

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor Molekulární biologie a biochemie organismů



Tereza Blahová

Cílové geny a regulace hypoxií indukovaných faktorů HIF-1 α a HIF-2 α
Target genes and regulation of hypoxia inducible factors HIF-1 α a HIF-2 α

Bakalářská práce

Školitelka: RNDr. Jitka Žurmanová, PhD.

Praha, 2011

Prohlášení

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

V Praze, 6. 5. 2011

Podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce RNDr. Jitce Žurmanové, PhD. za pomoc a vedení při psaní této práce. Děkuji také Bc. Ivaně Bučinské za rady a v neposlední řadě své rodině, které vděčím za podporu při studiu.

Abstrakt

Pro dnešní podobu života na zemi je kyslík nezbytný, je konečným akceptorem elektronů v dýchacím řetězci a umožňuje efektivní tvorbu ATP oxidativní fosforylací. Nedostatečná dostupnost kyslíku snižuje produkci energie a může ohrozit procesy udržující stálé vnitřní prostředí organismu. Proto jsou vyvinuty kompenzační mechanismy, jimiž buňka reaguje na hypoxii. Hlavním regulátorem buněčné odpovědi je hypoxií indukovaný transkripční faktor HIF. Obecně HIF-1 izoforma podporuje glykolýzu a dostupnost glukózy, blokuje energeticky náročné děje v buňce a zmírňuje tak ztráty energie. HIF-2 izoforma stimuluje antioxidační mechanismy snižující množství reaktivních forem kyslíku, které by mohly poškodit buňku. Současně se obě izoformy podílejí na zvýšení přísunu kyslíku aktivací erythropoézy a angiogeneze v postižené oblasti. Tyto změny zajišťují buď přímo, pomocí svých cílových genů, nebo interakcí s jinými transkripčními faktory a ovlivněním buněčných signálních drah.

Klíčová slova

Hypoxie, hypoxií indukovaný faktor 1, hypoxií indukovaný faktor 2, p53, nukleární faktor kappa B, aktivační protein 1, c-Myc

Abstact

Oxygen supply is necessary for today's form of life on Earth. Molecular oxygen is a terminal electron acceptor in mitochondrial respiratory chain and enables the efficient production of ATP by oxidative phosphorylation. The lack of availability of oxygen decreases energy production and can endanger the processes maintaining homeostasis. Therefore the compensatory mechanisms were developed by which cells respond to hypoxia. The master regulator of cellular responses is the hypoxia inducible transcription factor, HIF. In general HIF-1 isoform supports glucose availability and glycolysis; also attenuates energy-consuming processes and thus reduces energy loss. HIF-2 isoform stimulates antioxidant mechanisms to reduce the amount of reactive oxygen species which could cause cellular damage. At the same time, both of isoforms contribute to increasing the supply of oxygen by activating erythropoiesis and angiogenesis in the affected area. HIFs provide these changes either directly, by using their target genes, or by interactions with other transcription factors and signaling pathways.

Keywords

Hypoxia, hypoxia inducible factor 1, hypoxia inducible factor 2, p53, nuclear factor kappa B, activator protein 1, c-Myc

Seznam použitých zkratek

AMPK	AMP-activated protein kinase	mTOR	mammalian target of rapamycin
AP-1	activator protein 1	NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	NBS1	nibrin
ASK	apoptosis signal-regulating kinase 1	NEMO	NF- κ B essential modulator
ATF	activating transcription factor	NF- κ B	nuclear factor kappa B
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3-related protein	NOS	nitric oxide synthase
BNIP3	Bcl-2/E1B 19 kDa interacting protein 3	Nrf	nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 1
CaMK	calmodulin-dependent protein kinase	Oct4	octamer-binding transcription factor 4
Cat	catalase	ODDD	oxygen-dependent degradation domain
CBP	CREB-binding protein	PDK	phosphoinositide-dependent kinase
COX	cytochrome c oxidase	PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase
DAG	diacylglycerol	PGC-1	(peroxisome proliferator-activated receptors gamma)- coactivator
EPO	erythropoietin	PGK	phosphoglycerate kinase
Erk	extracellular signal-regulated kinase	PHDs	prolyl hydroxylases
FIH	factor inhibiting HIF	PI3K	phosphatidylinositol 3 kinase
GLUT	glucose transporter	PIP ₃	phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
Gpx1	glutathione peroxidase 1	PKC	protein kinase C
GSK3 β	glycogen synthase kinase 3 β	PP2A	protein phosphatase 2A
HAF	hypoxia-associated factor	PTEN	phosphatase and tensin homolog
HDAC	histone deacetylase	pVHL	von Hippel-Lindau protein
HIF	hypoxia inducible factor	RACK1	receptor for activated C-kinase
HK	hexokinase	REDD	regulated in development and DNA damage responses
HO-1	heme oxygenase 1	ROS	reactive oxygen species
IGF	insulin-like growth factor	Siah	seven in absentia homolog
IKK	I κ B kinase	Sod	superoxide dismutase
IL-8	interleukin 8	Sp1	specificity protein 1
IPAS	inhibitory PAS domain protein	STAT	signal transducer and activator of transcription
IPC	ischemic preconditioning	SUMO	small ubiquitin-like modifier
JAK	Janus kinase	TAD	transactivating domain
JNK	c-Jun N-terminal kinase	TAK	TGF activated kinase
MAF	musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog	TGF	transforming growth factor
MAPK	mitogen-activated protein kinase	TNFR	tumor necrosis factor receptor
max	myc-associated factor	Tsc	tuberous sclerosis protein
MDM2	murine double minute 2	VEGF	vascular endothelial growth factor
mPTP	mitochondrial permeability transition pore		
MSH	mismatch repair gene		

Obsah

1. ÚVOD.....	1
2. HYPOXIÍ INDUKOVANÝ TRANSKRIPČNÍ FAKTOR HIF	2
2.1. IZOFORMY HIF	2
2.2. STRUKTURA HIF	3
2.3. REGULACE HIF	3
2.3.1. Regulace na úrovni proteinu.....	3
2.3.1.2. Prolyl hydroxylázy PHD	4
2.3.1.3. Degradace závislá na pVHL	4
2.3.1.4. Ostatní proteiny ovlivňující stabilitu HIF	5
2.3.2. Regulace transkripční aktivity	5
2.3.2.1. Koaktivátory transkripce cílových genů HIF-1 α a HIF-2 α	5
3. HIF A CÍLOVÉ GENY	6
3.1. ZVÝŠENÍ DOSTUPNOSTI KYLÍKU V ORGANISMU	6
3.2. METABOLISMUS A HIF	7
3.2.1. Reaktivní formy kyslíku (ROS).....	7
3.2.2. Glykolýza	8
3.3. GENY REGULOVANÉ HIF-2	8
4. HIF A SIGNÁLNÍ DRÁHY	9
4.1. RŮSTOVÝ FAKTOR INZULÍNU (IGF)	9
4.1.2. Vliv hypoxie na působení IGF	11
4.1.3. Další zapojení PI3K-Akt dráhy	12
4.2. TRANSKRIPČNÍ FAKTORY A HIF	12
4.2.1. p53	12
4.2.1.2. Transkripční aktivita p53 za hypoxie	13
4.2.1.3. Regulace p53 za hypoxie	14
4.2.1.4. Interakce p53	14
4.2.2. NF- κ B	15
4.2.2.1. Funkce a regulace	15
4.2.2.2. NF- κ B a hypoxie	17
4.2.3. AP-1	18
4.2.3.2. Aktivace AP-1 hypoxií	19
4.2.3.3. AP-1 jako transkripční faktor za hypoxie	19
4.2.3.4. ROS a AP-1	20
4.2.4. c-Myc.....	20
4.2.4.2. Regulace	20
4.2.4.3. Vliv HIF na degradaci c-Myc	22
4.2.4.4. Dimerizace – další úroveň regulace c-Myc	22
4.2.4.5. HIF ovlivňuje dimerizaci a vazbu transkripčních koaktivátorů.....	22
5. ZÁVĚR.....	25
6. POUŽITÁ LITERATURA	26

1. ÚVOD

Hypoxie je definována jako nedostatečný přísun kyslíku vzhledem k požadavkům organismu na jeho spotřebu. Systémová hypoxie vzniká v důsledku snížení parciálního tlaku kyslíku v arteriální krvi. Ischemická hypoxie je naproti tomu způsobena snížením nebo přerušением krevního zásobení tkáně. Buňky se tak musejí vyrovnávat nejen s nedostatkem kyslíku, ale také s omezeným přísunem energetických substrátů a hromaděním metabolitů. Důsledkem dlouhotrvající ischemie srdeční svaloviny je nevratné poškození buněk a vznik infarktu. Hypoxie je součástí přirozených fyziologických dějů v embryonálním vývoji. Parciální tlak kyslíku v embryonálních buňkách klesá pod 2%, což odpovídá podmínkám v nadmořské výšce 8000 m. Za druhou přirozenou příčinu hypoxie se dá považovat právě pobyt ve vysokých nadmořských výškách. Hypoxie může být také způsobena ztrátou krve nebo poruchou krevetvorby. Ať je příčina hypoxie jakákoliv, musí buňka na tento stav reagovat, neboť dostatečné množství kyslíku je nezbytné pro efektivní využití energie z živin a produkci ATP. Odpověď buněk na hypoxii je komplexní děj a závisí na intenzitě hypoxie a délce jejího trvání. Obecně vede k adaptačním změnám směřujícím ke zvýšení přísunu kyslíku ke tkáním a metabolickým adaptacím, které umožňují snižování spotřeby kyslíku. Dochází k indukci transkripce sérií genů ovlivňujících buněčnou proliferaci, angiogenezi, metabolismus glukózy a železa, i k mnoha posttranslačním modifikacím proteinů. Za hlavní regulátor buněčné odpovědi na hypoxii je považován hypoxií indukovaný transkripční faktor (HIF), který je v současné době studován v souvislosti s kardioprotektivními mechanismy, apnoe, ale i s nádorovým bujením a ischemií mozku.

Hypoxie i adaptační změny s ní spojené jsou intenzivně zkoumány od šedesátých let minulého století. V té době byl pozorován pozitivní vliv přirozené adaptace na hypoxii ve vysokých nadmořských výškách na ochranu srdce (Hurtado 1960). Mechanismy aktivované při nedostatku kyslíku mohou zmírňovat negativní dopady následné ischemie a omezovat rozsah infarktu. Odolnost srdce vůči ischemii může být také zvyšována akutním střídáním krátkodobé ischemie a obnovením průtoku krve, tzv. „preconditioning“ (Murry, Jennings, and Reimer 1986). Bylo zjištěno, že pro jeho efektivní průběh je HIF nezbytný. Tato práce shrnuje poznatky o regulaci HIF společně s protektivními účinky cílových genů HIF. Zvláště jsem se zaměřila na vzájemné ovlivňování HIF a dalších transkripčních faktorů.

2. HYPOXIÍ INDUKOVANÝ TRANSKRIPČNÍ FAKTOR HIF

HIF byl poprvé popsán Semenzou při studiu přepisu genu erythropoetinu. Ukázalo se, že se na 3'enhancer tohoto genu váže transkripční faktor indukovaný hypoxií. Ten byl později v souladu se svými vlastnostmi pojmenován hypoxií indukovaný faktor 1 (G L Semenza and G L Wang 1992).

2.1. IZOFORMY HIF

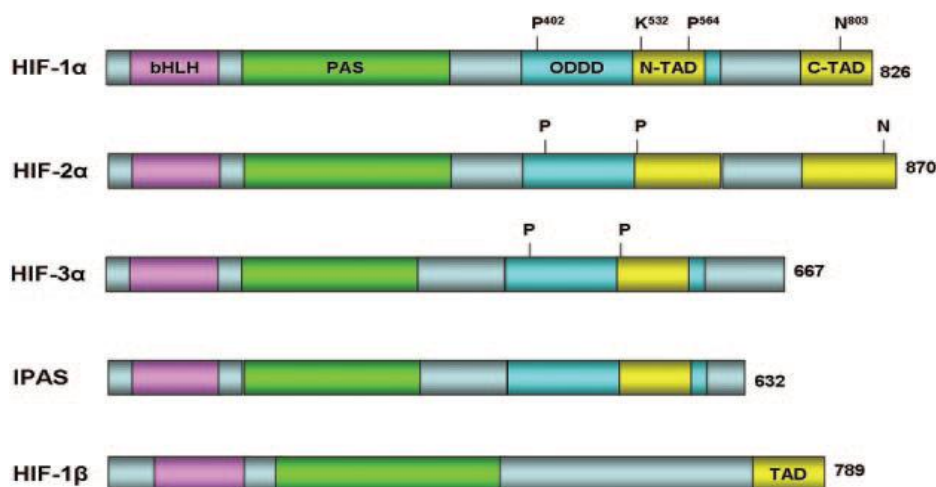
HIF vykazuje transkripční aktivitu až po heterodimerizaci podjednotek HIF- α (120 kDa) a HIF-1 β (91-94 kDa) též zvané jaderný translokátor aryl hydrokarbonového receptoru (ARNT aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). HIF-1 β podjednotky existují tři izoformy (Arnt1, Arnt2 a Arnt3), které se mírně liší svou velikostí, přestože si jsou velmi strukturně podobné. Zatím co HIF-1 β je v buňce přítomný ve stále stejném množství, hladina HIF- α je regulována v závislosti na dostupnosti kyslíku v buňce (Guang L. Wang and Gregg L. Semenza 1995).

Jsou známy tři izoformy HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α a HIF-3 α). HIF-1 α je nejlépe prostudovanou izoformou. Jeho tkáňově specifická distribuce je poměrně rovnoměrná, na rozdíl od HIF-2 α (též endothelial PAS protein EPAS-2, HIF-like factor HLF, HIF-related factor HRF, member of the PAS superfamily 2 MOP2), jehož exprese je více tkáňově specifická a je indukována převážně v játrech, ledvinách, duodenu, mozku, srdci a plicích (Wiesener et al. 2003). Informace o HIF-3 α jsou poměrně omezené, je potvrzena jeho schopnost dimerizovat s beta podjednotkou a vázat se na DNA, ale jeho hlavní role je pravděpodobně inhibiční. Sestříhovou variantou této podjednotky je inhibiční PAS doménový protein (IPAS), který se váže na HIF1- α podjednotku a inhibuje její transkripční aktivitu (Makino et al. 2001). Inhibiční aktivita byla prokázána i u další sestříhové varianty HIF-3 α , která tvoří transkripčně nefunkční komplex s HIF-2 α , a tím mu znemožňuje vazbu na DNA (Maynard et al. 2007). HIF-1 α a HIF-2 α jsou si strukturně podobné, ale jsou vzájemně nezastupitelné. Delece HIF-1 α stejně jako delece HIF-2 α je letální v embryonální fázi vývoje. Embrya HIF-1 $^{-/-}$ mají špatně vyvinutý kardiovaskulární systém, nedostatečné krevní zásobení mozku, snížené množství somitů a defekty při tvorbě neuronálních valů. U embryí, HIF-2 $^{-/-}$, se špatně vyvíjí plíce (převzato z L. Eric Huang and Bunn 2003). Bylo prokázáno, že izoformy HIF se liší v aktivaci některých svých cílových genů. HIF-1 specificky reguluje glykolytické geny (Cheng-Jun Hu et al. 2003), (Cheng-Jun Hu et al. 2007), zatímco HIF-2 se převážně podílí na transkripci cyklinu D, transformujícího růstového faktoru (TGF α) (Raval et al. 2005) a transkripčního faktoru Oct4 (octamer-binding transcription factor 4), který se váže na oktamerní motiv (5'-ATTTGCAT-3'). Oct4 hraje roli v karcinogenezi a časném vývoji, je nezbytný pro přežívání a udržování pluripotence embryonálních kmenových buněk (Covello et al. 2006).

2.2. STRUKTURA HIF

Alfa i beta podjednotky HIF náleží do basic helix-loop-helix Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS) proteinové rodiny. Tyto strukturní motivy umožňují heterodimerizaci podjednotek a následně vazbu na DNA (G L Wang et al. 1995).

Izoformy HIF dále obsahují doménu pro degradaci závislou na kyslíku (oxygen dependent degradation domain, ODDD) a dvě transaktivační domény (TAD) – C-TAD v poloze na C-konci a N-TAD nacházející se blíže N-konci proteinu (obr. 1). HIF-3 α neobsahuje C-TAD doménu a i proto je považována hlavně za inhibitor ostatních alfa podjednotek. HIF-1 β postrádá ODDD, která obsahuje N-TAD, a proto není degradován za normoxie.



Obr 1. Strukturní domény lidských podjednotek HIF (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , IPAS a HIF- 1 β). HIF-1 α náleží do bHLH a PAS proteinové rodiny. HIF-1 α obsahuje ODDD doménu, která je zodpovědná za regulaci stability závislé na kyslíku prostřednictvím hydroxylace dvou prolinových zbytků (P) a acetylace lysinového zbytku (K). Prolinové zbytky jsou zachovány i v HIF-2 α a HIF-3 α . HIF-1 α a HIF-2 α také obsahují dvě transaktivační domény (C-TAD a N-TAD), zatímco HIF-1 β má jen jednu TAD. U každé podjednotky je zaznamenán celkový počet jejích aminokyselin (převzato z Ke and Costa 2006).

