslední dobou se začíná ukazovat, že by se mohli účastnit v regulaci HIFu za jiných, než normoxických okolností. Bylo zjištěno, že během hypoxie má PHD2 relativně menší vliv na HIF-1 $\alpha$  než na HIF-2 $\alpha$  a PHD3 má relativně větší vliv na HIF-2 $\alpha$  než na HIF-1 $\alpha$  (Aprelikova *et al.* 2004). Exprese PHD3 v některých buňkách stoupá a jeho inhibice nejvíce ovlivňuje hladinu HIFu a při reoxygenaci prodlužuje jeho poločas rozpadu (Appelhoff *et al.* 2004). Zajímavé také je, že jak promotory PHD2, tak PHD3 obsahují HRE sekvenci, na něž se vazbou HIF-1 $\alpha$  zvyšuje exprese PHD2, a vazbou obou HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  exprese PHD3 (Aprelikova *et al.* 2004). Zvýšená hladina PHD zpětnovazebně působí jako negativní regulátor HIFu. Aby k této regulaci došlo, je třeba poskytnou PHD nezbytný kyslík. Bylo ovšem zjištěno, že po 24 hodin trvající hypoxii (1% O<sub>2</sub>) došlo k opětovné degradaci HIF-1 $\alpha$  a HIF-2 $\alpha$ , která byla zapříčiněna hydroxylací kritických prolinů, na které se podílely všechny tři isoformy. Pokud jejich aktivita byla inhibována a tedy účinky HIFu stále trvaly, došlo ke smrti buněk (Ginouves *et al.* 2008), která byla zřejmě způsobena zvýšenou produkcí ROS (Kim *et al.* 2006). Zatímco je tedy HIF nezbytný pro přežití buňky během akutní hypoxie, ochrana před buněčnou smrtí

v déle trvající hypoxii je závislá na jeho degradaci. Taktéž se dá říci, že desenzitivace PHD na hypoxii je známkou adaptačního procesu, neboť pokud příjem kyslíku dále snížíme, její aktivita klesá a HIF je znovu stabilizován (Ginouves *et al.* 2008). Mechanismus, jakým je schopna PHD fungovat při nedostatku kyslíku není znám. Předpokládá se, že by vliv mohla mít změna distribuce zbytku kyslíku, který se s ohledem na možnosti v buňce vyskytuje. Dalším významným cílovým genem HIFu je PDK1 (Kim *et al.* 2006), která inhibuje cyklus mastných kyselin a dýchací řetězec na úkor aktivace anaerobního metabolismu. Tím inhibuje činnost mitochondrií, které jsou za normoxie hlavními konzumenty kyslíku a tím zvyšuje jeho dostupnost pro PHD (Ginouves *et al.* 2008). Hagen *et al.* (2003) ukázal, že oxid dusnatý (NO) a jiné chemické inhibitory mitochondriálního dýchání brání stabilizaci HIF-1 $\alpha$ . Přitom eNOS je dalším z HIF cílových genů (Coulet *et al.* 2003). Při studiu vlivu 1% O<sub>2</sub> bylo zaznamenáno HIFem indukované zvýšení BNIP3, proteinu, který vyvazuje antiapoptický Bcl2 z kompetiční vazby s Beclinem-1. Ten způsobuje autofagii mitochondrií, která představuje další omezení mitochondriální aktivity (Zhang *et al.* 2008). Parciální tlak kyslíku savčích orgánů kolísá mezi 3 – 90 Torry (Porwol *et al.* 2001) a hypoxii vnímají až v okamžiku, kdy pO<sub>2</sub> klesne pod jejich normoxickou hodnotu. Právě odlišná tkáňová exprese jednotlivých PHD by mohla představovat i mechanismus, kterým je normoxický *set-point* nastavován (Khanna *et al.* 2006).

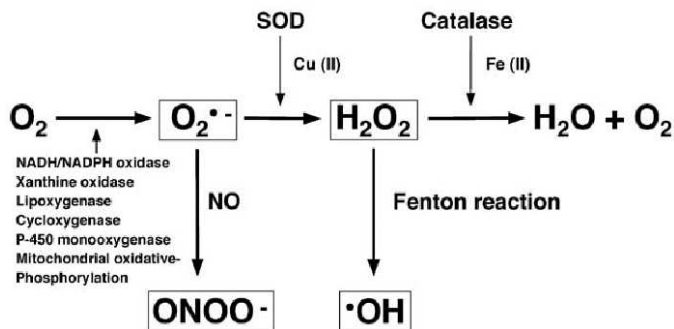
### 3.2.2.2. P4H-TM

P4H-TM je transmembránový protein ER u něhož byla také zaznamenána schopnost regulovat aktivitu HIF-1 $\alpha$  a HIF-2 $\alpha$ , a snižovat hladinu HIF-2 $\alpha$ . Z toho důvodu se předpokládalo, že katalytická oblast je orientována do cytoplasmy, kde by na HIF $\alpha$  mohl enzymaticky působit (Oehme *et al.* 2002). Novější studie vycházející z genové sekvence a míry vazby protilátek na protein zabudovaný v membráně však katalytické místo orientují do lumen retikula a vliv na změny množství HIF $\alpha$  při zablokování či zvýšené expresi P4H-TM přičítají jeho nepřímému působení. Na druhou stranu pokusy s rekombinanty P4H-TM začínajícími 88D ukázaly schopnost hydroxylovat HIF $\alpha$  kritické proliny '402' a '564'. Navíc stabilita HIF $\alpha$  se zvýšila přibližně stejným způsobem jak při zablokování činnosti P4H-TM, tak každé z cytoplasmatických PHD (Koivunen *et al.* 2007). Jakým způsobem je P4H-TM takovou měrou schopná působit z lumen retikula na regulaci HIF $\alpha$  však zůstává záhadou. Gen pro P4H-TM obsahuje pět HRE sekvencí a jeho exprese během hypoxie v závislosti na druhu buněčné kultury buď stoupala nebo zůstala nezměněna. Největší

exprese za normoxie byla zaznamenána v pankreatu, srdci, kosterním svalstvu, mozku, placentě a ledvinách (Koivunen *et al.* 2007).

### 3.2.3. Reaktivní formy kyslíku

ROS jsou malé kyslíkaté molekuly obsahující nepárový elektron, které se vyznačují vysokou reaktivitou. Jejich velké množství vede k buněčné smrti, v malém množství však plní podstatnou úlohu v buněčné signalizaci.



Obr. 8. Redukcí  $O_2$  jedním elektronem vzniká reaktivní superoxid  $O_2^{\cdot-}$ . Ten je spontánně, či reakcí katalyzovanou SOD konvertován na  $H_2O_2$ . Zejména za přítomnosti kovových iontů je pak dále Fentonovou či Haber-Weissovou reakcí oxidován na  $\cdot OH$  a reakcí katalyzovanou katalázou na vodu.  $O_2^{\cdot-}$  v malé míře reaguje s  $NO$  za vzniku  $ONOO^-$  a tím snižuje jeho dostupnost, která je pro organismus nezbytná. Peroxidázy aktivované  $H_2O_2$  tvoří vysoce reaktivní radikál, který oxiduje  $NO$  na  $NO_2$  a s ním reaguje na  $NO_2^{\cdot}$ , který se účastní nitrace, (převzato z Kyaw *et al.* 2004)

Mezi ROS řadíme superoxid  $O_2^{\cdot-}$ , peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ), hydroxylový radikál ( $\cdot OH$ ), radikály oxidu dusnatého ( $NO$ ), peroxynitrit ( $ONOO^-$ ), oxidu dusičitého ( $NO_2$ ) a další. Hlavní vztahy mezi nimi jsou načrtnuty na obr. 8.

Mnoho experimentů ukázalo, že zvýšená produkce ROS je nezbytným předpokladem pro indukci angiogeneze (Ushio-Fukai *et al.* 2002, Yasuda *et al.* 1998, Abe *et al.* 2004, Yoshida *et al.* 1999, Nespereira *et al.* 2003). Jejich angiogenní účinek spočívá v regulaci celé škály redox-senzitivních transkripčních faktorů, mj. i HIFu. Pokud byla znemožněna tvorba ROS mitochondriemi nebo došlo ke zvýšení exprese katalázy, HIF byl degradován nezávisle na hypoxii. Přidání  $H_2O_2$  bylo naopak dostatečné pro jeho stabilizaci (Chandel *et al.* 2000). Bylo ukázáno, že hromadění  $H_2O_2$  vedlo ke snížení dostupnosti Fe (II) jeho oxidací na Fe (III) a omezení PHD aktivity (Gerald *et al.* 2004).  $H_2O_2$  taktéž nepřímo inhibuje  $\alpha$ -ketoglutarát dehydrogenázu (KGDH) a sukcinát dehydrogenázu (SDH), přímo pak akonitázu (Nulton-Persson a Szweida 2001) a ovlivňuje tak hladiny intermediátů Krebsova cyklu, přičemž hromadění sukcinátu (Selak *et al.* 2005) a fumarátu (Isaacs *et al.* 2005) vede k inhibici aktivity PHD a akumulaci HIF-1 $\alpha$ . Produkce  $H_2O_2$  se tedy zdá být klíčovou. Aby došlo k jeho vzniku, je zapotřebí oxidovat  $O_2^{\cdot-}$ . Tato reakce může probíhat spontánně nebo za katalýzy SOD. Zvýšené množství SOD1 skutečně vedlo k stabilizaci HIF-1 $\alpha$  (BelAiba *et al.* 2004) a indukci angiogeneze (Grzenkowicz-Wydra *et al.* 2004, Abid, Tsai a Aird 2001)

za přítomnosti kyslíku, zatímco zvýšení kataláz, které  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidují na vodu, bylo dostatečné pro zrušení tohoto efektu (BelAiba *et al.* 2004). Speklativní je pak význam  $\cdot\text{OH}$ , který společně s Fe (III) vzniká z  $\text{H}_2\text{O}_2$  Fentonovou reakcí. Ačkoli Fe (III) inhibuje PHD, vylučování  $\cdot\text{OH}$  vede také k inhibici PHD, zvýšení HIF-1 $\alpha$  a jak již bylo dříve řečeno, ke zlepšení vazby HIF a Ref-1 (Liu *et al.* 2004). Je pravděpodobné, že spíše než přítomnost signální molekuly, je podstatný jejich poměr, čímž dávají komplexní signál o redox stavu buňky.

Mezi další redox-senzitivní TF a geny patří např. Ref-1, který je mj. nezbytný pro thioredoxinem umožněnou vazbu CBP/p300 na HIF a aktivitu jeho transkripční aktivity. p53, který modifikuje angiogenní odpověď interferencí s HIF signální drahou,  $\text{H}_2\text{O}_2$  indukuje NF- $\kappa$ B dependentní produkci IL-8. Dále Ets, který se podílí na expresi MCP-1, PAI-1 a je nezbytný pro angiotensin II zprostředkovanou ROS produkci a indukci p47<sup>phox</sup>, pojednotky NADPH oxidázy. MMP-9 jsou také aktivovány ROS.

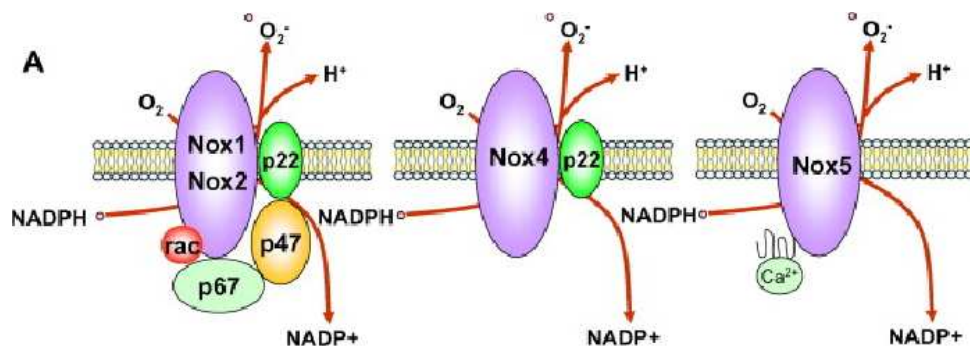
Za hlavní producenty  $\text{O}_2^-$  jsou považovány mitochondrie a rodina Nox proteinů NADPH oxidáz (obr. 9.), důležitou regulační úlohu představuje i produkce NO, syntázou oxidu dusnatého (NOS). Odhaduje se, že 90% buněčného kyslíku je spotřebováno v mitochondriích a přibližně 2-4% tohoto kyslíku jsou kovertována na ROS, vedlejší produkt oxidativní fosforylace (Desouki *et al.* 2005). Zdá se, že právě role mitochondrie v regulaci produkce ROS buňkou je klíčová, neboť inhibicí mitochondriálních genů dochází ke snížení transkriptu Nox1 i vyprodukovaného ROS (Desouki *et al.* 2005). Odpovědným elementem je zřejmě III. komplex dýchacího řetězce, jehož inhibice je dostatečná pro snížení ROS a znemožnění transkripce kvasinkových transkripčních faktorů Yap1p, Mga2p, a Msn2p (Guzy *et al.* 2005), mezi jejichž cílové geny patří mj. SOD (Izawa *et al.* 2007). Význam regulace mitochondriální aktivity v déle trvající hypoxii byl zmíněn dříve.