2.3. REGULACE HIF

Hladina HIF- α v buňce může být regulována na úrovni proteinu i na úrovni transkripce. Množství HIF mRNA se zvyšuje již půl hodiny po stimulaci buněk hypoxií v buňkách hladkého svalu plicní artérie (BelAiba et al. 2007).

2.3.1. Regulace na úrovni proteinu

Za hlavní regulátor množství HIF- α proteinu jsou považovány prolyl hydroxylázy (PHDs). PHDs potřebují pro svou funkci vedle kyslíku další kofaktory, dvojmocné železo a 2-oxo-glutarát. Při hledání buněčného senzoru kyslíku se poměrně dlouho předpokládalo, že bude obsahovat hem. Mnohé

inhibitory hypoxické odpovědi totiž jsou schopné s touto strukturou interagovat. Nicméně tento předpoklad byl vyvrácen, když byl jako tento senzor kyslíku identifikován PHD, který hem neobsahuje (Epstein et al. 2001).

Za normoxických podmínek PHD hydroxylují prolinové zbytky v ODDD, které se nacházejí u HIF-1 α v pozici Pro 402 a Pro 564, u HIF-2 α se jedná o Pro 405 a Pro 531. Hydroxylované prolinové zbytky rozeznává von Hippel-Lindau protein (pVHL), který zprostředkuje E3 ubiquitinizaci. Takto označené HIF- α jsou následně degradovány 26S proteasomem. K degradaci vede hydroxylace alespoň jednoho z prolylů, na druhé straně mutace jednoho prolylu HIF- α částečně stabilizuje (Epstein et al. 2001), (Iliopoulos et al. 1996).

Za hypoxie tedy chybí prolylhydroxylázám kyslík jako kofaktor, nemohou hydroxylovat prolinové zbytky v ODDD. Tím je znemožněno navázání von Hippel-Lindau proteinu a následné označení HIF ubiquitinem vedoucí k degradaci. Stabilizovaný HIF- α se přemístí do jádra, kde dimerizuje s HIF-1 β a může zahájit svoji transkripční aktivitu. Heterodimer váže další koaktivátory a nasedá na HRE. HRE (hypoxia responsive element) je pěti nukleotidová sekvence RCGTG (R:A/G), která se nachází v blízkosti promotoru či v enhanceru většiny cílových genů HIF (Mole et al. 2009). Za hypoxie dochází k omezení funkce PHD ještě dalším způsobem. PHD1 a PHD3 jsou prostřednictvím Siah1 a Siah2 ubiquitinovány a určeny k proteozomální degradaci (Nakayama et al. 2004).

2.3.1.2. Prolyl hydroxylázy PHD

Byly identifikovány tři izoformy prolyl 4-hydroxyláz, které se podílí na degradaci HIF- α , a to PHD1, PHD2 a PHD3. Liší se intenzitou, kterou hydroxylují prolyly na v N-koncové nebo C-koncové části ODDD, a hlavně afinitou k jednotlivým HIF- α izoformám. PHD1 a PHD3 hydroxylují častěji HIF-2 α , zatímco PHD2 nejúčinněji modifikuje HIF-1 α . Množství jednotlivých izoform PHD se navíc v různých tkáních liší (Rebecca J. Appelhoff and Ya-Min Tian 2004). Aktivita PHD2 a PHD3 je také indukována hypoxií a podílí se tak zřejmě na zpětnovazební regulaci množství proteinu HIF. Tento zajímavý jev byl zjištěn už při objevu prolylhydroxyláz (Epstein et al. 2001). Nově se ukazuje, že prolyly ODDD HIF-1 α a HIF-2 α mohou být hydroxylovány i strukturně odlišnějším typem hydroxylázy – transmembránovou hydroxylázou P4H-TM nacházející v membráně endoplazmatického retikula (Koivunen et al. 2007).

2.3.1.3. Degradace závislá na pVHL

Bylo prokázáno, že acetylace lysinového zbytku K532 v ODDD HIF-1 α přispívá k interakci mezi HIF-1 α a pVHL, čímž destabilizuje HIF-1 α . Tuto acetylaci provádí acetyl-transferáza (arrest-defective-1, ARD1). Její aktivita není přímo ovlivněna molekulárním kyslíkem, ale množství její mRNA i proteinu klesá během hypoxie (Joo-Won Jeong et al. 2002). Další modifikaci HIF- α zprostředkuje tzv. (SUMO)ylaci realizovanou proteinem „small ubiquitin-like modifier“. SUMOylace může ovlivnit

stabilitu HIF-1 α jak pozitivně (Seong-Hui Bae et al. 2004), tak negativně (Cheng et al. 2007). Umožňuje navázání pVHL, i když HIF-1 α není hydroxylován na prolinových zbytcích (Cheng et al. 2007).

2.3.1.4. Ostatní proteiny ovlivňující stabilitu HIF

Hladina HIF v buňce je ovlivněna i jinými faktory. Asociační faktor hypoxie (HAF, hypoxia associated faktor nebo také SART1₈₀₀), který byl nalezen v proliferujících a rakovinných buňkách, způsobuje degradaci HIF-1 α , na stabilitu HIF-2 α nemá vliv. Zdá se, že HIF-1 α je ubiquitinován prostřednictvím HAF nezávisle na hladině kyslíku v buňce (Koh, Darnay, and Powis 2008).

HIF-1 α může být degradován i další cestou, opět nezávisle na PHD/pVHL (Ye V. Liu et al. 2007). Receptor aktivované protein kinázy C (RACK1) kompetuje s heat shock proteinem 90 (Hps 90). Znemožňuje tak opravu proteinu HIF-1 α pomocí Hps 90 a způsobuje ubiquitinizaci a degradaci HIF-1 α .

Dalším proteinem, který aktivuje HIF-1 α degradaci je E3 ubiquitin ligáza (murine double minute 2, MDM2). Tato degradace je řízená p53 (Ravi et al. 2000).

Fosforylace HIF-1 α Erk-MAP kinázou zvyšuje jeho stabilitu. In vitro p42/p44 (též Erk) a p38 kinázy fosforylují HIF-1 α . Inhibice těchto signálních drah blokuje expresi HIF-1 α cílových genů (Richard et al. 1999), (Sodhi et al. 2000).

2.3.2. Regulace transkripční aktivity

2.3.2.1. Koaktivátory transkripce cílových genů HIF-1 α a HIF-2 α

Aktivační domény, N-TAD a C-TAD, podjednotek HIF-1 α a HIF-2 α jsou zodpovědné za vazbu mnohých koaktivátorů, které tvoří s HIF aktivní transkripční komplex. HIF-1 a HIF-2 mají mnoho společných cílových genů, existují však specificky regulované geny pouze HIF-1 nebo HIF-2. Ačkoliv mechanismus této specifity není zcela objasněn, předpokládá se, že roli hrají strukturální rozdíly mezi TAD doménami jednotlivých izoforem. Koaktivátory transkripce vázané TAD doménami různých izoforem HIF se mohou lišit. Zdá se, že N-TAD doména, odpovídá za přepis specifických cílových genů HIF. Zatímco C-TAD doména umožňuje přepis společných cílových genů (Cheng-Jun Hu et al. 2007).

Hlavním a nejvíce probádaným koaktivátorem transkripce cílových genů HIF je p300 a jeho homolog CREB vazebný protein [(cAMP response element-binding protein)-binding protein, CBP] (Arany et al. 1996). Koaktivátory p300/CBP po své vazbě na C-TAD HIF- α podjednotky zprostředkovávají vazbu dalších koaktivátorů. Tyto koaktivátory jsou nezbytné pro acetylaci histonů, která způsobí rozvolnění chromatinu, a pro stabilizaci transkripčního iniciačního komplexu s RNA polymerázou II (Feng Wang et al. 2010).

Kromě ovlivnění stability HIF- α podjednotky je významná i regulace její transkripční aktivity kterou realizuje factor inhibující HIF (FIH). FIH se váže těsně před C-TAD do inhibiční domény, ale

pro svoji optimální vazbu vyžaduje přítomnost C-TAD. (Mahon, Hirota, and Gregg L. Semenza 2001). FIH je asparagin hydroxyláza a stejně jako ostatní hydroxylázy vyžaduje pro svou funkci Fe^{2+} , 2-oxoglutarát a molekulární kyslík. Za normoxie hydroxyluje asparagin v C-TAD doméně HIF- α (Asn 851 v HIF-2 α , Asn 803 v HIF-1 α), a tím znemožňuje navázání kofaktoru p300 na HIF (Lando, Peet, Gorman, et al. 2002), (Lando, Peet, Whelan, et al. 2002). Byly prokázány i vzájemné interakce mezi HIF, FIH a pVHL. Tento komplex také snižuje transkripční aktivitu HIF, možná vlivem deacetylace histonů (Mahon, Hirota, and Gregg L. Semenza 2001).

Transkripční aktivita HIF může být ovlivněna i pozitivně. S-nitrozylace podjednotky HIF-1 α na cysteinu 800 přispívá ke zvýšení transkripční aktivity HIF-1. Na cysteinu touto modifikací dochází ke změně rozložení nábojů, a získává tak hydrofóbní charakter, který usnadňuje vazbu p300 na HIF-1. S-nitrozylace probíhá v závislosti na produkci NO buňkou (Yasinska and Sumbayev 2003).

3. HIF A CÍLOVÉ GENY

Proteiny HIF regulují na dvě stě genů (Ortiz-Barahona et al. 2010). Zde bude představena jen část z nich, která se podílí na hlavních mechanismech ochrany při hypoxii.

3.1. ZVÝŠENÍ DOSTUPNOSTI KYSLÍKU V ORGANISMU

Erythropoetin (EPO) je hlavní růstový faktor kontrolující množství červených krvinek. Tento glykoprotein se váže na EPO receptor na progenitorových buňkách červených krvinek v kostní dřeni. Vazba vede k dimerizaci receptorů a spouští JAK/STAT kinázovou kaskádu, která stimuluje přežívání a diferenciaci buněk. Právě výzkum EPO vedl k objevení transkripčního faktoru ovlivněného hypoxií HIF-1 (G L Semenza and G L Wang 1992). V dospělosti je ale produkce EPO ovlivněna hlavně HIF-2 (Gruber et al. 2007). HIF-1 sice nemůže zastoupit HIF-2 v produkci EPO, ale podílí se na tvorbě červených krvinek jiným způsobem. Reguluje proteiny zodpovědné za vstřebávání železa a jeho uvolňování z buněk a přesun do kostní dřene, kde je nutný pro syntézu hemoglobinu. HIF-1 zvyšuje transkripci ceruloplasminu (Mukhopadhyay, Mazumder, and Paul L. Fox 2000), transferrinového receptoru (Tacchini et al. 1999) a transferrinu (Rolfes et al. 1997), naopak reprimuje hepcidin (Peyssonnaud et al. 2007). Za expresi transportéru dvojmocných iontů 1 (DMT1) v duodenu, kterým je absorbováno železo, je ale výhradně zodpovědný HIF-2 (Mastrogiannaki et al. 2009).

Červené krvinky ovlivňují dodávku kyslíku v celém organismu, jejich tvorba tedy představuje systémovou odpověď na hypoxii. Naproti tomu angiogeneze zvyšuje přísun kyslíku jen do určité oblasti,

kde je aktivována. Za úvodní aktivaci endoteliálních buněk je zodpovědný růstový faktor endotelia cév (VEGF), který je indukovaný HIF-1 (Forsythe et al. 1996) i HIF-2 (Akeno et al. 2001). VEGF receptor se ale zdá být aktivován jen HIF-2 (Elvert et al. 2003). K tvorbě funkčních cév ovšem nestačí jen VEGF. HIF-1 reguluje expresi kritických angiogenních růstových faktorů (PLGF, ANGT, PDGFB) a to ještě v závislosti na typu buňky (Kelly et al. 2003). HIF-1 také aktivuje SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) i jeho receptor CXCR4 v endoteliálních buňkách. Exprese SDF-1 přitahuje volně cirkulující buňky s CXCR4 do hypoxické tkáně a vede k jejich zahánění, tím se oba proteiny podílí na angiogenezi (Ceradini et al. 2004), (Schioppa et al. 2003).

3.2. METABOLISMUS A HIF

3.2.1. Reaktivní formy kyslíku (ROS)

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou vzhledem k nepárovému elektronu ve valenční vrstvě velmi reaktivní. Působením ROS může dojít k poškození DNA, oxidaci nenasycených mastných kyselin membránových lipidů a aminokyselin v proteinech. Finální koncentrace ROS buňce je výsledkem jejich produkce a kapacity antioxidantních systému. Většina ROS v buňce je produkována vedle NADPH oxidázy, komplexy I a III dýchacího řetězce, proto jsou hlavně mitochondrie náchylné k oxidativnímu poškození. Určitá hladina ROS je v buňce běžně přítomná a v bezprostřední přiměřené reakci na hypoxii mohou mít i protektivní účinek (převzato z Halestrap, Clarke, and Khaliulin 2007), ale jejich nadměrná akumulace vede k poškození buňky, proto je potřeba jejich množství regulovat. Aktivace HIF umožní výměnu podjednotky cytochrom c oxidázy COX4-1 za COX4-2. Cytochrom c oxidáza je IV. komplexem dýchacího řetězce, který umožňuje předávat elektrony z cytochromu c na kyslík za vzniku vody. Výměnou jeho podjednotky se buněčné dýchání přizpůsobí nedostatku kyslíku, zvýší se syntéza ATP a omezí uvolňování H₂O₂ (Fukuda et al. 2007). Tato výměna je realizována indukcí exprese COX4-2 proteiny HIF-1 i HIF-2 a současnou HIF-1 aktivací exprese mitochondriální proteázy LON, která degraduje COX4-1 (Fukuda et al. 2007). Dalším HIF-2 regulovaným genem je frataxin. Frataxin je chaperonem mitochondriální aconitázy a chrání ji před oxidativním stresem (Oktay et al. 2007), což přispívá ke správné funkci citrátového cyklu. Kromě toho je HIF-2 transkripčním faktorem pro obě izoformy superoxid dismutázy (Sod2, Sod1), glutathion peroxidázu (Gpx1) a katalázu (Cat). Superoxid dismutáza přeměňuje superoxidové radikály na peroxid vodíku, ten je pak zpracován katalázou na vodu a molekulu kyslíku nebo glutathion peroxidázou na vodu. Delece HIF-2 proto vede ke zvýšenému oxidativnímu stresu buněk (Scortegagna et al. 2003). Hemoxygenáza 1 (HO-1), cílový gen HIF-1 (Patty J. Lee et al. 1997), degraduje pro-oxidativní hem na kysličník uhelnatý, ionty železa a biliverdin,

přeměňovaný na antioxidantní bilirubin. HO-1 tedy také zmírňuje oxidativní poškození buněk (Yet et al. 2001).

3.2.2. Glykolýza

Další možný způsob, jak bránit vzniku ROS, je omezit práci mitochondrií. Dýchací řetězec za hypoxie navíc ztrácí efektivitu, a je potřeba získávat energii alternativním způsobem - glykolýzou. Zvýšený přísun glukózy do buňky zajišťují obě izoformy HIF- α aktivací exprese glukózového transportéru (GLUT) (Ebert, Firth, and Peter J. Ratcliffe 1995), (Raval et al. 2005). Geny glykolýzy jsou však výhradně aktivovány HIF-1, který také podporuje přeměnu pyruvátu na laktát aktivací transkripce laktát dehydrogenázy (Cheng-Jun Hu et al. 2003) a brání vzniku acetyl-CoA. Stejně tak kináza pyruvát dehydrogenázy (PDK1), cílový gen HIF-1, fosforyluje podjednotku pyruvát dehydrogenázy, inhibuje tak její činnost a brání přeměně pyruvátu na acetyl-CoA. Acetyl-CoA vstupuje do citrátového cyklu v mitochondriích, kde jeho zpracování umožňuje syntézu ATP. Expresí PDK1 je tedy omezena činnost mitochondrií, spotřeba kyslíku oxidativní fosforylací a vznik ROS. HIF-1 navíc při dlouhodobější hypoxii navozuje autofágii mitochondrií aktivací exprese BNIP3, který v tomto procesu hraje nezbytnou roli (Huafeng Zhang et al. 2008).

3.3. GENY REGULOVANÉ HIF-2

Stejně jako HIF-1 specificky reguluje geny glykolytického metabolismu, existují i geny regulované pouze HIF-2. V rakovinných buňkách ledvin výhradně HIF-2 aktivuje cyklin D1, TGF α a VEGF. Cyklin D1 je důležitý pro přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu, TGF a VEGF jako růstové faktory také vedou k buněčné proliferaci (Raval et al. 2005). Specifická regulace VEGF a TGF α aktivací HIF-2 byla potvrzena i u embryonálních buněk. Navíc zde byl identifikován i další gen Oct4 indukovaný HIF-2, jehož proteinový produkt brání diferenciaci embryonálních buněk a udržuje pluripotenci blastocytů (Covello et al. 2006).