NADPH oxidázy produkují ROS nepřetržitě v malém množství a jejich další aktivita je ovlivněna různými signály.

Za zvýšení exprese Nox1 je např. odpovědné oscilační smykové napětí vyvolané ROS závislou adhezí leukocytů na endoteliální buňky, které vede k rozrušení buněčných spojů a umožňuje migraci a proliferaci endoteliálních buněk. K té nedojde, pokud dojde ke ztrátě Nox1.

Role Nox2 je nezbytná a při její deficienci nedochází k ischemií ani VEGF indukované neovaskularizaci. Jeho exprese se v hypoxii zvyšuje a jeho aktivita působením Ang-1 a VEGF také. Váže se na aktin a jiné proteiny buněčného lešení v čele migrujících

endoteliálních buněk. Účastní se také na aktivaci NF- $\kappa$ B. Nox2 je kolokalizován s endoplasmatickým retikulem (ER), ovšem může být internalizován i do endosomu.



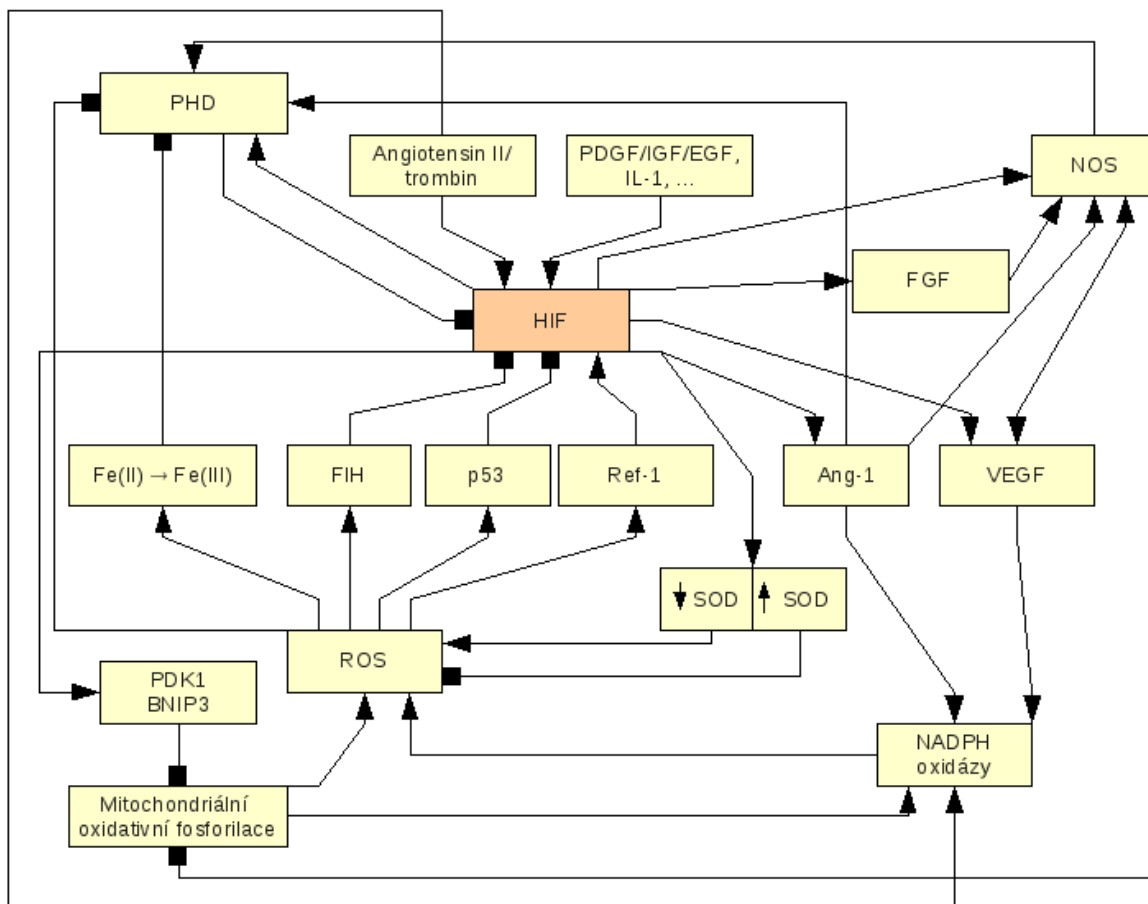
Obr. 9. Složení NADPH oxidáz: podjednotky Nox1, Nox2, Nox4, Nox5, rac, p22, p47, p67

Nox4 byl nalezen i v jádře a je považován za čidlo jaderného redox stavu a jeho vysoká hladina v klidovém stavu naznačuje jeho úlohu při klidové produkci O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Jeho inhibice je však doprovázená utlumením VEGF- zprostředkované migrace a proliferace EC a z pokusů s jeho zvýšenou expresí vyplývá, že zvyšuje fosforylaci tyrosin kináz a aktivitu Erk, dalšího významného TF, který se účastní v angiogenní kaskádě (Datla *et al.* 2007).

Nox5 se povětšinou nachází také v ER a na rozdíl od ostatních je aktivován vápníkem. Ovšem byly popsány i varianty, u kterých Ca<sup>2+</sup> vazebná doména chyběla. Ačkoli jeho inhibice nevedla k trombinem indukované proliferaci a formování struktur podobným cévám, předpokládá se, že jejich význam je spíše v kontrole ROS-dependenčních procesů během angiogeneze.