HIF-1 a HIF-2 nejsou vzájemně zastupitelné, zároveň ale jejich role nejsou jasně odděleny. Bylo zjištěno, že skupina genů regulovaných preferenčně HIF-1 nemá ve svém okolí žádnou nukleotidovou sekvenci, která by je výrazně odlišovala od skupiny genů specifickou pro HIF-2. Vliv bude mít spíše struktura chromatinu, a tedy přístupnost genů pro transkripční faktory (Mole et al. 2009). Podle jiné teorie roli hraje poměr HIF-1 a HIF-2 v buňce (Holmquist-Mengelbier et al. 2006). Jak už bylo zmíněno, odlišnosti mezi cílovými geny proteinů HIF mohou být vysvětleny i kooperací HIF s rozdílnými transkripčními faktory. I proto je možné, aby se aktivita HIF lišila v závislosti na buněčném typu a podmínkách. Například VEGF v některých buněčných typech není regulován

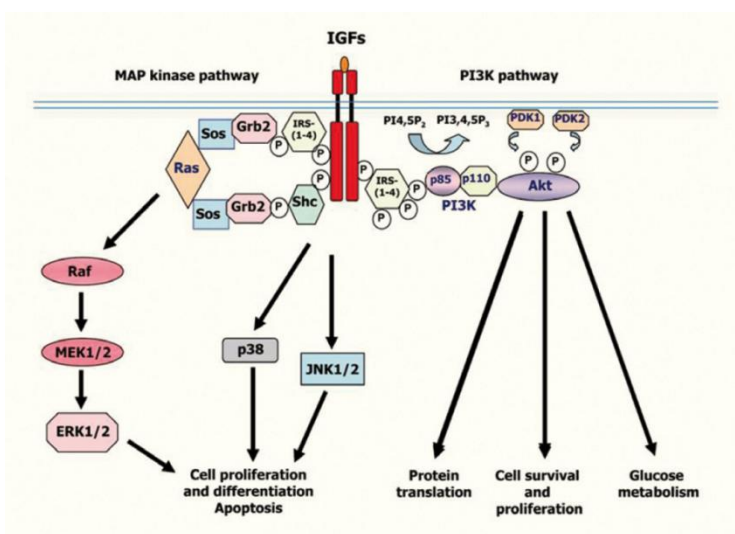
HIF-1 a HIF-2 může za určitých podmínek přepisovat PGK1, glykolytický gen, regulovaný, jak se věřilo, pouze HIF-1 (Holmquist-Mengelbier et al. 2006).

4. HIF A SIGNÁLNÍ DRÁHY

Hypoxie zasahuje do mnoha buněčných signálních drah a mnoho těchto intervencí je zprostředkováno přímo aktivací HIF. Zajímavou ukázkou, jak HIF zasahuje do buněčné odpovědi na IGFs (insulin-like growth factors) nedávno přinesli Ren a kol. Aktivace IGF receptoru je signálem pro dělení a diferenciaci buněk, brání apoptóze a chrání buňku ve stresovém prostředí, např. při nízkém pH, osmotickém stresu, nedostatku živin a hypoxii. Avšak odpověď buňky na stimulaci IGF závisí na okolních podmínkách. Za normoxie IGF indukuje diferenciaci myoblastů, za hypoxie ovšem vede k jejich proliferaci (Hongxia Ren, Accili, and Duan 2010).

4.1. RŮSTOVÝ FAKTOR INZULÍNU (IGF)

Vazba IGF na membránový receptor (IGF1R) aktivuje dvě hlavní signální dráhy. IGF1R je tyrozin kinázový receptor, po navázání IGF dochází k autofosforylaci a vazbě adapterových proteinů, které umožní vazbu a aktivaci Ras. Ras se váže na Raf a svou vazbou ho aktivuje. Raf je kináza schopná fosforylovat a aktivovat MEK, MEK pak fosforyluje MAPK. Působení IGF je tedy v buňce zprostředkováno klasickou MAP kinázovou drahou, sérií fosforylací přes proteiny Ras-Raf-MEK1/2 až k fosforylaci a aktivaci Erk1/2 MAP kinázy (extra-cellulat-signal-regulated kinase). IGF aktivuje i další proteiny MAPK rodiny a to p38 a JNK (obr. 2) (převzato z Arunee Hematulin 2010).

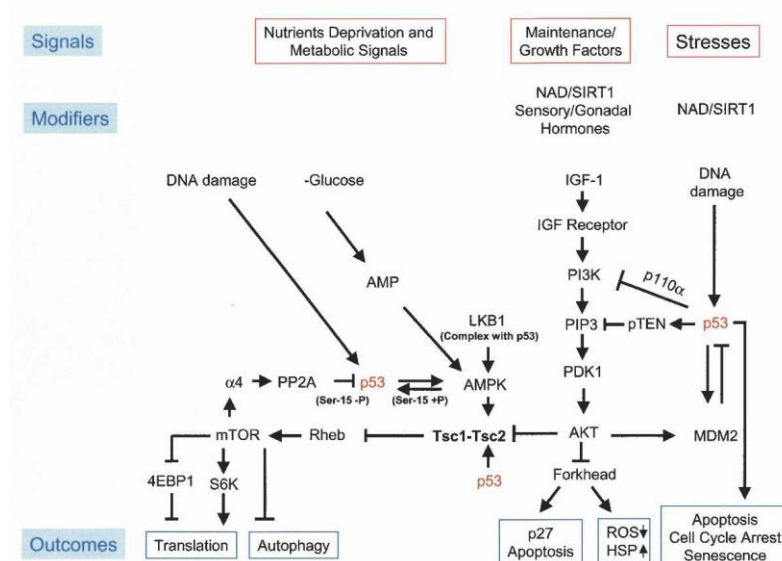


Obr. 2 Schéma aktivace IGF1 receptoru a následných signálních drah. IGF1R aktivovaný svým ligandem (IGFs) stimuluje intracelulární signalizaci a reguluje tak proliferaci a buněčné přežívání. Pro buněčnou odpověď na aktivaci IGF1R jsou klíčové signální dráhy Ras-Raf-MEK-Erk a PI3K-Akt. Dvě mitogeny aktivované proteinové (MAP) kinázy, p38 a JNK, jsou také aktivované vazbou IGF-1 na receptor. MAP kinázy ovlivňují přežití, diferenciaci, proliferaci i apoptózu buňky. Signalizace PI3K-Akt drahou ovlivňuje translaci proteinů, buněčné přežívání, proliferaci a metabolismus glukózy (převzato z Arunee Hematulin 2010) .

Druhá dráha indukovaná IGF bývá označována jako PI3K-Akt-mTOR. PI3K (phosphatidyl inositol 3-kinase) je aktivovaná v důsledku vazby IGF na receptor a svou činností zvyšuje lokální koncentraci PIP₃ v plazmatické membráně, které mají schopnost vázat protein kinázu B (Akt) i PDK (phosphoinositide-dependent kinase). PDK v této situaci fosforyluje Akt, a tím ji aktivuje. Aktivovaná Akt fosforyluje a inaktivuje pro-apoptotické proteiny např. člena Bcl-2 rodiny protein Bad či kaspázu. Akt mimo jiné aktivuje protein MDM2, který ubiquitínuje p53 a tím dá signál k jeho degradaci. p53 vede k apoptóze, zastavení buněčného cyklu nebo senescenci (převzato z Arnold J Levine et al. 2006). Aktivovaná Akt též fosforyluje hexokinázu 2 (HKII), která je pod přímou transkripční kontrolou HIF-1 (Riddle et al. 2000). Fosforylace HKII vede k její asociaci s VDAC pórem na vnější mitochondriální membráně, což přímo zabraňuje aktivaci apoptózy u izolovaných kardiomyocytů (Miyamoto, A N Murphy, and J H Brown 2007).

Akt také vede přes řadu kroků k aktivaci mTOR (mammalian target of rapamycin). Akt fosforyluje a inaktivuje Tsc2 (tuberous sclerosis protein). Tsc2 by vytvořil komplex s Tsc1, který funguje jako GAP – stimuluje specifické GTPázy. Tsc1-Tsc2 komplex stimuluje GTPázovou aktivitu GTP vazebného proteinu Rheb a tím ho inaktivuje. Akt tedy brání inaktivaci Rheb, který následně může aktivovat TOR kinázu (obr. 3) (převzato z Arnold J Levine et al. 2006).

TOR kináza přispívá k fosforylaci 4EBP, ten zřejmě díky změně náboje způsobené fosforylací už není schopen déle vázat eukaryotický iniciační faktor eIF4E. eIF4E je nutný pro iniciaci translace mRNA s čepičkou (Brunn et al. 1997). TOR kináza fosforyluje i S6 kinázu, která modifikuje ribozomální protein S6 a reguluje řadu transkripčních faktorů (Burnett et al. 1998). TOR také vede, přes protein fosfatázu 2A (PP2A), k defosforylaci Ser15 proteinu p53 (Kong et al. 2004) a tím „zncitlivuje“ p53 vůči signálům, které by mohly vést k apoptóze.



Obr.3 Interakce mezi p53 signální dráhou a drahami IGF-1-Akt-mTOR. p53, IGF-1 a mTOR signální dráhy jsou aktivovány stresovými podmínkami, metabolickými signály a růstovými faktory. Každá z těchto drah obsahuje centrální uzel (p53-MDM2, IGF-1-Akt, Tsc1-Tsc2-mTOR), který rozhoduje mezi různými efekty jejího působení. Dráhy se, prostřednictvím proteinů, v těchto uzlech vzájemně ovlivňují a tak koordinují svůj dopad na buněčnou odpověď (převzato z Arnold J Levine et al. 2006).

4.1.2. Vliv hypoxie na působení IGF

Hypoxie zasahuje do signálních drah aktivovaných IGF a mění tak reakci buněk na jeho přítomnost. Za normoxie vede IGF k diferenciaci myoblastů, za hypoxie ovšem způsobuje jejich proliferaci. Autoři článku (Hongxia Ren, Accili, and Duan 2010) nejdříve zkoumali vliv hypoxie na PI3-Akt-mTOR signální dráhu. Na buněčném modelu zjistili, že hypoxie prostřednictvím HIF-1 výrazně snižuje fosforylaci Akt indukovanou IGF, a tím i aktivitu tohoto proteinu. K fosforylaci Akt ovšem dochází působením IGF během normoxie. Snížení aktivity Akt následně sníží i aktivitu mTOR. Působení mTOR by vedlo k buněčné diferenciaci. Tato signální dráha neovlivňuje buněčné dělení.

Hypoxie ovlivňuje i MAP kinázové dráhy. IGF působí fosforylaci Erk i za normoxie, ovšem za hypoxie je množství IGF aktivovaných Erk mnohem větší a tato aktivace je trvalejší. I v Erk signální kaskádě je účinek hypoxie zprostředkován HIF-1. Inhibice Erk vede k diferenciaci buněk a snižuje proliferaci buněk nijak neovlivněných i stimulovaných IGF. Lze tedy předpokládat, že Erk zprostředkovává proliferaci buněk indukovanou IGF a působí proti diferenciaci buněk pod vlivem IGF (Hongxia Ren, Accili, and Duan 2010).

p38 MAP kinázová signální kaskáda má nezbytnou roli při diferenciaci myoblastů. Navození stálé aktivace p38 vede k vyšší diferenciaci za normoxie i hypoxie a ruší proliferací účinek IGF za hypoxie. Hypoxie podstatně snižuje aktivitu p38, což mění buněčnou odpověď na IGF z diferenciaci na proliferaci. V tomto případě nebyl vliv HIF-1 zkoumán (Hongxia Ren, Accili, and Duan 2010).

Autoři článku (Hongxia Ren, Accili, and Duan 2010) nastiňují i možné mechanismy, kterými hypoxie může ovlivnit signální dráhy IGF. Hypoxie může snížit aktivitu mTOR dvěma způsoby. Mezi cílové geny HIF patří protein regulovaný během vývoje a v odpovědi na poškození DNA (REDD1, regulated in development and DNA damage responses 1), který umožní vznik Tsc2-Tsc1 komplexu, tento komplex potlačí schopnost Rheb aktivovat mTOR (Wolff et al. 2011). Druhý způsob není zprostředkován HIF. Nedostatečné množství kyslíku, konečného akceptoru elektronů při buněčném dýchání, vede k neefektivnímu využívání energetických substrátů a ke zvýšení AMP v buňce. AMP je koaktivátorem AMP-aktivované kinázy (AMPK), která fosforyluje a aktivuje Tsc2, což opět vede ke snížení množství aktivovaného mTOR (Liping Liu et al. 2006). Existuje ještě třetí možnost, také nezávislá na HIF. Hypoxie zvyšuje množství PML (promyelocytic leukaemia tumour suppressor), který se přímo váže na mTOR a znemožní mu interakci s Rheb (Bernardi et al. 2006).

AMPK by celou signální kaskádu mohla ovlivňovat ještě další cestou. AMPK zvyšuje stabilitu p53 (Z. Feng 2005). Cílovými geny p53 jsou PTEN a Tsc2 (Z. Feng 2005). PTEN blokuje PI3K-Akt-mTOR dráhu hned na začátku působením na PI₃ kinázu. Funkce Tsc2 již byla podrobněji vysvětlena, snižuje aktivitu mTOR.

Potlačení aktivity mTOR vede k aktivaci Erk. Roli v tom zřejmě hraje PI3K, která je spojována s aktivací Ras a tím pádem i celé signální dráhy Ras-Raf-MEK-MAPK (Carracedo et al. 2008).

4.1.3. Další zapojení PI3K-Akt dráhy

PI3K-Akt dráha ale může být prostřednictvím HIF i aktivována, jako jeden z kardioprotektivních mechanismů indukovaných střídáním krátkodobé ischemie s obnovením průtoku krve (preconditioning). Její funkce je nezbytná v prvních okamžicích po reperfúzi (Tsang et al. 2004), kdy roste produkce ROS. Za hypoxie se zvyšuje množství adenosinu. HIF-1 zajišťuje expresi cd73, 5'-ektonukleotidázy produkující extracelulárně adenosin, a A2B adenosinového receptoru (Eckle et al. 2008). Adenosin se váže na receptory spojené s trimerním G-proteinem, aktivuje fosfolipázy C a D, které tvoří IP₃ a DAG. To vede k aktivaci protein kinázy C (PKC). Mezi tím působením opioidů a bradikininu dojde k aktivaci PI3K-Akt dráhy. Činnost Akt umožní aktivaci NO syntázy (NOS, nitric oxide synthase), tvorbu NO a ta zas vede k aktivaci PKG. Přítomnost PKG a PKC je důležitá pro otevření K_{ATP} kanálu na vnitřní mitochondriální membráně. Tokem K⁺ dojde k částečné alkalizaci a ke snížení transmembránového potenciálu (převzato z Michael V Cohen and Downey 2008). Nižší potenciál zřejmě znesnadňuje otevření mitochondriálního póru (mPTP, mitochondrial permeability transition pore), které by mohlo vést až k buněčné smrti (Murata et al. 2001). Změna potenciálu zároveň vyústí ve zvýšenou tvorbu ROS. Ty pak také podporují aktivaci PKC (převzato z Michael V Cohen and Downey 2008) a zároveň inaktivují PTEN, negativní regulátor PI3K-Akt signální dráhy (Cai and Gregg L. Semenza 2005). PI3K dráha a aktivace PKC pak vedou k fosforylaci a inhibici GSK3β (glykogen synthase kinase 3β), což opět omezuje otevření mPTP (Juhaszova et al. 2004).

Tato signální dráha také pozitivně ovlivňuje HIF. Růstové faktory NO a EPO mohou aktivovat PI3K-Akt dráhu a díky ní stabilizovat HIF-1α. I když se zdá, že samotná aktivace dráhy není nezbytná ani dostačující k významné regulaci HIF-1α (Arsham et al. 2002). Jedním z možných mechanismů je destabilizace PHD, proteinu, který negativně reguluje HIF. Prostřednictvím PI3K-Akt signální dráhy se zvyšuje množství Siah2 mRNA v buňce (Nakayama, Qi, and Ze'ev Ronai 2009), který je, v reakci na cytokiny nebo stimulaci UV, fosforylován MAPK kinázou p38 (Khurana et al. 2006). Tato fosforylace umožní Siah2 efektivněji vázat ubiquitin na PHD3 a předurčit ho tak k degradaci.