Rac1 z rodiny Ras proteinů se podílí na VEGF a Ang-1 indukovaném zvýšení ROS produkce. Je nezbytný pro angiogenezi a neaktivnější je v čele poraněním-indukovaných migrujících buněk. Angiotensin II, TNF $\alpha$ , VEGF a kmitavé smykové napětí vedou k fosforylaci p47<sup>phox</sup>, který se podílí na oxidázové aktivitě NADPH oxidáz. Hlavní kinázou je PKC, další kinázy, jako např. Akt, p38, MAPK a PAK (p21-aktivovaná kináza) se však v závislosti na signálu účastní také. Deficience p47<sup>phox</sup>, byla dostatečná pro zabránění Ang-1 stimulování ROS produkce, Akt a Erk fosforylace, buněčné migraci a kapilárnímu růstu (přehled podjednotek NADPH oxidáz převzat z Ushio-Fukai a Nakamura 2008).

Diverzita účinku jednotlivých Nox proteinů naznačuje jejich možnou časově a prostorově specifickou úlohu v distribuci ROS, možná v reakci na vliv některých angiogenních faktorů.



Obr. 10. Schéma znázorňující vztahy mezi některými regulačními molekulami a angiogenními efekty (šipky znázorňují aktivaci, čtverečky inhibici), (Ivana Bučinská 2009).

## 4. ZÁVĚR

Angiogeneze je velmi komplikovaný proces. Je výsledkem interakcí celé škály faktorů, které pouze v optimálním poměru vedou k fyziologickému účinku. Tento poměr se navíc s ohledem na druh angiogeneze liší a dává tak možnost aktivovat nejvhodnější způsob vazkularizace s ohledem na indukující stimulus a momentální stav tkáně či organismu. Jedním z takových stimulů je nepochybně hypoxie, která vede ke zvýšené produkci ROS. Prostředí buňky je vystaveno různé míře oxidativního stresu a dochází k ovlivnění klíčových transkripčních faktorů a enzymů. Takovým je i inhibice prolyl hydroxyláz, které svou činností způsobují degradaci HIF $\alpha$  podjednotky. Naopak stabilní dimer HIF hraje centrální úlohu ve změně exprese proteinů metabolismu, zvýšení kapacity transportu živin a kyslíku a také indukci pro angiogenezi nezbytných růstových faktorů, jejich receptorů, různých cytokinů a dalších. Pozitivní zpětnou vazbou však také aktivuje expresi prolyl hydroxyláz. Dále enzymů s antioxidantní aktivitou a dalších proteinů, ovlivňujících metabolismus mitochondrií, jenž společně přispívají ke snížení ROS. Právě produkce ROS mitochondriemi je pravděpodobně zásadní regulační stimulus pro produkci dalších ROS NADPH oxidázami, jejichž činnost je nezbytná pro správný průběh angiogeneze. Specifita účinku jednotlivých typů NADPH oxidáz a jejich podjednotek naznačuje jejich možnou důležitost časové a prostorové distribuce ROS, možná v reakci na vliv některých angiogenních faktorů. Angiogenní působení růstových faktorů se uplatňuje zejména přes druhé posly jako NO a zvýšené hladiny vápníku. Vlivem zpětných vazeb je však časně po hypoxickém stimulu aktivita HIF znovu inhibována, ačkoli hypoxické podmínky přetrvávají. Jeho inhibice je nezbytná pro přežití buňky a vychází z opětovné aktivace prolyl hydroxyláz, které zřejmě vlivem změn metabolismu a distribuce kyslíku jsou schopny HIF hydroxylovat. Tyto procesy souhrnně představují adaptaci buňky na nízkou hladinu kyslíku a pomáhají jí přežít.

Vaskulogeneze v pravé a v levé komoře se během výškové hypoxie liší. Zatímco v pravé převládá, v levé k ní dochází pouze nepatrně. Neboť je pouze pravá komora pod vlivem zvýšené mechanické zátěže, je možné, že v jejím případě došlo k prohloubení hypoxického působení, anebo je to právě mechanický stimulus, který je v tomto případě dominantním faktorem v indukci angiogeneze. Mechanismy působení mechanické zátěže na angiogenezi se však tato práce nezabývá. O příčinách a mechanismech angiogenního procesu v myokardu je známo mnoho, avšak stále zůstává velké množství nejasností, které si žádá další intenzivní výzkum.



## 5. POUŽITÁ LITERATURA

- Abe, R., T. Shimizu, S. Yamagishi, A. Shibaki, S. Amano, Y. Inagaki, H. Watanabe, H. Sugawara, H. Nakamura, M. Takeuchi, T. Imaizumi & H. Shimizu (2004) Overexpression of pigment epithelium-derived factor decreases angiogenesis and inhibits the growth of human malignant melanoma cells in vivo. *American Journal of Pathology*, 164, 1225-1232.
- Abid, M. R., J. C. Tsai & W. C. Aird (2001) Vascular endothelial growth factor induces manganese-superoxide dismutase expression in endothelial cells by an NADPH oxidase-dependent mechanism. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 21, 250.
- Adair, T. H., W. J. Gay & J. P. Montani (1990) GROWTH-REGULATION OF THE VASCULAR SYSTEM - EVIDENCE FOR A METABOLIC HYPOTHESIS. *American Journal of Physiology*, 259, R393-R404.
- Appelhoff, R. J., Y. M. Tian, R. R. Raval, H. Turley, A. L. Harris, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe & J. M. Gleadow (2004) Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 38458-38465.
- Aprelikova, O., G. V. R. Chandramouli, M. Wood, J. R. Vasselli, J. Riss, J. K. Maranchie, W. M. Linehan & J. C. Barrett (2004) Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors (vol 92, pg 491, 2004). *Journal of Cellular Biochemistry*, 93, 639-639.
- BelAiba, R. S., T. Djordjevic, S. Bonello, D. Flugel, J. Hess, T. Kietzmann & A. Gorkach (2004) Redox-sensitive regulation of the HIF pathway under non-hypoxic conditions in pulmonary artery smooth muscle cells. *Biological Chemistry*, 385, 249-257.
- Bernardt, W.M., Ch. Warnecke, C. William, T. Tanaka, M.S. Weisner and Kai-Uwe Eckardt, Organ protection by hypoxia nad Hypoxia inducible factors in Methods in Enzymology, Vol.435, chapter 12, p.221-245,2007
- Berra, E., E. Benizri, A. Ginouves, V. Volmat, D. Roux & J. Pouyssegur (2003) HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 alpha in normoxia. *Embo Journal*, 22, 4082-4090.
- Black, S. M., J. M. DeVol & S. Wedgwood (2008) Regulation of fibroblast growth factor-2 expression in pulmonary arterial smooth muscle cells involves increased reactive oxygen species generation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 294, C345-C354.
- Blagosklonny, M. V., W. G. An, L. Y. Romanova, J. Trepel, T. Fojo & L. Neckers (1998) p53 inhibits hypoxia-inducible factor-stimulated transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 11995-11998.
- Burri, P. H., R. Hlushchuk & V. Djonov (2004) Intussusceptive angiogenesis: Its emergence, its characteristics, and its significance. *Developmental Dynamics*, 231, 474-488.
- Carmeliet, P. (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, 9, 653-660.
- Chandel, N. S., D. S. McClintock, C. E. Feliciano, T. M. Wood, J. A. Melendez, A. M. Rodriguez & P. T. Schumacker (2000) Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha during hypoxia - A mechanism of O-2 sensing. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 25130-25138.
- Chouabe, C., J. Amsellem, L. Espinosa, P. Ribaux, S. Blaineau, P. Megaw & R. Bonvallet (2002) Reversibility of electrophysiological changes induced by chronic high-altitude hypoxia in adult rat heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 282, H1452-H1460.

- Chouabe, C., L. Espinosa, P. Megas, A. Chakir, O. Rougier, A. Freminet & R. Bonvallet (1997) Reduction of I-Ca, I-L and I(to1) density in hypertrophied right ventricular cells by simulated high altitude in adult rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 29, 193-206.
- Clark, D. R. & P. Smith (1978) CAPILLARY DENSITY AND MUSCLE-FIBER SIZE IN THE HEARTS OF RATS SUBJECTED TO SIMULATED HIGH-ALTITUDE. *Cardiovascular Research*, 12, 578-584.
- ColvilleNash, P. R. & D. A. Willoughby (1997) Growth factors in angiogenesis: Current interest and therapeutic potential. *Molecular Medicine Today*, 3, 14-23.
- Compernelle, V., K. Brusselmans, T. Acker, P. Hoet, M. Tjwa, H. Beck, S. Plaisance, Y. Dor, E. Keshet, F. Lupu, B. Nemery, M. Dewerchin, P. Van Veldhoven, K. Plate, L. Moons, D. Collen & P. Carmeliet (2002) Loss of HIF-2 and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nature Medicine*, 8, 702-710.
- Coulet, F., S. Nadaud, M. Agrapart & F. Soubrier (2003) Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 46230-46240.
- Covello, K. L. & M. C. Simon. 2004. HIFs, hypoxia, and vascular development. In *Developmental Vascular Biology*, 37-+. San Diego: Elsevier Academic Press Inc.
- Datla, S. R., H. Peshavariya, G. J. Dusting, K. Mahadev, B. J. Goldstein & F. Jiang (2007) Important role of Nox4 type NADPH oxidase in angiogenic responses in human microvascular endothelial cells in vitro. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 27, 2319-2324.
- Deindl, E., F. Kolar, E. Neubauer, S. Vogel, W. Schaper & B. Ostadal (2003) Effect of intermittent high altitude hypoxia on gene expression in rat heart and lung. *Physiological Research*, 52, 147-157.
- Desouki, M. M., M. Kulawiec, S. Bansal, G. Das & K. K. Singh (2005) Cross talk between mitochondria and superoxide generating NADPH oxidase in breast and ovarian tumors. *Cancer Biology & Therapy*, 4, 1367-1373.
- Dewhirst, M. W., Y. Cao & B. Moeller (2008) Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nature Reviews Cancer*, 8, 425-437.
- Djonov, V., M. Schmid, S. A. Tschanz & P. H. Burri (2000) Intussusceptive angiogenesis - Its role in embryonic vascular network formation. *Circulation Research*, 86, 286-292.
- Duan, L. J., Y. H. Zhang-Benoit & G. H. Fong (2005) Endothelium-intrinsic requirement for Hif-2 alpha during vascular development. *Circulation*, 111, 2227-2232.
- Egginton, S. (2009) Invited review: activity-induced angiogenesis. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 457, 963-977.
- Ema, M., K. Hirota, J. Mimura, H. Abe, J. Yodoi, K. Sogawa, L. Poellinger & Y. Fujii-Kuriyama (1999) Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *Embo Journal*, 18, 1905-1914.
- Factor, S. M., M. Flomenbaum, M. J. Zhao, C. Eng & T. F. Robinson (1988) THE EFFECTS OF ACUTELY INCREASED VENTRICULAR CAVITY PRESSURE ON INTRINSIC MYOCARDIAL CONNECTIVE-TISSUE. *Journal of the American College of Cardiology*, 12, 1582-1589.
- Factor, S. M. & T. F. Robinson (1988) COMPARATIVE CONNECTIVE-TISSUE STRUCTURE-FUNCTION-RELATIONSHIPS IN BIOLOGIC PUMPS. *Laboratory Investigation*, 58, 150-156.
- Flamme, I., T. Frohlich, M. vonReutern, A. Kappel, A. Damert & W. Risau (1997) HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to

- hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mechanisms of Development*, 63, 51-60.
- Fong, G. H. (2008) Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. *Angiogenesis*, 11, 121-140.
- Freedman, S. J., Z. Y. J. Sun, A. L. Kung, D. S. France, G. Wagner & M. J. Eck (2003) Structural basis for negative regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha by CITED2. *Nature Structural Biology*, 10, 504-512.
- Gerald, D., E. Berra, Y. M. Frapart, D. A. Chan, A. J. Giaccia, D. Mansuy, J. Pouyssegur, M. Yaniv & F. Mechta-Grigoriou (2004) JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell*, 118, 781-794.
- Ginouves, A., K. Ilc, N. Macias, J. Pouyssegur & E. Berra (2008) PHDs overactivation during chronic hypoxia "desensitizes" HIF alpha and protects cells from necrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 4745-4750.
- Gradin, K., C. Takasaki, Y. Fujii-Kuriyama & K. Sogawa (2002) The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 23508-23514.
- Grandtne, M., Z. Turek & F. Kreuzer (1974) CARDIAC-HYPERTROPHY IN FIRST GENERATION OF RATS NATIVE TO SIMULATED HIGH-ALTITUDE - MUSCLE-FIBER DIAMETER AND DIFFUSION DISTANCE IN RIGHT AND LEFT-VENTRICLE. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 350, 241-248.
- Grzenkiewicz-Wydra, J., J. Cisowski, J. Nakonieczna, A. Zarebski, N. Udilova, H. Nohl, A. Jozkowicz, A. Podhajska & J. Dulak (2004) Gene transfer of CuZn superoxide dismutase enhances the synthesis of vascular endothelial growth factor. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 264, 169-181.
- Guzy, R. D., B. Hoyos, E. Robin, H. Chen, L. P. Liu, K. D. Mansfield, M. C. Simon, U. Hammerling & P. T. Schumacker (2005) Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metabolism*, 1, 401-408.
- Haase, V. H. (2006) The VHL/HIF oxygen-sensing pathway and its relevance to kidney disease. *Kidney International*, 69, 1302-1307.
- Heldin, C. H. & B. Westermark (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological Reviews*, 79, 1283-1316.
- Hillen, F. & A. W. Griffioen (2007) Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26, 489-502.
- Huang, Y., R. P. Hickey, J. L. Yeh, D. G. Liu, A. Dadak, L. H. Young, R. S. Johnson & F. J. Giordano (2004) Cardiac myocyte-specific HIF-1 alpha deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart. *FASEB Journal*, 18, 1138-+.
- Hudlicka, O. (1982) GROWTH OF CAPILLARIES IN SKELETAL AND CARDIAC-MUSCLE. *Circulation Research*, 50, 451-461.
- Hudlicka, O., M. Brown & S. Egginton (1992) ANGIOGENESIS IN SKELETAL AND CARDIAC-MUSCLE. *Physiological Reviews*, 72, 369-417.
- Isaacs, J. S., Y. J. Jung, D. R. Mole, S. Lee, C. Torres-Cabala, Y. L. Chung, M. Merino, J. Trepel, B. Zbar, J. Toro, P. J. Ratcliffe, W. M. Linehan & L. Neckers (2005) HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: Novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell*, 8, 143-153.
- Itoh, N. & D. M. Ornitz (2004) Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends in Genetics*, 20, 563-569.

- Iyer, N. V., L. E. Kotch, F. Agani, S. W. Leung, E. Laughner, R. H. Wenger, M. Gassmann, J. D. Gearhart, A. M. Lawler, A. Y. Yu & G. L. Semenza (1998) Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes & Development*, 12, 149-162.
- Izawa, S., K. Ikeda, T. Ohdate & Y. Inoue (2007) Msn2p/Msn4p-activation is essential for the recovery from freezing stress in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352, 750-755.
- Jain, S., E. Maltepe, M. M. Lu, C. Simon & C. A. Bradfield (1998) Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 alpha, HIF2 alpha and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mechanisms of Development*, 73, 117-123.
- Jalil, J. E., C. W. Doering, J. S. Janicki, R. Pick, S. G. Shroff & K. T. Weber (1989) FIBRILLAR COLLAGEN AND MYOCARDIAL STIFFNESS IN THE INTACT HYPERTROPHIED RAT LEFT-VENTRICLE. *Circulation Research*, 64, 1041-1050.
- Jezkova, J., O. Novakova, F. Kolar, E. Tvrzicka, J. Neckar & F. Novak (2002) Chronic hypoxia alters fatty acid composition of phospholipids in right and left ventricular myocardium. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 232, 49-56.
- Jurgensen, J. S., C. Rosenberger, M. S. Wiesener, C. Warnecke, J. H. Horstrup, M. Grafe, S. Philipp, W. Griethe, P. H. Maxwell, U. Frei, S. Bachmann, R. Willenbrock & K. U. Eckardt (2004) Persistent induction of HIF-1 alpha and -2 alpha in cardiomyocytes and stromal cells of ischemic myocardium. *Faseb Journal*, 18, 1415-+.
- Khanna, S., S. Roy, M. Maurer, R. R. Ratan & C. K. Sen (2006) Oxygen-sensitive reset of hypoxia-inducible factor transactivation response: Prolyl hydroxylases tune the biological normoxic set point. *Free Radical Biology and Medicine*, 40, 2147-2154.
- Kim, J. W., I. Tchernyshyov, G. L. Semenza & C. V. Dang (2006) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism*, 3, 177-185.
- Koivunen, P., P. Tiainen, J. Hyvarinen, K. E. Williams, R. Sormunen, S. J. Klaus, K. I. Kivirikko & J. Myllyharju (2007) An endoplasmic reticulum transmembrane prolyl 4-hydroxylase is induced by hypoxia and acts on hypoxia-inducible factor alpha. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 30544-30552.
- Kotch, L. E., N. V. Iyer, E. Laughner & G. L. Semenza (1999) Defective vascularization of HIF-1 alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Developmental Biology*, 209, 254-267.
- Kurz, H., P. H. Burri & V. G. Djonov (2003) Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: From form to function. *News in Physiological Sciences*, 18, 65-70.
- Kyaw, M., M. Yoshizumi, K. Tsuchiya, Y. Izawa, Y. Kanematsu & T. Tamaki (2004) Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25, 977-985.
- Land, S. C. & A. R. Tee (2007) Hypoxia-inducible factor 1 alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 20534-20543.
- Lay, A. J., X. M. Jiang, E. Daly, L. Sun & P. J. Hogg (2002) Plasmin reduction by phosphoglycerate kinase is a thiol-independent process. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 9062-9068.
- Lee, S. D., W. W. Kuo, C. H. Wu, Y. M. Lin, J. A. Lin, M. C. Lu, A. L. Yang, J. Y. Liu, S. G. P. Wang, C. J. Liu, L. M. Chen & C. Y. Huang (2006) Effects of short- and long-term hypobaric hypoxia on Bcl2 family in rat heart. *International Journal of Cardiology*, 108, 376-384.
- Li, J., L. F. Brown, M. G. Hibberd, J. D. Grossman, J. P. Morgan & M. Simons (1996) VEGF, flk-1, andflt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis.