4.2. TRANSKRIPČNÍ FAKTORY A HIF

4.2.1. p53

p53 je známý nádorový supresor, který bývá poškozen v polovině všech typů lidských nádorů a mnoho dalších má špatně regulovaný některý z proteinů p53 signálních drah. Hladina p53 je za normálních okolností v buňce nízká, má totiž velice krátký poločas rozpadu 6-20 min. K jeho stabilizaci ale vede široká škála stresových signálů, kromě hypoxie i poškození DNA, nedostatek energie, aktivace

onkogenů, přítomnost ROS a proteinů teplotního šoku. p53 působí jako transkripční aktivátor i represor. Jeho aktivace vede k apoptóze, zastavení buněčného cyklu či senescenci. Působí také na opravu DNA, ovlivňuje angiogenezi a zasahuje IGF-mTOR signální dráhy (převzato z A J Levine, W Hu, and Z Feng 2006).

Protein p53 obsahuje několik funkčních domén. Patří mezi ně N-koncová aktivační doména, oblast bohatá na prolin, centrální DNA vazebná doména, jaderná lokalizační sekvence a C-koncová regulační doména. Všechny tyto funkční domény podléhají posttranslačním modifikacím, což samozřejmě ovlivňuje chování proteinu (převzato z Boehme and Blattner 2009).

Ačkoliv regulace p53 začíná už na úrovni translace (Takagi et al. 2005), množství p53 je nejpodstatněji ovlivněno proteozomální degradací, ke které je p53 předurčen polyubiquitinací. Dodnes bylo identifikováno víc p53 ubiquitin ligáz, nejdůležitější roli ale zřejmě hraje MDM2. Je zajímavé, že MDM2 může p53 mono- i polyubiquitinovat. Polyubiquitinace vyžaduje vyšší množství MDM2 a spolupráci p300, je signálem pro degradaci v jádře, zatímco monoubiquitinace je nezbytný signál pro export p53 z jádra (Muyang Li et al. 2003), (Grossman et al. 2003). p53 podléhá i celé řadě dalších modifikací, může být fosforylován, acetylován a methylován (převzato z Boehme and Blattner 2009). To dává možnost upravit funkci p53 v závislosti na rozdílných stresových podmínkách i na buněčném typu.

4.2.1.2. Transkripční aktivita p53 za hypoxie

Za hypoxie je pomocí p53 regulován podobný set genů, jako při zvýšeném množství NO (Staib et al. 2005). Naopak v porovnání s poškozením DNA hypoxie umožňuje p53 jeho cílové geny spíše reprimovat než aktivovat (Koumenis et al. 2001). Za hypoxie se sice p53 váže do promotorů svých cílových genů, ale není schopen zajistit jejich transkripci (Krieg, Hammond, and Amato J. Giaccia 2006). Tento funkční rozdíl byl vysvětlen posttranslační modifikací p53 hypoxií. Ačkoliv poškození DNA i hypoxie p53 stabilizují, hypoxie neumožňuje, aby byl p53 acetylován proteinem p300. Funkce p300 je nezbytná pro transkripční aktivaci proteinem p53. Předpokládá se, že acetylace lysinů na C-konci proteinu p53 odhalí DNA vazebnou doménu p53 a zvyšuje jeho schopnost aktivovat transkripci. Hypoxie naopak podporuje vazbu p53 s transkripčním represorem mSin3A, který také interaguje s deacetylázami histonů (HDAC). Ty působí kondenzací DNA v promotoru cílových genů, a tím brání jejich přepisu. Inhibice HDAC a tedy genové represe blokuje apoptózu způsobenou p53 za hypoxie. Apoptóza indukovaná p53 za hypoxie se tak zdá být způsobená genovou represí (Koumenis et al. 2001).

Celý vztah hypoxie a p53 je ale složitější, neboť p53 za hypoxie reguluje množství nejméně 315 genů a víc než polovina z nich je regulována pozitivně (Staib et al. 2005). Takže funkce p53 zdaleka není založena jen na genové represí.

4.2.1.3. Regulace p53 za hypoxie

Hypoxie stabilizuje p53 závisle i nezávisle na HIF. V buňkách ošetřených kobaltem nebo desferrioxainem je stabilizován HIF a poločas rozpadu p53 se zde zvětšil z 25 min na víc než dvě hodiny. Množství p53 mRNA ovlivněno nebylo. Autoři také zjistili, že p53 a HIF-1 α se nachází ve stejném komplexu proteinů, a právě tuto interakci pokládají za možný důvod stabilizace p53 (An et al. 1998). Role HIF-2 v tomto článku zkoumána nebyla, nicméně v takto postaveném pokusu ji nic nevyklučuje.

p53 je ale podstatněji stabilizován v buněčné kultuře až za velmi vážné hypoxie hraničící s anoxií (0,02 % O₂). Protože HIF se v buňce objevuje již za mírnější hypoxie, je pravděpodobné, že p53 je stabilizován hypoxií i nezávisle na HIF. Hypoxie aktivuje ATR kinázu, která fosforyluje p53 na serinu 15 a tím jej aktivuje. Tato modifikace chrání p53 před vazbou MDM2 a následnou ubiquitinací a degradací p53 (Hammond et al. 2002). Hypoxie navíc snižuje množství MDM2 v buňce, což samozřejmě také přispívá ke stabilizaci p53. Hladina MDM2 mRNA však hypoxií ovlivněna není, takže k regulaci nedochází ovlivňováním transkripce (Koumenis et al. 2001).

Aktivace HIF-1 i HIF-2 může v konkrétní situaci vést i k potlačení p53 a jím působené apoptózy. HIF snižují aktivaci p53 chemoterapeutiky a poškozením DNA. Pravděpodobně ale působí nepřímo. HIF svými protektivními účinky snižují hladinu ROS. A protože právě ROS přispívají ke stabilizaci p53, je toto považováno za hlavní mechanismus negativní regulace p53 proteiny HIF (Rohwer et al. 2010), (Bertout et al. 2009).

Na druhé straně p53 ovlivňuje stabilitu HIF indukci MDM2. Kromě toho, že tato ubiquitin ligáza zpětnovazebně reguluje stabilitu p53, může modifikovat HIF-1 α , a označit ho tak k degradaci (Ravi et al. 2000). Tento mechanismus se ale pravděpodobně neuplatňuje v hypoxických podmínkách. Za hypoxie nedochází ke zvýšení transkripce MDM2 a množství proteinu je dokonce snižováno, zřejmě vlivem posttranslačních modifikací (Koumenis et al. 2001). MDM2 navíc nemusí vést k degradaci HIF vždy. V buňkách, které exprimují HIF konstitutivně, negativní regulace MDM2 způsobuje pokles množství HIF-1 α i HIF-2 α (Carroll and Ashcroft 2008).

p53 ovšem může způsobit ubiquitinaci a degradaci HIF-1 α i nezávisle na MDM2. Ubiquitin ligáza zodpovědná za tento proces ale zatím není známá (Choy et al. 2010).

4.2.1.4. Interakce p53

p53 zasahuje do mnoha signálních drah a je jimi také zpětně ovlivňován. Už byly zmíněny jeho interakce se signální drahou PI3K-Akt-mTOR. Po té, co je stabilizován v závislosti na poškození DNA nebo nedostatku energie v buňce, snižuje množství aktivního mTOR, což zastaví buněčný růst a vede k autofágii buňky (převzato z Z. Feng 2005).

Mezi kinázami modifikujícími p53 jsou i výše zmíněné MAP kinázy. Vzhledem k mnoha možnostem posttranslačních úprav p53, je skoro jisté, že konečný efekt p53 v buňce bude záležet na mnoha faktorech. Proto je obtížné činit obecné závěry. Nicméně se zdá, že p38 a JNK po aktivaci stresovými podmínkami protein p53 stabilizují a aktivují. Ačkoliv je Erk aktivován růstovými faktory, alespoň v určitých situacích aktivuje p53 a zastavuje tak buněčný cyklus nebo způsobuje apoptózu (převzato z Gen Sheng Wu 2004).

4.2.2. NF- κ B

Nukleární faktor kappa B je název pro celou rodinu transkripčních faktorů, do které patří proteiny RelA (p65), RelB, RelC, NF- κ B1 (ve variantě p105 nebo p50) a NF- κ B2 (ve variantě p100 nebo p52). p105 a p100 mohou být částečně degradovány do forem p50 a p52, a tím aktivovány. Ale ani ve formě p50 a p52 proteiny neobsahují aktivační doménu. Aby mohly aktivovat transkripci, musejí vytvořit heterodimer s jednou ze zbývajících tří podjednotek (RelA, RelB, RelC). Monomery p50 a p52 tvoří i homodimery schopné vazby na DNA, ale k transkripci příslušného genu dojde až po jejich výměně za NF- κ B s aktivační doménou.

4.2.2.1. Funkce a regulace

Role NF- κ B v buňce není jednoznačná. Reguluje geny, které se podílí na imunitní odpovědi, na procesu oxidativního vzplanutí a rozhodují o apoptóze (převzato z Luqman and Pezzuto 2010). Ačkoliv mezi cílovými geny NF- κ B jsou i anti-apoptotické geny pro Bcl-xL a Bcl-2, působení NF- κ B nevede vždy k přežití buněk.

Aktivace NF- κ B je stimulována mnoha podmínkami. Mezi ně patří tělu vlastní i cizorodé látky, ale také fyzikální a chemický stres. Už téměř dvě desetiletí je známo, že NF- κ B je stimulován i hypoxií (Koong, E Y Chen, and A J Giaccia 1994). NF- κ B má i v tomto případě protichůdné efekty. V některých situacích buňky chrání, jindy působí proapoptoticky.

Dopad působení NF- κ B se může lišit dokonce i ve stejné tkáni v reakci na stejný podnět jen v různých časových expozicích. Nepřiměřená hypoxie a ischemie vede během perinatálního období k poškození mozku. Působí aktivaci NF- κ B ve dvou vlnách, první od 0,5 do 6 hodin po působení hypoxie-ischemie a druhá až po 24 hodinách. Zatím co inhibice NF- κ B v první vlně aktivace neuronů chrání, inhibice druhé vlny zvětšuje poškození mozku (Nijboer et al. 2008).

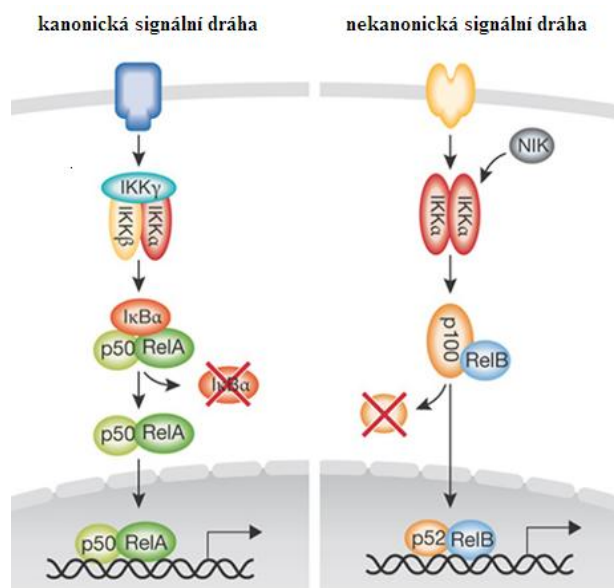
Příkladem buněk, kde NF- κ B působí protektivně, jsou srdeční fibroblasty. Srdeční fibroblasty jsou působením hypoxie méně zranitelné než myocyty nebo jiné fibroblasty. Hrají roli při regeneraci poškozených míst a jsou důležité pro zachování strukturní a funkční integrity myokardia. Jejich odolnost proti stresu je tedy klíčová. V srdečních fibroblastech hypoxie vede k aktivaci NF- κ B,

konkrétně dimeru p65/p50. NF- κ B brání apoptóze aktivované hypoxií, pravděpodobně aktivací anti-apoptického cIAP-2 (Sangeetha et al. 2011).

Naopak inhibice NF- κ B zmírňuje následky ischemicko-reperfúzního poškození, kdy obnovení krevního zásobení tkáně po ischemii působí oxidativní vzplanutí a apoptózu, tedy další poškození tkáně. NF- κ B jako transkripční faktor odpovědný za tvorbu cytokinů, mediátorů oxidativního vzplanutí a apoptózy, patrně přispívá k tomuto poškození. Jeho inhibice zmenšila velikost infarktu a částečně odvrátila apoptózu (Yong Sook Kim et al. 2010).

Přesto, že je aktivace NF- κ B ovlivňována mnoha látkami a vlivy, většina z nich působí přes dvě hlavní signální dráhy (obr. 4). Kanonická, nebo také klasická signální dráha, je aktivovaná například cytokiny, lipopolysacharidy a antigeny. Pokračuje přes rodiny proteinů TRAF a RIP, které aktivují proteinový komplex I κ kináz (IKK) obsahující dvě kinázové podjednotky IKK α a IKK β a regulační podjednotku NEMO (NF- κ B essential modulator). Aktivace IKK vede k fosforylaci, ubiquitinaci a degradaci I κ B, který stabilizuje NF- κ B dimer v cytoplasmě svoji vazbou. Degradace I κ B tedy vede k uvolnění NF- κ B, umožní jeho posttranslační modifikace a vstup do jádra. Do rodiny I κ B patří I κ B α , I κ B β , I κ B γ a I κ B ϵ , každá z těchto izoform má trochu jinou funkci a je ubiquitinována na základě signálů z různých receptorů. Nejvíce prozkoumaný je I κ B α , který váže a udržuje v cytoplasmě hlavně dimer p65/p50.

Ne-kanonická nebo také alternativní signální dráha je spouštěna rodinou receptorů TNFR. Vede také k aktivaci IKK komplexu, tentokrát přes proteiny TRAF a NIK. NIK fosforyluje IKK α a dimer IKK α podjednotek následně fosforyluje p100. Fosforylovaný p100 je ubiquitinován a částečně proteosomálně degradován na svou aktivní formu p52 (převzato z Hayden and Ghosh 2008).



Obr.4 Signální dráhy aktivující NF- κ B. Navázáním ligandu na povrchový receptor aktivuje jednu ze signálních drah. Kanonická signální dráha vede přes IKK komplex k degradaci inhibitoru (I κ B) proteinu NF- κ B, který pak vstupuje do jádra. Nekanonická signální dráha vede přes fosforylaci IKK α dimeru k fosforylaci p100, který je pak aktivován částečnou degradací (upraveno z Bollrath and Greten 2009).

4.2.2.2. *NF-κB a hypoxie*

Hypoxie aktivuje NF-κB skrz kanonickou cestu nově popsáným způsobem. Hypoxie způsobuje uvolnění Ca^{2+} do cytoplazmy. Přesný mechanismus tohoto uvolnění se ale mění v závislosti na buněčném typu. Ca^{2+} aktivuje kinázy závislé na kalmodulinu (CaMK, calmodulin-dependent kinase). CaMK2 přímo váže a aktivuje TAK1. TAK1 tvoří komplex s IKK, který je aktivován ubiquitinací. Připojení ubiquitinu na Lys 63 podjednotky Nemo je zprostředkováno Ubc13. Avšak proti aktivaci komplexu působí protein Cyld, který ubiquitin odpojuje. Hypoxie zvyšuje hladinu Ubc13 a po několika hodinách snižuje množství Cyld. IKK fosforyluje IκBα, ale hypoxie brání degradaci IκBα, takže dojde jen k jeho odpojení od NF-κB. IκBα je před degradací chráněn připojením Sumo-2/3. Není ale zatím jasné, jestli hypoxie stimuluje toto připojení nebo naopak brání odpojení Sumo-2/3 (Culver et al. 2010).

Výše popsáný mechanismus aktivace NF-κB hypoxií nezávisí na HIF-1α a nevyžaduje ani PHD1, PHD2 či PHD3. V jiných pokusech bylo ale zjištěno, že inhibice PHD1 vede k aktivaci NF-κB, pravděpodobně přes uvolnění negativní regulace IKK (Cummins et al. 2006). Do signální dráhy NF-κB by mohla zasáhnout i hydroxylace IκB proteinem FIH (Cockman et al. 2006). Dřívější články také upozorňují na potřebu kináz p42/p44 a PI3K během hypoxické stimulaci NF-κB (Zampetaki et al. 2004). Proto se zdá, že NF-κB je v závislosti na hypoxii aktivován i jiným způsobem.

Hypoxie, kromě samotné aktivace NF-κB, mění i jeho vliv na přepis cílových genů. Hypoxie například indukuje transkripci IL-8 a anti-apoptotického IAP2 a brání přepisu PTEN, oboje prostřednictvím RelA (Culver et al. 2010).

Signální dráhy aktivované hypoxií a NF-κB dráhy jsou propojené i opačným směrem. NF-κB totiž vede k aktivaci HIF ať už zvyšováním stability HIF nebo přímým ovlivněním jeho syntézy, přičemž tato aktivace může být vyvolána různými podněty. Navázání TNF-α na receptor TNFR1 vede přes RIP k uvolnění NF-κB do jádra. V tomto případě NF-κB neovlivňuje transkripci HIF-1α (mRNA zůstává stále stejná), ale zvyšuje množství HIF-1α jeho stabilizací. NF-κB pravděpodobně vede k syntéze zatím neidentifikovaného proteinu, který by mohl zasahovat do ubiquitinizace HIF-1α proteinem VHL (Jung et al. 2003). Další způsob aktivace HIF-1α za normoxie je opět závislý na NF-κB. NF-κB tentokrát přímo zvyšuje transkripci HIF-1α mRNA tím, že se váže do oblasti -197/-188 jeho promotoru. Tato signální dráha je spouštěna zvýšenou hladinou ROS v buňkách hladké svaloviny plicní artérie (Bonello et al. 2007). V buňkách hladké svaloviny NF-κB zvyšuje transkripci HIF i v reakci na hypoxii. I tento výzkum potvrdil, že NF-κB, konkrétně dimer p50/p65, nasedá do oblasti -197/-188 promotoru HIF-1α (BelAiba et al. 2007).

Nedávno byl objeven další překvapivý způsob, kterým může NF-κB ovlivnit množství proteinu HIF v buňce. NF-κB indukovaný vazbou TNF-α na receptor se váže do promotoru HIF-1β a zvyšuje jeho transkripci. Za tento efekt není zodpovědný jen jeden typ dimeru, protože až blokace všech podjednotek NF-κB úplně zastavila syntézu HIF-1β indukovanou TNF-α. Aktivace NF-κB navíc

způsobila i zvýšení množství proteinu HIF-2 α . NF- κ B neovlivňuje přímo transkripci HIF-2 α , ale předpokládá se, že vazba HIF-1 β na HIF-2 α stabilizuje a chrání HIF-2 α před ubiquitinizací a degradací. Takže vyšší množství HIF-1 β vede ke zvýšení stability proteinu HIF-2 α . Je možné, že vliv TNF- α na stabilitu HIF-1 α (popsaný výše) je způsobem stejným mechanismem. HIF-1 β by tedy mohl být onen neidentifikovaný protein, který zvyšuje stabilitu HIF-1 α . Tento článek přináší nový pohled na regulaci proteinů HIF. Množství HIF-1 β se dosud nepřisuzoval velký význam, protože HIF-1 β je v buňce exprimován stále (van Uden et al. 2011).

4.2.3. AP-1

Aktivační protein 1 je označení pro dimery transkripčních faktorů, tvořené převážně proteiny rodin Jun, Fos, ATF, MAF a Nrf. Pro tyto proteiny jsou charakteristické dva strukturní motivy: leucinový zip sloužící k dimerizaci a bazická DNA vazebná doména. Protože AP-1 sjednocuje opravdu velké množství proteinů, dimery se váží do různých regulačních oblastí DNA. TRE (12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate-responsive element) a CRE (cAMP-response element) jsou nejběžnější sekvence, ale AP-1 rozeznávají i MRE (MAF-recognition elements) a ARE (antioxidant-response element) (převzato z Laderoute 2005).

Podjednotky AP-1 jsou obecně regulované na mnoha úrovních, od transkripce až k posttranslačním modifikacím. Proteiny mohou být modifikovány fosforylací, oxidací nebo redukcí, ubiquitinizací nebo sumoylací. Všechny tyto kroky rozhodují o tom, které konkrétní dimery se převážně vytvoří. Ty jsou pak ještě ovlivněny dalšími transkripčními faktory a regulátory. Konečný efekt tedy záleží na buněčném typu a prostředí, ale i na délce trvání stimulu. AP-1 dimery ovlivňují proliferaci, buněčný cyklus, diferenciaci, zasahují do apoptózy, imunitních reakcí a ovlivňují geny anti-oxidativních proteinů. Jejich role nemusí být vždy jednoznačná.

c-Jun ovlivňuje transkripci genů jako cyklin D nebo p19^{ARF}, které regulují buněčný cyklus, a tak podporuje proliferaci. Na druhou stranu v buňkách vystavených UV-záření je schopný indukovat apoptózu (E. Shaulian et al. 2000). JunB je znám jako antagonist c-Jun při transkripci některých genů ovlivňujících buněčný cyklus, ale zároveň i podporuje obnovení buněčného cyklu a je schopný zvyšovat buněčnou proliferaci (převzato z Eitan Shaulian 2010). Geny regulované JunD brání buňku proti oxidantům. Delece JunD zvyšuje množství H₂O₂, které vedlo až k oxidaci Fe²⁺ a snížení dostupnosti tohoto kofaktoru pro PHD. Delece JunD tedy nepřímou zvýšila stabilitu proteinu HIF- α (Gerald et al. 2004). Ani proteiny rodiny ATF nepůsobí na buňku stejně. ATF-2 podporuje buněčnou proliferaci, ATF-5 působí anti-apoptoticky, ATF-1 brání zániku buňkám melanomu a ATF-4 zvyšuje odolnost nádorů proti působení chemických látek. Ostatní členové této rodiny mohou jak negativně tak pozitivně ovlivňovat přežívání buněk (převzato z Vlahopoulos et al. 2008).

Na buněčné odpovědi se navíc nepodílí jen konkrétní podjednotka, ale celý dimer, což je využíváno pro další úroveň regulace AP-1. Dimer c-Jun/ATF2, jehož výskyt se zvyšuje v neuronech při nedostatku draselných iontů, vede k apoptóze. c-fos je také schopný tvořit dimer s ATF2, brání přepisu cílových genů c-Jun/ATF2 a tedy i apoptóze (Yuan et al. 2009). Dalším příkladem změny funkce proteinu v různých dimerech mohou být malé Maf proteiny. Zatímco dimer p45/MafK váže transkripční co-aktivátory a vede k expresi β -globinu v erytroidech, dimer Bach1/MafK tuto transkripci potlačuje (Brand et al. 2004).

Pro dokreslení složitosti fungování AP-1 je ještě zajímavé zmínit, že například ATF2 aktivuje transkripci svého vazebného partnera c-Jun (van Dam et al. 1995) a ATF3 (Liang et al. 1996).

I přes různorodost této skupiny proteinů, se Keith Laderoute pokusil shrnout poznatky o vztahu AP-1 a HIF-1 (převzato z Laderoute 2005).

4.2.3.2. Aktivace AP-1 hypoxií

V mnoha studiích bylo prokázáno, že hypoxie vede k aktivaci AP-1. Ne vždy byly zjišťovány konkrétní proteiny, kterých se to týká, nicméně c-Jun, JunB, c-Fos, FosB a Fra-1 jsou aktivovány hypoxií. Například hypoxie zvyšuje přepis i stabilitu c-Jun mRNA. Nezdá se ale, že by se na transkripci AP-1 podílel přímo HIF, spíše zde hrají roli MAPK signální kaskády (převzato z Laderoute 2005). Hypoxií zvýšená hladina Ca^{2+} vede k aktivaci tyrozin kinázy c-Src a GTP-vazebného proteinu Ras, které dále aktivují MAP kinázy (p38 a Erk) a celé kaskáda vyústí v přepis c-fos (Premkumar et al. 2000). Signální kaskády také budou ovlivněny délkou trvání hypoxie. V myších embryonálních fibroblastech bylo zjištěno, že aktivace c-Jun má dvě fáze. Nejdříve transkripci a aktivaci c-Jun způsobuje jen hypoxie, ale druhá vlna je už závislá na HIF a je zprostředkovaná jeho cílovými geny (Laderoute et al. 2002).

4.2.3.3. AP-1 jako transkripční faktor za hypoxie

AP-1 proteiny za hypoxie aktivují expresi genů VEGF, HO-1, IL-8, ET-1 nebo eNOS. IL-8 zprostředkovává zánětlivou odpověď a je také angiogenním faktorem. ET-1 (endothelin-1) způsobuje vazokonstrikci, buněčný růst a přežívání. NO produkované eNOS (endothelial nitric oxid synthase) naopak působí vazodilatačně (www.genecards.org). Bylo zjištěno, že AP-1 pomáhá HIF-1 v přepisu určitých genů. Vzhledem k cílovým genům AP-1 a HIF-1, je možné, že tyto dva transkripční faktory společně regulují apoptózu (převzato z Laderoute 2005). Existuje model, který předpokládá, že AP-1 a HIF-1 se nachází ve stejném komplexu transkripčních faktorů. Ale HIF-1 a AP-1 pravděpodobně neinteragují přímo (Alfranca et al. 2002).

4.2.3.4. ROS a AP-1

Nedostatek kyslíku, který je konečným akceptorem elektronů v dýchacím řetězci, zhoršuje funkci dýchacího řetězce a vede ke zvýšené tvorbě ROS.

H₂O₂ prostřednictvím MAPK signálních kaskád aktivuje AP-1. H₂O₂ může spouštět tyto signální dráhy více cestami, například způsobuje dimerizaci a aktivaci kinázy MAP kinázy (ASK1) nebo inhibuje MAPK fosfatázy. Aktivované MAPK, nejčastěji p38 a JNK, poté fosforylují c-Jun a ATF2, a podpoří tak jejich schopnost aktivovat transkripci (převzato z M Karin and E Shaulian 2001). Je známo, že mnohé dimery AP-1 svou transkripční aktivitou snižují množství ROS v buňce, a tak ji chrání před poškozením. Dimery tvořené Nrf2 nebo Nrfl a některým proteinem Jun rodiny (c-Jun, JunB, JunD) a Nrfl/MafG se váží na DNA do oblasti nazývané ARE (antioxidant response element) (Venugopal and Jaiswal 1998), (Johnsen et al. 1998). Pod kontrolou ARE jsou geny, které snižují ROS, např. hemoxygenáza 1, glutathion peroxidáza a superoxide dismutáza. Dimer Nrfl/MafG indukovaný TGF-β (transforming grown factor-β) navíc také blokuje promotor genu iNOS (inducible nitric-oxide synthase) (Berg et al. 2007). AP-1 je tedy aktivován za přítomnosti ROS. Jeho cílové geny potom ROS v buňce snižují a tím jí chrání.

4.2.4. c-Myc

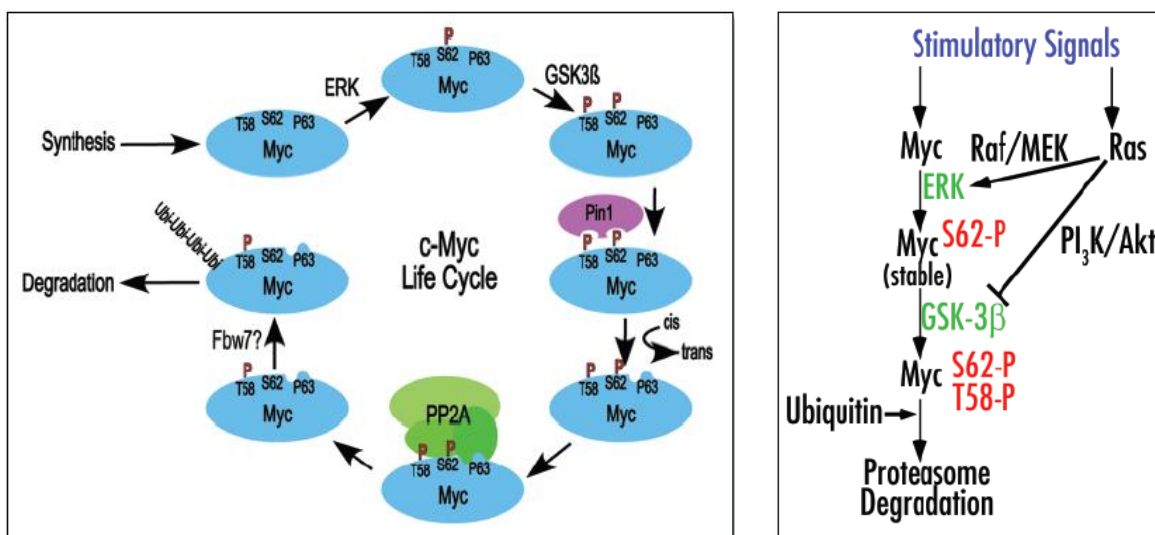
c-Myc patří spolu s N-Myc, L-Myc, S-Myc a B-Myc do Myc rodiny transkripčních faktorů. c-Myc získal svůj název díky podobnosti s v-Myc (myelocytomatosis viral oncogene). Zhruba 15% lidských genů má ve své blízkosti c-myc vazebné místo, jak bylo zjištěno v buněčné linii buněk Daudi Burkittova lymfomu (Zirong Li et al. 2003) a v B-buňkách (Zeller et al. 2006). Z tohoto množství možných cílových genů bylo 668 prokazatelně regulováno aktivací Myc (dvě třetiny pozitivně a třetina negativně). Převažovaly zde geny ovlivňující metabolismus, biosyntézu, buněčný růst, transkripci a regulátory buněčného cyklu (Zeller et al. 2006). Tyto výsledky podporují předchozí zjištění, že c-Myc ovlivňuje metabolismus, buněčný cyklus a apoptózu. Je tedy pochopitelné, že se c-Myc vyskytuje ve zvýšeném množství v mnoha typech rakovinných buněk (převzato z Dang 1999).

4.2.4.2. Regulace

Ačkoliv je množství c-Myc ovlivňováno na úrovni transkripce i stability mRNA (T R Jones and M D Cole 1987), za hlavní regulační mechanismus jsou považovány posttranslační modifikace proteinu, které ovlivňují stabilitu proteinu (obr.5). Právě posttranslační modifikace jsou v první fázi řízené GTP vazebným proteinem Ras. Tento protein aktivovaný růstovými faktory spouští klíčovou dráhu pro buněčnou proliferaci Ras-Raf-MEK-MAPK. Kromě této signální kaskády Ras aktivuje i druhou výše popsanou dráhu PI3K-Akt (Rodriguez-Viciano et al. 1994). Obě tyto dráhy regulují degradaci

proteinu Myc. Fosforylace Ser 62 kinázou Erk zvyšuje stabilitu proteinu c-Myc. Teprve po fosforylaci Ser 62 může dojít k fosforylaci další evolučně zachovalé aminokyseliny Thr 58. Fosforylace Thr 58 ale naopak vede k ubiquitinaci a proteosomální degradaci c-Myc. Za fosforylaci Thr 58 je zodpovědná kináza GSK3 β , jejíž aktivita je v počáteční fázi buněčné proliferace inhibována PI3K-Akt signální drahou. Ras tedy stabilizuje c-Myc jednak fosforylací Ser 62 a jednak zabráněním fosforylaci Thr 58 (Sears et al. 2000). V této souvislosti je důležité zmínit, že c-Myc vede k přepisu cyklinu D2 a E2F1 a represi p21 a p27, což umožňuje přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu.

Poté co c-Myc přestane být chráněný proteinem Ras v pozdní G1 fázi a dojde k fosforylaci Thr 58, c-Myc je rozeznán proteinem Pin 1, který způsobí izomerizaci vazby serin 62-prolin 63. Následně Ser 62 defosforyluje protein fosfatáza 2A a c-Myc je ubiquitinován. Roli v tom hrají dvě podjednotky E3 ubiquitin ligázy Skp2 a Fbw7 (převzato z Sears 2004).



Obr.5 Životní cyklus c-Myc od syntézy po degradaci a jeho závislost na proteinu Ras. Nejprve dochází ke stabilizační fosforylaci kinázou Erk na Ser 62, takto modifikovaný c-Myc může být dále fosforylován na Thr 58 kinázou GSK3 β , po následné izomerizaci je c-Myc defosforylován PP2A, ubiquitinován a degradován (převzato z Sears 2004).

Vztah c-myc a Ras je zajímavý i z jiného pohledu. Bylo zjištěno, že deregulovaná aktivace c-Myc a Ras postačuje ke vzniku rakovinných buněk. Ras potlačuje c-Myc indukovanou apoptózu buněk a c-Myc brání senescenci působené proteinem Ras. Ser 62 proteinu c-Myc může být fosforylován i cyklin E/ cyklin dependentní kinázou 2 (Cdk2) a právě fosforylace touto kinázou odvrací senescenci působenou Ras. Naopak inhibitory Cdk2, proteiny p27 a p21, nedovolují Cdk2 modifikovat c-Myc a působit tak proti senescenci (Hydbring et al. 2010).

4.2.4.3. Vliv HIF na degradaci c-Myc

V buňkách plicního karcinomu působí HIF-1 i HIF-2 degradaci c-Myc. Nejprve dojde k fosforylaci Thr 58, i když překvapivě jinou kinázou než GSK3 β , poté je c-Myc modifikován E3 ubiquitin ligázou. HIF ovlivňují pouze ubiquitinaci proteinem Fbw7. c-Myc a Fbw7 totiž tvoří komplex s USP 28, enzymem, který je schopný rozrušit řetězec ubiquitinu. A právě tento enzym zvyšující stabilitu c-Myc je degradován díky HIF. Hypoxie navíc způsobuje dimetylací histonu H3 na lyzinu 9 (H3K9m2) v promotoru genu USP 28. H3K9m2 vede k navázání heterochromatin proteinu 1 nebo k deacetylaci histonů H3 a H4, a tím ke kondenzaci chromatinu, která brání genové expresi (Qin Li et al. 2009).