- American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 39, H1803-H1811.
- Lieb, M. E., K. Menzies, M. C. Moschella, R. J. Ni & M. B. Taubman (2002) Mammalian EGLN genes have distinct patterns of mRNA expression and regulation. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 80, 421-426.
- Liu, Q., U. Berchner-Pfannschmidt, U. Moller, M. Brecht, C. Wotzlaw, H. Acker, K. Jungermann & T. Kietzmann (2004) A Fenton reaction at the endoplasmic reticulum is involved in the redox control of hypoxia-inducible gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 4302-4307.
- Lu, J. M., K. Q. Zhang, S. A. Chen & W. Wen (2009) Grape seed extract inhibits VEGF expression via reducing HIF-1 alpha protein expression. *Carcinogenesis*, 30, 636-644.
- Makino, Y., A. Kanopka, W. J. Wilson, H. Tanaka & L. Poellinger (2002) Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 alpha locus. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 32405-32408.
- Masson, N., C. Willam, P. H. Maxwell, C. W. Pugh & P. J. Ratcliffe (2001) Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *Embo Journal*, 20, 5197-5206.
- Matschke, K., S. Pfeiffer, C. Mrowietz, T. Geisler, S. M. Tugtekin, J. W. Park, M. Knaut & F. Jung (2005) Influence of ventricular pacing on myocardial oxygen tension. *Microvascular Research*, 70, 97-101.
- Matsunaga, T., D. C. Warltier, J. Tessmer, D. Weihrauch, M. Simons & W. M. Chilian (2003) Expression of VEGF and angiopoietins-1 and -2 during ischemia-induced coronary angiogenesis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 285, H352-H358.
- McCarthy, M. J., M. Crowther, P. R. F. Bell & N. P. J. Brindle (1998) The endothelial receptor tyrosine kinase tie-1 is upregulated by hypoxia and vascular endothelial growth factor. *Febs Letters*, 423, 334-338.
- Mitsuma, W., M. Kodama, S. Hirono, M. Ito, M. M. Ramadan, K. Tanaka, M. Hoyano, T. Saigawa, T. Kashimura, K. Fuse, Y. Okura & Y. Aizawa (2007) Angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2 in the coronary circulation of patients with and without coronary collateral vessels. *Circulation Journal*, 71, 343-347.
- Morbideilli, L., S. Donnini & M. Ziche (2003) Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 521-530.
- Morisada, T., Y. Kubota, T. Urano, T. Suda & Y. Oike (2006) Angiopoietins and angiopoietin-like proteins in angiogenesis. *Endothelium-Journal of Endothelial Cell Research*, 13, 71-79.
- Mylonis, I., G. Chachami, M. Samiotaki, G. Panayotou, E. Paraskeva, A. Kalousi, E. Georgatsou, S. Bonanou & G. Simos (2006) Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 33095-33106.
- Nakanishi, K., Y. Nakata, F. Kanazawa, S. Imamura, R. Matsuoka, H. Osada, T. Kawai, M. Uenoyama, T. Aurues & T. Ikeda (2002) Changes in myosin heavy chain and its localization in rat heart in association with hypobaric hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Journal of Pathology*, 197, 380-387.
- Nespereira, B., M. Perez-Illarbe, P. Fernandez, A. M. Fuentes, J. A. Paramo & J. A. Rodriguez (2003) Vitamins C and E downregulate vascular VEGF and VEGFR-2 expression in apolipoprotein-E-deficient mice. *Atherosclerosis*, 171, 67-73.
- Nouette-Gaulain, K., M. Malgat, C. Rocher, J. P. Savineau, R. Marthan, J. P. Mazat & F. Sztark (2005) Time course of differential mitochondrial energy metabolism adaptation to chronic hypoxia in right and left ventricles. *Cardiovascular Research*, 66, 132-140.

- Nulton-Persson, A. C. & L. I. Szweda (2001) Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 23357-23361.
- Oehme, F., P. Ellinghaus, P. Kolkhof, T. J. Smith, S. Ramakrishnan, J. Hutter, M. Schramm & I. Flamme (2002) Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296, 343-349.
- Opie, L. H. (1969) METABOLISM OF HEART IN HEALTH AND DISEASE .3. *American Heart Journal*, 77, 383-&.
- Otrock, Z. K., R. A. R. Mahfouz, J. A. Makarm & A. I. Shamseddine (2007) Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Molecules and Diseases*, 39, 212-220.
- Patan, S., M. J. Alvarez, J. C. Schittny & P. H. Burri. 1991. INTUSSUSCEPTIVE MICROVASCULAR GROWTH - A COMMON ALTERNATIVE TO CAPILLARY SPROUTING. In *Special Session in Honor of Prof K Tanaka : 3-D Microanatomy of Cells and Tissues by Scanning Electron Microscope, at 10th International Symp on Morphological Sciences*, 65-75. Toronto, Canada: Japan Soc Histol Documentation Niigata Univ Medical School.
- Pelouch, V., F. Kolar, B. Ostadal, M. Milerova, R. Cihak & J. Widimsky (1997) Regression of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy, and fibrosis: Effect of enalapril. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 11, 177-185.
- Portnychenko, A. G., V. E. Dosenko, V. I. Portnichenko & O. O. Moybenko. 2008. Expression of HIF-1 alpha and HIF-3 alpha differentially changed in rat heart ventricles after hypoxic preconditioning. In *28th Annual Meeting of the European Section of the International-Society-for-Heart-Research*, 32. Athens, GREECE: Academic Press Ltd Elsevier Science Ltd.
- Porwol, T., W. Ehleben, V. Brand & H. Acker (2001) Tissue oxygen sensor function of NADPH oxidase isoforms, an unusual cytochrome aa3 and reactive oxygen species. *Respiration Physiology*, 128, 331-348.
- Presta, M., P. Dell'Era, S. Mitola, E. Moroni, R. Ronca & M. Rusnati (2005) Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16, 159-178.
- Rafii, S. & D. Lyden (2003) Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nature Medicine*, 9, 702-712.
- Ribatti, D. (2008) The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review. *Angiogenesis*, 11, 215-221.
- Richard, D. E., E. Berra, E. Gothie, D. Roux & J. Pouyssegur (1999) p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 32631-32637.
- Rumsey, W. L., B. Abbott, D. Bertelsen, M. Mallamaci, K. Hagan, D. Nelson & M. Erecinska (1999) Adaptation to hypoxia alters energy metabolism in rat heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 45, H71-H80.
- Schaper, W. (1993) NEW PARADIGMS FOR COLLATERAL VESSEL GROWTH. *Basic Research in Cardiology*, 88, 193-198.
- Schwartzkopff, B., W. Motz, H. Frenzel, M. Vogt, S. Knauer & B. E. Strauer (1993) STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ALTERATIONS OF THE INTRAMYOCARDIAL CORONARY ARTERIOLES IN PATIENTS WITH ARTERIAL-HYPERTENSION. *Circulation*, 88, 993-1003.
- Scortegagna, M., K. Ding, Y. Oktay, A. Gaur, F. Thurmond, L. J. Yan, B. T. Marck, A. M. Matsumoto, J. M. Shelton, J. A. Richardson, M. J. Bennett & J. A. Garcia (2003)

- Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1(-/-)* mice. *Nature Genetics*, 35, 331-340.
- Selak, M. A., S. M. Armour, E. D. MacKenzie, H. Boulahbel, D. G. Watson, K. D. Mansfield, Y. Pan, M. C. Simon, C. B. Thompson & E. Gottlieb (2005) Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- $\alpha$  prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*, 7, 77-85.
- Semenza, G. L. (1999) Perspectives on oxygen sensing. *Cell*, 98, 281-284.
- Semenza, G. L. (2000) HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of Applied Physiology*, 88, 1474-1480.
- Semenza, G. L. & G. L. Wang (1992) A NUCLEAR FACTOR INDUCED BY HYPOXIA VIA DENOVO PROTEIN-SYNTHESIS BINDS TO THE HUMAN ERYTHROPOIETIN GENE ENHANCER AT A SITE REQUIRED FOR TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION. *Molecular and Cellular Biology*, 12, 5447-5454.
- Setty, S., P. Zong, W. Sun, J. D. Tune & H. F. Downey (2008) Hypoxia-induced vasodilation in the right coronary circulation of conscious dogs: Role of adrenergic activation. *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical*, 138, 76-82.
- Sharma, S., H. Taegtmeier, J. Adroque, P. Razeghi, S. Sen, K. Ngumbela & M. F. Essop (2004) Dynamic changes of gene expression in hypoxia-induced right ventricular hypertrophy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 286, H1185-H1192.
- Simon, M. P., R. Tournaire & J. Pouyssegur (2008) The Angiopoietin-2 Gene of Endothelial Cells is Up-Regulated in Hypoxia by a HIF Binding Site Located in Its First Intron and by the Central Factors GATA-2 and Ets-1. *Journal of Cellular Physiology*, 217, 809-818.
- Singh, H., C. S. Milner, M. M. A. Hernandez, N. Patel & N. P. J. Brindle (2009) Vascular endothelial growth factor activates the Tie family of receptor tyrosine kinases. *Cellular Signalling*, 21, 1346-1350.
- Takeda, K., A. Cowan & G. H. Fong (2007) Essential role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen Homeostasis of the adult vascular system. *Circulation*, 116, 774-781.
- Takeda, K., V. C. Ho, H. Takeda, L. J. Duan, A. Nagy & G. H. Fong (2006) Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2. *Molecular and Cellular Biology*, 26, 8336-8346.
- Tian, H., R. E. Hammer, A. M. Matsumoto, D. W. Russell & S. L. McKnight (1998) The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes & Development*, 12, 3320-3324.
- Tomanek, R. J., W. Zheng & X. P. Yue (2004) Growth factor activation in myocardial vascularization: Therapeutic implications. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 264, 3-11.
- Turek, Z., F. Kreuzer & Grandtne.M (1972) CARDIAC HYPERTROPHY, CAPILLARY AND MUSCLE FIBER DENSITY, MUSCLE FIBER DIAMETER, CAPILLARY RADIUS AND DIFFUSION DISTANCE IN MYOCARDIUM OF GROWING RATS ADAPTED TO A SIMULATED ALTITUDE OF 3500 M. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 335, 19-&.
- Ushio-Fukai, M. & Y. Nakamura (2008) Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Letters*, 266, 37-52.

- Ushio-Fukai, M., Y. Tang, T. Fukai, S. I. Dikalov, Y. X. Ma, M. Fujimoto, M. T. Quinn, P. J. Pagano, C. Johnson & R. W. Alexander (2002) Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circulation Research*, 91, 1160-1167.
- Wiesener, M. S., J. S. Jurgensen, C. Rosenberger, C. Scholze, J. H. Horstrup, C. Warnecke, S. Mandriota, I. Bechmann, U. A. Frei, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, S. Bachmann, P. H. Maxwell & K. U. Eckardt (2002) Widespread, hypoxia-inducible expression of HIF-2 alpha in distinct cell populations of different organs. *Faseb Journal*, 16, 271-+.
- Willam, C., P. H. Maxwell, L. Nichols, C. Lygate, Y. M. Tian, W. Bernhardt, M. Wiesener, P. J. Ratcliffe, K. U. Eckardt & C. W. Pugh (2006) HIF prolyl hydroxylases in the rat; organ distribution and changes in expression following hypoxia and coronary artery ligation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 41, 68-77.
- Xie, Y., Y. Zhu, W. Z. Zhu, L. Chen, Z. N. Zhou, W. J. Yuan & H. T. Yang (2005) Role of dual-site phospholamban phosphorylation in intermittent hypoxia-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 288, H2594-H2602.
- Yamashita, T., O. Ohneda, M. Nagano, M. Iemitsu, Y. Makino, H. Tanaka, T. Miyauchi, K. Goto, K. Ohneda, Y. Fujii-Kuriyama, L. Poellinger & M. Yamamoto (2008) Abnormal heart development and lung remodeling in mice lacking the hypoxia-inducible factor-related basic helix-loop-helix PAS protein NEPAS. *Molecular and Cellular Biology*, 28, 1285-1297.
- Yasuda, M., Y. Ohzeki, S. Shimizu, S. Naito, A. Ohtsuru, T. Yamamoto & Y. Kuroiwa (1998) Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells. *Life Sciences*, 64, 249-258.
- Yin, Z., J. Haynie, X. M. Yang, B. G. Han, S. Kiatchoosakun, J. Restivo, S. Y. Yuan, N. R. Prabhakar, K. Herrup, R. A. Conlon, B. D. Hoit, M. Watanabe & Y. C. Yang (2002) The essential role of Cited2, a negative regulator for HIF-1 alpha, in heart development and neurulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 10488-10493.
- Yoshida, A., S. Yoshida, T. Ishibashi, M. Kuwano & H. Inomata (1999) Suppression of retinal neovascularization by the NF-kappa B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate in mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40, 1624-1629.
- Yu, A. Y., L. A. Shimoda, N. V. Iyer, D. L. Huso, X. Sun, R. McWilliams, T. Beaty, J. S. K. Sham, C. M. Wiener, J. T. Sylvester & G. L. Semenza (1999) Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Journal of Clinical Investigation*, 103, 691-696.
- Zhang, H. F., M. Bosch-Marce, L. A. Shimoda, Y. S. Tan, J. H. Baek, J. B. Wesley, F. J. Gonzalez & G. L. Semenza (2008) Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 10892-10903.