4.2.4.4. Dimerizace – další úroveň regulace c-Myc

Myc má na své N-koncové části doménu aktivující transkripci cílových genů. C-konec obsahuje b/HLH/Z (basic/helix-loop-helix/ leucine zipper) motiv, který je odpovědný za dimerizaci Myc s dalším b/HLH/Z proteinem Max. Společně se váží na sekvenci bází DNA nazývanou E box, která se nachází v mnoha genech aktivovaných Myc. Max je v buňkách exprimován stále, zatímco množství c-Myc značně kolísá. Jeho poločas rozpadu je 30 minut.

Max na rozdíl od Myc může homodimerizovat, váže se také na další b/HLH/Z proteiny Mnt (Rox), Mxd11-4 (nazývané také Mad1, Mxi1, Mad3, Mad4) a Mga, které ovšem potlačují transkripci. Tyto heterodimery negativně regulují mnoho genů, které jsou aktivované Myc/Max dimerem. Buď se na geny přímo váží a zprostředkují jejich interakci s represory transkripce (jako je mSin3 a deacetyláza) nebo je potlačují nepřímo tím, že připraví c-Myc o jeho vazebného partnera Max (převzato z Gallant and Steiger 2009).

Ovšem toto je jen základní model, který je postupně rozšiřován. c-Myc se neváže jen do E boxů (Zeller et al. 2006) a zdá se, že ne všechny funkce c-Myc jsou závislé na Max (převzato z Gallant and Steiger 2009).

4.2.4.5. HIF ovlivňuje dimerizaci a vazbu transkripčních koaktivátorů

HIF působí na c-Myc i tím, že interaguje přímo s ním i jeho vazebnými partnery. HIF-1 α brání vazbě c-Myc s Max. Jednak zvyšuje množství Mxi1 (stejně jako HIF-2) a pak se sám váže na Max. HIF-1 α také vytěsňuje c-Myc z vazby na transkripční koaktivátor Sp1. HIF-2 α naopak posiluje vazbu c-Myc, Max a transkripčních koaktivátorů.

Bylo zjištěno, že HIF-1 i HIF-2 se přímo váží na gen Mxi1 a zvyšují jeho transkripci. Mxi1 pak místo c-Myc dimerizuje s Max a inhibuje tak transkripci cílových genů c-Myc. Mezi takto negativně regulované geny proteiny HIF-1 a HIF-2 patří PGC-1, jehož produkt vede k biogenezi mitochondrií (Huafeng Zhang et al. 2007).

HIF-1 α snižuje množství MutSa, dimeru MSH2 a MSH6. MutSa je součástí systému, který rozeznává poškození DNA, brání rekombinaci a opravuje chyby. HIF-1 α se váže do promotoru MSH2

na transkripční faktor Sp1, na místo, které bývá za normoxie obsazeno c-Myc. Tím brání c-Myc v přepisu tohoto genu (Koshiji et al. 2005). HIF-1 α přispívá ke genetické nestabilitě i negativní regulací proteinu NBS1. HIF-1 α se i v tomto případě váže na Sp1, ale nevyžaduje přítomnosti p53 k regulaci NBS1 (k regulaci MSH2 p53 potřeba je). HIF-2 α se této regulace neúčastní na rozdíl od HIF-1 α . Tento funkční rozdíl se podařilo vysvětlit díky strukturním rozdílům v PAS-B doméně. Bylo zjištěno, že Thr 324 proteinu HIF-2 α je fosforylován PDK1 (pyruvát dehydrogenáza kináza), a právě tato fosforylace brání vazbě HIF-2 α na Sp1 a kompetici s c-Myc. Thr 322 na HIF-1 α není fosforylován PDK1. HIF-1 α ale ovlivňuje víc hladinu proteinu NBS1 než množství jeho mRNA, proto se předpokládá, že HIF-1 α bude působit ještě dalším mechanismem (To et al. 2006) .

Kromě toho HIF může ještě ovlivňovat expresi cílových genů c-Myc jiným způsobem. Bylo prokázáno, že HIF-1 α kompetuje o vazebné místo s c-Myc v promotoru jeho cílových genů. Vazba HIF-1 α je pravděpodobně silnější než c-Myc, čímž ho z promotoru vytěsňuje. HIF-1 α je také schopný slabé vazby přímo na c-Myc. Tato interakce opět znemožňuje c-Myc nasednout do promotoru cílových genů. Oba tyto způsoby se uplatňují při regulaci buněčného cyklu. HIF-1 α brání c-Myc ve vazbě na promotor genu p21 a v jeho represi. HIF-1 α tak pozitivně reguluje p21, tím zastavuje buněčný cyklus (Koshiji et al. 2004). Předpokládá se, že podobný mechanismus funguje i u p27. HIF-1 α také brání c-Myc v jeho represi (Mack et al. 2005).

Další regulace jsou zprostředkované vazbou HIF-1 α na Max, která připravuje c-Myc o jeho vazebného partnera a tím mu bere možnost ovlivňovat transkripci. Je zajímavé, že HIF-2 α se také nachází v komplexu s Max, jeho efekt je ale opačný než HIF-1 α . HIF-2 α násobí transkripční aktivitu c-Myc, což vede k buněčné proliferaci. HIF-2 α podporuje vznik nebo stabilitu komplexu c-Myc/Max a dalších koaktivátorů transkripce Sp1 a Miz1. Možná toho dosahuje i tím, že brání vazbě Max s Mad1 (Gordan et al. 2007).

Hlavní úloha c-Myc za normoxie spočívá v navození růstu buněk. c-Myc umožňuje přechod s G1 do S fáze a zajišťuje dostatek materiálu a živin. HIF naproti tomu omezuje energetický výdej, brání proliferaci a snaží se tak zajistit přežití buněk.

Společnými cílovými geny HIF-1 a c-Myc jsou transportéry glukózy a většina glykolytických genů (hexokináza, fosfoglukóza izomeráza, fosfofrukto kináza, aldoláza, trióza fosfát izomeráza, glycerinaldehyd-3P- dehydrogenáza, fosfoglycerát kináza, enoláza a pyruvát kináza) (převzato z Gordan, Thompson, and Simon 2007). Současná přítomnost HIF-1 a c-Myc v buňce opravdu zvyšuje glykolýzu. Zajímavé ale je, že byla prokázána zvýšená transkripce jen jednoho z těchto genů a to hexokinázy 2, alespoň v buňkách Burkittova lymfomu. Koexprese HIF-1 a c-Myc vedla mimo to i k transkripci VEGF (Jung-whan Kim et al. 2007).

Zatímco za hypoxie se glykolýzou nahrazují ztráty energie vzniklé sníženou funkcí dýchacího řetězce, c-Myc podporuje využití té to energie v biosyntéze. Mezi cílové geny c-Myc patří CAD

(carbamoyl-phosphate syntase 2, aspartate transcarbamylase and dihydroorotase), SHMT (serin hydroxymethyltransferase), FAS (fatty acid synthase) a ODC (ornithine decarboxylase), které vedou k syntéze nukleotidů, aminokyselin mastných kyselin a polyaminů (www.myccancer.org). HIF-1 blokuje tyto anabolické dráhy více způsoby. Brání c-Myc v přepisu cílových genů, například v přepisu ODC a CAD (Corn, Ricci, and Scata 2005). Další cesty utlumují dýchací řetězec, snižují spotřebu kyslíku, ale i syntézu ATP v mitochondriích. HIF-1 aktivuje transkripci PDK1. K expresi tohoto genu přispívá pod vedením HIF-1 i c-Myc, ačkoliv za normoxie PDK1 není cílovým genem c-Myc (Jung-whan Kim et al. 2007). PDK1 fosforylací inhibuje pyruvát dehydrogenázu, která katalyzuje přeměnu pyruvátu na acetyl-koenzym A, a tím blokuje spojení glykolýzy s Krebsovým cyklem, který stimuluje komplex I a II dýchacího řetězce. HIF-1 a HIF-2 zároveň blokují i biogenezi mitochondrií. Syntézou Mxi1 a degradací c-Myc snižují transkripci PGC-1 β (proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 β), což vyústí ke snížení hmotnosti, mitochondriální DNA a spotřeby kyslíku (Huafeng Zhang et al. 2007). HIF-1 tento proces podporuje navozením mitofágie (Huafeng Zhang et al. 2008).

c-Myc pro buněčný růst zajišťuje i dostatečný translační aparát. Podporuje nasednutí RNA polymerázy I i III na DNA, a zvyšuje syntézu 45S pre-rRNA, 5S rRNA i tRNA, komponent potřebných pro genovou expresi (převzato z Oskarsson and Trumpp 2005). Navíc c-Myc přímo aktivuje transkripci tří podjednotek eIF4F (eIF4E, eIF4A, eIF4G), ty rozeznávají 5' koncovou čepičku, umožňují nasednutí ribosomů na mRNA a zahájení translace. Zatím co c-Myc obecně translaci podporuje, hypoxie ji v zájmu ušetření energie blokuje. Některé mechanismy, kterými hypoxie závisle i nezávisle na HIF snižuje celkovou úroveň translace, již byly zmíněny v souvislosti s proteinem mTOR. Hypoxie také snižuje přepis tRNA polymerázou III. c-Myc a Erk, proteiny, které podporují schopnost TFIII navést polymerázu III k cílovým genům, jsou hypoxií negativně regulovány. Naopak funkce proteinu RB (retinoblastoma protein), který blokuje připojení polymerázy III k TFIII je hypoxií posílena (Ernens et al. 2006). Kromě toho hypoxie snižuje acetylaci histonů H4. Protože c-Myc způsobuje acetylaci H4 (a tedy rozvolnění chromatinu), a protože hladina c-Myc v buňce je hypoxií snížena, nabízel se předpoklad, že hypoxie snižuje acetylaci H4 negativní regulací c-Myc. Ten byl potvrzen (Qin Li and Costa 2009).

Ve většině popsáných případů HIF bránil c-Myc v navození buněčné proliferace. HIF ale také potlačuje apoptózu způsobovanou c-Myc. Bylo navrženo více způsobů, kterými c-Myc může vést buňku k apoptóze, pravděpodobně závisí i na buněčném typu. Jisté je, že HIF přímou aktivací Mxi1 brání přepisu cílových genů c-Myc a předchází apoptóze (Corn, Ricci, and Scata 2005).

c-Myc přivádí k apoptóze i cardiomyocyty během ischemicko-reperfučního poškození. Po obnovení přísunu kyslíku do buněk se začíná zvyšovat množství c-Myc v buňce. c-Myc se váže do promotoru anti-apoptického NDRG2 a snižuje jeho expresi (Zhongchan Sun et al. 2011). Role HIF v této práci nebyla zkoumána, ale je pravděpodobné, že do regulace c-Myc zasahuje i v tomto případě.

5. ZÁVĚR

Kyslík, jako finální akceptor elektronů, je nutný pro správnou funkci dýchacího řetězce, tvorbu protonového gradientu, a tak i syntézu ATP během oxidativní fosforylace. Za hypoxie se buňka musí uchýlit k podstatně méně efektivnímu způsobu získávání ATP, ke glykolýze. Hlavním faktorem, který umožňuje buňce vyrovnat se s hypoxií je hypoxií indukovaný faktor HIF. HIF podporuje glykolýzu a zároveň omezuje energeticky náročné děje jako je syntéza proteinů a buněčná proliferace. Sám o sobě i ve spolupráci s p53 snižuje aktivitu mTOR, kinázy, která podporuje translaci. Umožňuje sice c-Myc zvyšovat kapacitu glykolýzy, ale už brání ve využití takto získané energie pro buněčný růst a dělení. c-Myc za normoxie vede k expresi tRNA, rRNA i iniciačních faktorů, což mu za hypoxie umožněno není. Hypoxie například snižuje aktivitu Erk, který potřebný pro přepis genů polymerázou III. HIF také znemožňuje c-Myc indukovat biogenezi mitochondrií a navíc indukuje mitofágii. Snížení množství mitochondrií má zřejmě omezit produkci ROS. HIF je zvýšenými ROS aktivován a ovlivňuje antioxidantní ochranu buňky stimulací exprese antioxidantů. V této činnosti je podpořen další rodinou transkripčních faktorů, AP-1.

HIF ale kromě ochrany buněk před hypoxií, zajišťuje také vyšší přísun kyslíku. Zvyšuje tvorbu červených krvinek a v postiženém místě rozvíjí cévní systém. Cílové geny HIF se přímo podílí na angiogenezi. Za hlavní angiogenní faktor je považován VEGF, který kromě HIF transaktivují i c-Myc a AP-1. V této situaci během angiogeneze je však proliferace buněk nutná. Stejně tak je diferenciace progenitorových buněk nezbytnou součástí erytropoézy. HIF má tak na různé buněčné typy naprosto protichůdný dopad. Je tedy pochopitelné, že se signální dráhy, s nimiž HIF souvisí, nechovají vždy stejně.

Erk a p38 fosforylují HIF-1 a podporují jeho vazbu s transkripčním koaktivátorem. p38 současně HIF-1 stabilizuje. Ovšem ne vždy jsou tyto MAP kinázy hypoxií aktivovány, aktivace může být naopak i potlačena. Stejně tak za hypoxie dochází k ovlivnění a v určitých případech i k potlačení PI3K-Akt-mTOR signální dráhy. Je důležité připomenout, že tato dráha podporuje také aktivitu HIF-1. Ovlivnění signálních drah se může lišit v závislosti na buněčném typu, experimentálních podmínkách nebo mohou být zdánlivé protiklady vysvětleny zpětnými vazbami či ještě neodhalenými vztahy v celém systému.

Další otázky, které se nabízí, se týkají přímo HIF proteinů. Do současnosti nebylo objasněno, proč odpověď na hypoxii není regulována pouze jednou izoformou HIF. Předpokládá se, že HIF-1 a HIF-2 mají podobnou funkci. Jsou vzájemně nezastupitelné a tkáňově specifické, ale odlišnosti mezi nimi byly zatím pozorovány poměrně minimální. HIF-1 podporuje glykolýzu, HIF-2 spíše vede k produkci antioxidantů, k proliferaci a brání diferenciaci. O funkci HIF-3 je toho dosud známo velice málo.

6. POUŽITÁ LITERATURA

- Akeno, Nagako, Maria F. Czyzyk-Krzeska, Ted S. Gross, and Thomas L. Clemens. 2001. Hypoxia Induces Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription in Human Osteoblast-Like Cells through the Hypoxia-Inducible Factor-2 $\{\alpha\}$. *Endocrinology* 142, no. 2 (February 1): 959-962. doi:10.1210/en.142.2.959.
- Alfranca, Arántzazu, M. Dolores Gutiérrez, Alicia Vara, Julián Aragonés, Felipe Vidal, and Manuel O. Landázuri. 2002. c-Jun and Hypoxia-Inducible Factor 1 Functionally Cooperate in Hypoxia-Induced Gene Transcription. *Molecular and Cellular Biology* 22, no. 1 (January): 12-22. doi:10.1128/MCB.22.1.12-22.2002.
- An, Won G., Meera Kanekal, M. Celeste Simon, Emin Maltepe, Mikhail V. Blagosklonny, and Leonard M. Neckers. 1998. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 $\{\alpha\}$. *Nature* 392, no. 6674 (March 26): 405-408. doi:10.1038/32925.
- Arany, Zoltán, L. Eric Huang, Richard Eckner, Shoumo Bhattacharya, Chian Jiang, Mark A. Goldberg, H. Franklin Bunn, and David M. Livingston. 1996. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, no. 23 (November 12): 12969 -12973.
- Arsham, Andrew M., David R. Plas, Craig B. Thompson, and M. Celeste Simon. 2002. Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Is Neither Required for Hypoxic Stabilization of HIF-1 α nor Sufficient for HIF-1-dependent Target Gene Transcription. *Journal of Biological Chemistry* 277, no. 17 (April 26): 15162 -15170. doi:10.1074/jbc.M111162200.
- Arune Hematulin. 2010. Insulin-like Growth Factor 1 Signalling and Its Role in Cell Survival and Radiation Sensitivity. http://www.sirirajmedj.com/content.php?content_id=2565.
- Bae, Seong-Hui, Joo-Won Jeong, Jeong Ae Park, Se-Hee Kim, Moon-Kyoung Bae, Soo-Joon Choi, and Kyu-Won Kim. 2004. Sumoylation increases HIF-1 $\{\alpha\}$ stability and its transcriptional activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324, no. 1 (November 5): 394-400. doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.068.
- BelAiba, Rachida S., Steve Bonello, Christian Zähringer, Stefanie Schmidt, John Hess, Thomas Kietzmann, and Agnes Górlach. 2007. Hypoxia Up-Regulates Hypoxia-Inducible Factor-1 $\{\alpha\}$ Transcription by Involving Phosphatidylinositol 3-Kinase and Nuclear Factor $\{\kappa\}$ B in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Mol. Biol. Cell* 18, no. 12 (Prosinec 1): 4691-4697. doi:10.1091/mbc.E07-04-0391.
- Berg, David T, Akanksha Gupta, Mark A Richardson, Lee A O'Brien, David Calnek, and Brian W Grinnell. 2007. Negative regulation of inducible nitric-oxide synthase expression mediated through transforming growth factor-beta-dependent modulation of transcription factor TCF11. *The Journal of Biological Chemistry* 282, no. 51 (December 21): 36837-36844. doi:10.1074/jbc.M706909200.
- Bernardi, Rosa, Ilhem Guernah, David Jin, Silvia Grisendi, Andrea Alimonti, Julie Teruya-Feldstein, Carlos Cordon-Cardo, M. Celeste Simon, Shahin Rafii, and Pier Paolo Pandolfi. 2006. PML inhibits HIF-1 $\{\alpha\}$ translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature* 442, no. 7104: 779-785. doi:10.1038/nature05029.
- Bertout, Jessica A., Amar J. Majmundar, John D. Gordan, Jennifer C. Lam, Dara Ditsworth, Brian Keith, Eric J. Brown, Katherine L. Nathanson, and M. Celeste Simon. 2009. HIF2 α inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, no. 34: 14391 -14396. doi:10.1073/pnas.0907357106.
- Boehme, Karen A, and Christine Blattner. 2009. Regulation of p53--insights into a complex process. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 44, no. 6 (December): 367-392. doi:10.3109/10409230903401507.
- Bollrath, Julia, and Florian R. Greten. 2009. IKK/NF- κ B and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO reports* 10, no. 12 (11): 1314-1319. doi:10.1038/embor.2009.243.
- Bonello, Steve, Christian Zähringer, Rachida S BelAiba, Taliya Djordjevic, John Hess, Carine Michiels, Thomas Kietzmann, and Agnes Górlach. 2007. Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NF κ B site. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27, no.

- 4 (April): 755-761. doi:10.1161/01.ATV.0000258979.92828.bc.
- Brand, Marjorie, Jeffrey A Ranish, Nicolas T Kummer, Joan Hamilton, Kazuhiko Igarashi, Claire Francastel, Tian H Chi, Gerald R Crabtree, Ruedi Aebersold, and Mark Groudine. 2004. Dynamic changes in transcription factor complexes during erythroid differentiation revealed by quantitative proteomics. *Nat Struct Mol Biol* 11, no. 1 (January): 73-80. doi:10.1038/nsmb713.
- Brunn, Gregory J., Christine C. Hudson, Aleksandar Sekulić, Josie M. Williams, Hajime Hosoi, Peter J. Houghton, John C. Lawrence, and Robert T. Abraham. 1997. Phosphorylation of the Translational Repressor PHAS-I by the Mammalian Target of Rapamycin. *Science* 277, no. 5322 (July 4): 99 -101. doi:10.1126/science.277.5322.99.
- Burnett, Patrick E., Roxanne K. Barrow, Noam A. Cohen, Solomon H. Snyder, and David M. Sabatini. 1998. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, no. 4 (February 17): 1432 -1437.
- Cai, Zheqing, and Gregg L. Semenza. 2005. PTEN Activity Is Modulated During Ischemia and Reperfusion: Involvement in the Induction and Decay of Preconditioning. *Circ Res* 97, no. 12 (December 9): 1351-1359. doi:10.1161/01.RES.0000195656.52760.30.
- Carracedo, Arkaitz, Li Ma, Julie Teruya-Feldstein, Federico Rojo, Leonardo Salmena, Andrea Alimonti, Ainara Egia, et al. 2008. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *The Journal of Clinical Investigation* 118, no. 9 (September 2): 3065-3074. doi:10.1172/JCI34739.
- Carroll, Veronica A., and Margaret Ashcroft. 2008. Regulation of Angiogenic Factors by HDM2 in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Research* 68, no. 2 (January 15): 545 -552. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4738.
- Ceradini, Daniel J, Anita R Kulkarni, Matthew J Callaghan, Oren M Tepper, Nicholas Bastidas, Mark E Kleinman, Jennifer M Capla, Robert D Galiano, Jamie P Levine, and Geoffrey C Gurtner. 2004. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature Medicine* 10, no. 8 (August): 858-864. doi:10.1038/nm1075.
- Cockman, Matthew E, David E Lancaster, Ineke P Stolze, Kirsty S Hewitson, Michael A McDonough, Mathew L Coleman, Charlotte H Coles, et al. 2006. Posttranslational hydroxylation of ankyrin repeats in IkappaB proteins by the hypoxia-inducible factor (HIF) asparaginyl hydroxylase, factor inhibiting HIF (FIH). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, no. 40 (October 3): 14767-14772. doi:10.1073/pnas.0606877103.
- Cohen, Michael V, and James M Downey. 2008. Adenosine: trigger and mediator of cardioprotection. *Basic Research in Cardiology* 103, no. 3 (May): 203-215. doi:10.1007/s00395-007-0687-7.
- Corn, Paul G., M. Stacey Ricci, and Kimberly A. Scata. 2005. Mxi1 is induced by hypoxia in a HIF-1-dependent manner and protects cells from c-Myc-induced apoptosis. *Cancer Biology & Therapy* 4, no. 11 (11): 1285-1294. doi:10.4161/cbt.4.11.2299.
- Covello, Kelly L., James Kehler, Hongwei Yu, John D. Gordan, Andrew M. Arsham, Cheng-Jun Hu, Patricia A. Labosky, M. Celeste Simon, and Brian Keith. 2006. HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes & Development* 20, no. 5 (March 1): 557-570. doi:10.1101/gad.1399906.
- Culver, Carolyn, Anders Sundqvist, Sharon Mudie, Andrew Melvin, Dimitris Xirodimas, and Sonia Rocha. 2010. Mechanism of hypoxia-induced NF-kappaB. *Molecular and Cellular Biology* 30, no. 20 (October): 4901-4921. doi:10.1128/MCB.00409-10.
- Cummins, Eoin P, Edurne Berra, Katrina M Comerford, Amandine Ginouves, Kathleen T Fitzgerald, Fergal Seeballuck, Catherine Godson, et al. 2006. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IkappaB kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NFkappaB activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, no. 48 (November 28): 18154-18159. doi:10.1073/pnas.0602235103.
- van Dam, H, D Wilhelm, I Herr, A Steffen, P Herrlich, and P Angel. 1995. ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *The EMBO Journal* 14, no. 8 (April 18): 1798-1811.
- Dang, Chi V. 1999. c-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism. *Molecular and Cellular Biology* 19, no. 1 (January): 1-11.
- Ebert, Benjamin L., John D. Firth, and Peter J. Ratcliffe. 1995. Hypoxia and Mitochondrial Inhibitors Regulate Expression of Glucose Transporter-1 via Distinct Cis-acting Sequences. *Journal of*

- Biological Chemistry* 270, no. 49 (December 8): 29083 -29089. doi:10.1074/jbc.270.49.29083.
- Eckle, Tobias, David Kohler, Rainer Lehmann, Karim C. El Kasmi, and Holger K. Eltzschig. 2008. Hypoxia-Inducible Factor-1 Is Central to Cardioprotection: A New Paradigm for Ischemic Preconditioning. *Circulation* 118, no. 2 (July 8): 166-175. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.758516.
- Elvert, Gerd, Andreas Kappel, Regina Heidenreich, Ursula Englmeier, Stephan Lanz, Till Acker, Manuel Rauter, et al. 2003. Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *The Journal of Biological Chemistry* 278, no. 9 (February 28): 7520-7530. doi:10.1074/jbc.M211298200.
- Epstein, Andrew C.R., Jonathan M. Gleadle, Luke A. McNeill, Kirsty S. Hewitson, John O'Rourke, David R. Mole, Mridul Mukherji, et al. 2001. C. elegans EGL-9 and Mammalian Homologs Define a Family of Dioxygenases that Regulate HIF by Prolyl Hydroxylation. *Cell* 107, no. 1 (October 5): 43-54. doi:10.1016/S0092-8674(01)00507-4.
- Ernens, Isabelle, Sarah J. Goodfellow, Fiona Innes, Niall S. Kenneth, Louise E. Derblay, Robert J. White, and Pamela H. Scott. 2006. Hypoxic stress suppresses RNA polymerase III recruitment and tRNA gene transcription in cardiomyocytes. *Nucleic Acids Research* 34, no. 1: 286-294. doi:10.1093/nar/gkj402.
- Feng, Z. 2005. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, no. 23 (6): 8204-8209. doi:10.1073/pnas.0502857102.
- Forsythe, JA, BH Jiang, NV Iyer, F Agani, SW Leung, RD Koos, and GL Semenza. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 16, no. 9 (September 1): 4604-4613.
- Fukuda, Ryo, Huafeng Zhang, Jung-whan Kim, Larissa Shimoda, Chi V. Dang, and Gregg L. Semenza. 2007. HIF-1 Regulates Cytochrome Oxidase Subunits to Optimize Efficiency of Respiration in Hypoxic Cells. *Cell* 129, no. 1 (April 6): 111-122. doi:10.1016/j.cell.2007.01.047.
- Gallant, Peter, and Dominik Steiger. 2009. Myc's secret life without Max. *Cell Cycle* 8, no. 23 (12): 3848-3853. doi:10.4161/cc.8.23.10088.
- Gerald, Damien, Edurne Berra, Yves M. Frapart, Denise A. Chan, Amato J. Giaccia, Daniel Mansuy, Jacques Pouyssegur, Moshe Yaniv, and Fatima Mechta-Grigoriou. 2004. JunD Reduces Tumor Angiogenesis by Protecting Cells from Oxidative Stress. *Cell* 118, no. 6 (September 17): 781-794. doi:10.1016/j.cell.2004.08.025.
- Gordan, John D., Jessica A. Bertout, Cheng-Jun Hu, J. Alan Diehl, and M. Celeste Simon. 2007. HIF-2[alpha] Promotes Hypoxic Cell Proliferation by Enhancing c-Myc Transcriptional Activity. *Cancer Cell* 11, no. 4 (April 10): 335-347. doi:10.1016/j.ccr.2007.02.006.
- Gordan, John D., Craig B. Thompson, and M. Celeste Simon. 2007. HIF and c-Myc: Sibling Rivals for Control of Cancer Cell Metabolism and Proliferation. *Cancer Cell* 12, no. 2 (August 14): 108-113. doi:10.1016/j.ccr.2007.07.006.
- Grossman, Steven R., Maria E. Deato, Chrystelle Brignone, Ho Man Chan, Andrew L. Kung, Hideaki Tagami, Yoshihiro Nakatani, and David M. Livingston. 2003. Polyubiquitination of p53 by a Ubiquitin Ligase Activity of p300. *Science* 300, no. 5617 (April 11): 342 -344. doi:10.1126/science.1080386.
- Gruber, Michaela, Cheng-Jun Hu, Randall S. Johnson, Eric J. Brown, Brian Keith, and M. Celeste Simon. 2007. Acute postnatal ablation of Hif-2 α results in anemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, no. 7 (February 13): 2301 -2306. doi:10.1073/pnas.0608382104.
- Halestrap, Andrew P., Samantha J. Clarke, and Igor Khaliulin. 2007. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta* 1767, no. 8 (August): 1007-1031. doi:10.1016/j.bbabi.2007.05.008.
- Hammond, Ester M., Nicholas C. Denko, Mary Jo Dorie, Robert T. Abraham, and Amato J. Giaccia. 2002. Hypoxia Links ATR and p53 through Replication Arrest. *Molecular and Cellular Biology* 22, no. 6 (March): 1834-1843. doi:10.1128/MCB.22.6.1834-1843.2002.
- Hayden, Matthew S., and Sankar Ghosh. 2008. Shared Principles in NF-[kappa]B Signaling. *Cell* 132, no. 3 (February 8): 344-362. doi:10.1016/j.cell.2008.01.020.
- Holmquist-Mengelbier, Linda, Erik Fredlund, Tobias Löfstedt, Rosa Noguera, Samuel Navarro, Helén Nilsson, Alexander Pietras, et al. 2006. Recruitment of HIF-1[alpha] and HIF-2[alpha] to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2[alpha] promotes an aggressive

- phenotype. *Cancer Cell* 10, no. 5 (November): 413-423. doi:10.1016/j.ccr.2006.08.026.
- Hu, Cheng-Jun, Aneesa Sataur, Liyi Wang, Hongqing Chen, and M. Celeste Simon. 2007. The N-Terminal Transactivation Domain Confers Target Gene Specificity of Hypoxia-inducible Factors HIF-1{alpha} and HIF-2{alpha}. *Mol. Biol. Cell* 18, no. 11 (November 1): 4528-4542. doi:10.1091/mbc.E06-05-0419.
- Hu, Cheng-Jun, Li-Yi Wang, Lewis A. Chodosh, Brian Keith, and M. Celeste Simon. 2003. Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1{alpha} (HIF-1{alpha}) and HIF-2{alpha} in Hypoxic Gene Regulation. *Mol. Cell. Biol.* 23, no. 24 (December 15): 9361-9374. doi:10.1128/MCB.23.24.9361-9374.2003.
- Huang, L. Eric, and H. Franklin Bunn. 2003. Hypoxia-inducible Factor and Its Biomedical Relevance. *Journal of Biological Chemistry* 278, no. 22 (May 30): 19575 -19578. doi:10.1074/jbc.R200030200.
- Hurtado, A. 1960. Some clinical aspects of life at high altitudes. *Annals of internal medicine* 53: 247-258.
- Hydbring, Per, Fuad Bahram, Yingtao Su, Susanna Tronnersjö, Kari Högstrand, Natalie von der Lehr, Hamid Reza Sharifi, et al. 2010. Phosphorylation by Cdk2 is required for Myc to repress Ras-induced senescence in cotransformation 107, no. 1 (January 5): 58-63. doi:10.1073/pnas.0900121106.
- Cheng, Jinke, Xunlei Kang, Sui Zhang, and Edward T H Yeh. 2007. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia. *Cell* 131, no. 3 (November 2): 584-595. doi:10.1016/j.cell.2007.08.045.
- Choy, Mun-Kit, Mehregan Movassagh, Martin R Bennett, and Roger S-Y Foo. 2010. PKB/Akt activation inhibits p53-mediated HIF1A degradation that is independent of MDM2. *Journal of Cellular Physiology* 222, no. 3 (March): 635-639. doi:10.1002/jcp.21980.
- Iliopoulos, O, A P Levy, C Jiang, W G Kaelin, and M A Goldberg. 1996. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, no. 20 (October 1): 10595-10599.
- Jeong, Joo-Won, Moon-Kyoung Bae, Mee-Young Ahn, Se-Hee Kim, Tae-Kwon Sohn, Myung-Ho Bae, Mi-Ae Yoo, Eun Joo Song, Kong-Joo Lee, and Kyu-Won Kim. 2002. Regulation and Destabilization of HIF-1[alpha] by ARD1-Mediated Acetylation. *Cell* 111, no. 5 (November 27): 709-720. doi:10.1016/S0092-8674(02)01085-1.
- Johnsen, O, P Murphy, H Prydz, and A B Kolsto. 1998. Interaction of the CNC-bZIP factor TCF11/LCR-F1/Nrf1 with MafG: binding-site selection and regulation of transcription. *Nucleic Acids Research* 26, no. 2 (January 15): 512-520.
- Jones, T R, and M D Cole. 1987. Rapid cytoplasmic turnover of c-myc mRNA: requirement of the 3' untranslated sequences. *Molecular and Cellular Biology* 7, no. 12 (December): 4513-4521.
- Juhaszova, Magdalena, Dmitry B. Zorov, Suhn-Hee Kim, Salvatore Pepe, Qin Fu, Kenneth W. Fishbein, Bruce D. Ziman, et al. 2004. Glycogen synthase kinase-3β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of Clinical Investigation* 113, no. 11 (June 1): 1535-1549. doi:10.1172/JCI200419906.
- Jung, YunJin, Jennifer S Isaacs, Sunmin Lee, Jane Trepel, Zheng-Gang Liu, and Len Neckers. 2003. Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-dependent nuclear factor kappa B activation. *Biochemical Journal* 370, no. Pt 3 (March 15): 1011-1017. doi:10.1042/BJ20021279.
- Karin, M, and E Shaulian. 2001. AP-1: linking hydrogen peroxide and oxidative stress to the control of cell proliferation and death. *IUBMB Life* 52, no. 1-2 (July): 17-24. doi:10.1080/15216540252774711.
- Ke, Qingdong, and Max Costa. 2006. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Molecular Pharmacology* 70, no. 5 (November): 1469-1480. doi:10.1124/mol.106.027029.
- Kelly, Brian D., Sean F. Hackett, Kiichi Hirota, Yuji Oshima, Zheqing Cai, Shannon Berg-Dixon, Ashley Rowan, Zhijiang Yan, Peter A. Campochiaro, and Gregg L. Semenza. 2003. Cell Type-Specific Regulation of Angiogenic Growth Factor Gene Expression and Induction of Angiogenesis in Nonischemic Tissue by a Constitutively Active Form of Hypoxia-Inducible Factor 1. *Circ Res* 93, no. 11 (November 28): 1074-1081. doi:10.1161/01.RES.0000102937.50486.1B.
- Khurana, Ashwani, Koh Nakayama, Scott Williams, Roger J. Davis, Tomas Mustelin, and Ze'ev Ronai. 2006. Regulation of the Ring Finger E3 Ligase Siah2 by p38 MAPK. *Journal of Biological Chemistry* 281, no. 46 (November 17): 35316 -35326. doi:10.1074/jbc.M606568200.
- Kim, Jung-whan, Ping Gao, Yen-Chun Liu, Gregg L. Semenza, and Chi V. Dang. 2007. Hypoxia-Inducible Factor 1 and Dysregulated c-Myc Cooperatively Induce Vascular Endothelial Growth Factor and

- Metabolic Switches Hexokinase 2 and Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1. *Molecular and Cellular Biology* 27, no. 21 (November): 7381-7393. doi:10.1128/MCB.00440-07.
- Kim, Yong Sook, Ji Su Kim, Jin Sook Kwon, Myung Ho Jeong, Jeong Gwan Cho, Jong Chun Park, Jung Chae Kang, and Youngkeun Ahn. 2010. BAY 11-7082, a nuclear factor- κ B inhibitor, reduces inflammation and apoptosis in a rat cardiac ischemia-reperfusion injury model. *International Heart Journal* 51, no. 5: 348-353.
- Koh, Mei Yee, Bryant G. Darnay, and Garth Powis. 2008. Hypoxia-Associated Factor, a Novel E3-Ubiquitin Ligase, Binds and Ubiquitinates Hypoxia-Inducible Factor 1 α , Leading to Its Oxygen-Independent Degradation. *Molecular and Cellular Biology* 28, no. 23 (December): 7081-7095. doi:10.1128/MCB.00773-08.
- Koivunen, Peppi, Päivi Tiainen, Jaana Hyvärinen, Kim E. Williams, Raija Sormunen, Stephen J. Klaus, Kari I. Kivirikko, and Johanna Myllyharju. 2007. An Endoplasmic Reticulum Transmembrane Prolyl 4-Hydroxylase Is Induced by Hypoxia and Acts on Hypoxia-inducible Factor α . *Journal of Biological Chemistry* 282, no. 42 (October 19): 30544 -30552. doi:10.1074/jbc.M704988200.
- Kong, Mei, Casey J. Fox, James Mu, Laura Solt, Anne Xu, Ryan M. Cinalli, Morris J. Birnbaum, Tullia Lindsten, and Craig B. Thompson. 2004. The PP2A-Associated Protein α 4 Is an Essential Inhibitor of Apoptosis. *Science* 306, no. 5696 (October 22): 695 -698. doi:10.1126/science.1100537.
- Koong, A C, E Y Chen, and A J Giaccia. 1994. Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Research* 54, no. 6 (March 15): 1425-1430.
- Koshiji, Minori, Yukio Kageyama, Erin A Pete, Izumi Horikawa, J Carl Barrett, and L Eric Huang. 2004. HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *The EMBO Journal* 23, no. 9 (May 5): 1949-1956. doi:10.1038/sj.emboj.7600196.
- Koshiji, Minori, Kenneth K.-W. To, Stefanie Hammer, Kensuke Kumamoto, Adrian L. Harris, Paul Modrich, and L. Eric Huang. 2005. HIF-1[α] Induces Genetic Instability by Transcriptionally Downregulating MutS[α] Expression. *Molecular Cell* 17, no. 6 (March 18): 793-803. doi:10.1016/j.molcel.2005.02.015.
- Koumenis, Constantinos, Rodolfo Alarcon, Ester Hammond, Patrick Sutphin, William Hoffman, Maureen Murphy, Jennifer Derr, et al. 2001. Regulation of p53 by Hypoxia: Dissociation of Transcriptional Repression and Apoptosis from p53-Dependent Transactivation. *Molecular and Cellular Biology* 21, no. 4 (February): 1297-1310. doi:10.1128/MCB.21.4.1297-1310.2001.
- Krieg, Adam J., Ester M. Hammond, and Amato J. Giaccia. 2006. Functional Analysis of p53 Binding under Differential Stresses. *Molecular and Cellular Biology* 26, no. 19 (October): 7030-7045. doi:10.1128/MCB.00322-06.
- Laderoute, Keith R. 2005. The interaction between HIF-1 and AP-1 transcription factors in response to low oxygen. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16, no. 4-5 (August): 502-513. doi:10.1016/j.semcdb.2005.03.005.
- Laderoute, Keith R., Joy M. Calaoagan, Cindy Gustafson-Brown, A. Merrill Knapp, Guo-Chun Li, Holly L. Mendonca, Heather E. Ryan, Zhaohui Wang, and Randall S. Johnson. 2002. The Response of c-Jun/AP-1 to Chronic Hypoxia Is Hypoxia-Inducible Factor 1 α Dependent. *Molecular and Cellular Biology* 22, no. 8 (April): 2515-2523. doi:10.1128/MCB.22.8.2515-2523.2002.
- Lando, David, Daniel J. Peet, Jeffrey J. Gorman, Dean A. Whelan, Murray L. Whitelaw, and Richard K. Bruick. 2002. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor — Genes & Development. <http://genesdev.cshlp.org/content/16/12/1466.long>.
- Lando, David, Daniel J. Peet, Dean A. Whelan, Jeffrey J. Gorman, and Murray L. Whitelaw. 2002. Asparagine Hydroxylation of the HIF Transactivation Domain: A Hypoxic Switch | Science/AAAS. <http://www.sciencemag.org.ezproxy.is.cuni.cz/content/295/5556/858.long>.
- Lee, Patty J., Bing-Hua Jiang, Beek Yoke Chin, Narayan V. Iyer, Jawed Alam, Gregg L. Semenza, and Augustine M. K. Choi. 1997. Hypoxia-inducible Factor-1 Mediates Transcriptional Activation of the Heme Oxygenase-1 Gene in Response to Hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* 272, no. 9 (February 28): 5375 -5381. doi:10.1074/jbc.272.9.5375.
- Levine, A J, W Hu, and Z Feng. 2006. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* 13, no. 6 (March 24): 1027-1036.
- Levine, Arnold J, Zhaohui Feng, Tak W Mak, Han You, and Shengkan Jin. 2006. Coordination and

- communication between the p53 and IGF-1-AKT-TOR signal transduction pathways. *Genes & Development* 20, no. 3 (February 1): 267-275. doi:10.1101/gad.1363206.
- Li, Muyang, Christopher L. Brooks, Foon Wu-Baer, Delin Chen, Richard Baer, and Wei Gu. 2003. Mono-Versus Polyubiquitination: Differential Control of p53 Fate by Mdm2. *Science* 302, no. 5652 (December 12): 1972-1975. doi:10.1126/science.1091362.
- Li, Qin, and Max Costa. 2009. c-Myc mediates a hypoxia-induced decrease in acetylated histone H4. *Biochimie* 91, no. 10 (October): 1307-1310. doi:10.1016/j.biochi.2009.07.001.
- Li, Qin, Thomas Kluz, Hong Sun, and Max Costa. 2009. Mechanisms of c-Myc Degradation by Nickel Compounds and Hypoxia 4, no. 12. doi:10.1371/journal.pone.0008531.
- Li, Zirong, Sara Van Calcar, Chunxu Qu, Webster K. Cavenee, Michael Q. Zhang, and Bing Ren. 2003. A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, no. 14 (July 8): 8164-8169. doi:10.1073/pnas.1332764100.
- Liang, Guosheng, Curt D. Wolfgang, Benjamin P. C. Chen, Tsu-Hua Chen, and Tsonwin Hai. 1996. ATF3 Gene. *Journal of Biological Chemistry* 271, no. 3 (January 19): 1695-1701. doi:10.1074/jbc.271.3.1695.
- Liu, Liping, Timothy P. Cash, Russell G. Jones, Brian Keith, Craig B. Thompson, and M. Celeste Simon. 2006. Hypoxia-Induced Energy Stress Regulates mRNA Translation and Cell Growth. *Molecular Cell* 21, no. 4 (February 17): 521-531. doi:10.1016/j.molcel.2006.01.010.
- Liu, Ye V., Jin H. Baek, Huafeng Zhang, Roberto Diez, Robert N. Cole, and Gregg L. Semenza. 2007. RACK1 Competes with HSP90 for Binding to HIF-1 α and is Required for O₂-independent and HSP90 Inhibitor-induced Degradation of HIF-1 α . *Molecular cell* 25, no. 2 (January 26): 207-217. doi:10.1016/j.molcel.2007.01.001.
- Luqman, Suaib, and John M. Pezzuto. 2010. NF κ B: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. *Phytotherapy Research: n/a-n/a*. doi:10.1002/ptr.3171.
- Mack, Fiona A., Jagruti H. Patel, Mangatt P. Biju, Volker H. Haase, and M. Celeste Simon. 2005. Decreased Growth of Vhl-/- Fibrosarcomas Is Associated with Elevated Levels of Cyclin Kinase Inhibitors p21 and p27. *Mol. Cell. Biol.* 25, no. 11 (June 1): 4565-4578. doi:10.1128/MCB.25.11.4565-4578.2005.
- Mahon, Patrick C., Kiichi Hirota, and Gregg L. Semenza. 2001. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes & Development* 15, no. 20 (October 15): 2675-2686. doi:10.1101/gad.924501.
- Makino, Yuichi, Renhai Cao, Kristian Svensson, Göran Bertilsson, Mikael Åsman, Hiroto Tanaka, Yihai Cao, Anders Berkenstam, and Lorenz Poellinger. 2001. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. <http://proquest.umi.com.ezproxy.is.cuni.cz/pqdlink?Ver=1&Exp=12-09-2015&FMT=7&DID=94224175&RQT=309>.
- Mastrogiannaki, Maria, Pavle Matak, Brian Keith, M. Celeste Simon, Sophie Vaultont, and Carole Peyssonnaud. 2009. HIF-2 α , but not HIF-1 α , promotes iron absorption in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 119, no. 5 (May 1): 1159-1166. doi:10.1172/JCI38499.
- Maynard, Mindy A., Andrew J. Evans, Wei Shi, William Y. Kim, Fei-Fei Liu, and Michael Ohh. 2007. Landes Bioscience Journals: Cell Cycle. <http://www.landesbioscience.com/journals/cc/article/4947/>.
- Miyamoto, S, A N Murphy, and J H Brown. 2007. Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ* 15, no. 3 (December 7): 521-529.
- Mole, David R., Christine Blancher, Richard R. Copley, Patrick J. Pollard, Jonathan M. Gleadle, Jiannis Ragoussis, and Peter J. Ratcliffe. 2009. Genome-wide Association of Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 α and HIF-2 α DNA Binding with Expression Profiling of Hypoxia-inducible Transcripts 284, no. 25 (June 19): 16767-16775. doi:10.1074/jbc.M901790200.
- Mukhopadhyay, Chinmay K., Barsanjit Mazumder, and Paul L. Fox. 2000. Role of Hypoxia-inducible Factor-1 in Transcriptional Activation of Ceruloplasmin by Iron Deficiency. *Journal of Biological Chemistry* 275, no. 28 (July 14): 21048-21054. doi:10.1074/jbc.M000636200.
- Murata, Mitsushige, Masaharu Akao, Brian O'Rourke, and Eduardo Marban. 2001. Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channels Attenuate Matrix Ca²⁺ Overload During Simulated Ischemia and Reperfusion: Possible Mechanism of Cardioprotection. *Circ Res* 89, no. 10 (November 9): 891-898. doi:10.1161/hh2201.100205.

- Murry, C E, R B Jennings, and K A Reimer. 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, no. 5 (November): 1124-1136.
- Myc Cancer Gene, <http://www.mycancergene.org/>, (4. 4. 2011)
- Nakayama, Koh, Ian J Frew, Mette Hagensen, Marianne Skals, Hasem Habelhah, Anindita Bhoumik, Takayuki Kadoya, et al. 2004. Siah2 Regulates Stability of Prolyl-Hydroxylases, Controls HIF1[alpha] Abundance, and Modulates Physiological Responses to Hypoxia. *Cell* 117, no. 7 (June 25): 941-952. doi:10.1016/j.cell.2004.06.001.
- Nakayama, Koh, Jianfei Qi, and Ze'ev Ronai. 2009. The Ubiquitin Ligase Siah2 and the Hypoxia Response. *Molecular cancer research : MCR* 7, no. 4 (April): 443-451. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0458.
- Nijboer, Cora H, Cobi J Heijnen, Floris Groenendaal, Michael J May, Frank van Bel, and Annemieke Kavelaars. 2008. A dual role of the NF-kappaB pathway in neonatal hypoxic-ischemic brain damage. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 39, no. 9 (September): 2578-2586. doi:10.1161/STROKEAHA.108.516401.
- Oktay, Yavuz, Elhadji Dioum, Satoshi Matsuzaki, Kan Ding, Liang-Jun Yan, Ronald G. Haller, Luke I. Szweda, and Joseph A. Garcia. 2007. Hypoxia-inducible Factor 2 α Regulates Expression of the Mitochondrial Aconitase Chaperone Protein Frataxin. *Journal of Biological Chemistry* 282, no. 16 (April 20): 11750 -11756. doi:10.1074/jbc.M611133200.
- Ortiz-Barahona, Amaya, Diego Villar, Nuria Pescador, Jorge Amigo, and Luis del Peso. 2010. Genome-wide identification of hypoxia-inducible factor binding sites and target genes by a probabilistic model integrating transcription-profiling data and in silico binding site prediction. *Nucleic Acids Research* 38, no. 7 (April 1): 2332 -2345. doi:10.1093/nar/gkp1205.
- Oskarsson, Thordur, and Andreas Trumpp. 2005. The Myc trilogy: lord of RNA polymerases. *Nature Cell Biology* 7, no. 3 (March): 215-217. doi:10.1038/ncb0305-215.
- Peyssonnaud, Carole, Annelies S. Zinkernagel, Reto A. Schuepbach, Erinn Rankin, Sophie Vaulont, Volker H. Haase, Victor Nizet, and Randall S. Johnson. 2007. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *Journal of Clinical Investigation* 117, no. 7 (July 2): 1926-1932. doi:10.1172/JCI31370.
- Premkumar, D R, G Adhikary, J L Overholt, M S Simonson, N S Cherniack, and N R Prabhakar. 2000. Intracellular pathways linking hypoxia to activation of c-fos and AP-1. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 475: 101-109. doi:10.1007/0-306-46825-5_10.
- Raval, RR, KW Lau, MGB Tran, HM Sowter, SJ Mandriota, JL Li, CW Pugh, PH Maxwell, AL Harris, and PJ Ratcliffe. 2005. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 25, no. 13 (July): 5675-5686. doi:10.1128/MCB.13.5675-5686.2005.
- Ravi, R, B Mookerjee, Z M Bhujwalla, C H Sutter, D Artemov, Q Zeng, L E Dillehay, A Madan, G L Semenza, and A Bedi. 2000. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes & Development* 14, no. 1 (January 1): 34-44.
- Rebecca J. Appelhoff, and Ya-Min Tian. 2004. Differential Function of the Prolyl Hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the Regulation of Hypoxia-inducible Factor — JBC. <http://www.jbc.org/content/279/37/38458.full>.
- Ren, Hongxia, Domenico Accili, and Cunming Duan. 2010. Hypoxia converts the myogenic action of insulin-like growth factors into mitogenic action by differentially regulating multiple signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, no. 13 (March 30): 5857-5862. doi:10.1073/pnas.0909570107.
- Riddle, S R, A Ahmad, S Ahmad, S S Deeb, M Malkki, B K Schneider, C B Allen, and C W White. 2000. Hypoxia induces hexokinase II gene expression in human lung cell line A549. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 278, no. 2 (February): L407-416.
- Richard, Darren E., Eburne Berra, Emmanuel Gothié, Danièle Roux, and Jacques Pouyssegur. 1999. p42/p44 Mitogen-activated Protein Kinases Phosphorylate Hypoxia-inducible Factor 1 α (HIF-1 α) and Enhance the Transcriptional Activity of HIF-1. *Journal of Biological Chemistry* 274, no. 46 (November 12): 32631 -32637. doi:10.1074/jbc.274.46.32631.
- Rodriguez-Viciana, Pablo, Patricia H. Warne, Ritu Dhand, Bart Vanhaesebroeck, Ivan Gout, Michael J. Fry, Michael D. Waterfield, and Julian Downward. 1994. Phosphatidylinositol-3-OH kinase direct target of Ras. *Nature* 370, no. 6490: 527-532. doi:10.1038/370527a0.
- Rohwer, Nadine, Christof Dame, Anja Haugstetter, Bertram Wiedenmann, Katharina Detjen, Clemens A.

- Schmitt, and Thorsten Cramer. 2010. Hypoxia-Inducible Factor 1 α Determines Gastric Cancer Chemosensitivity via Modulation of p53 and NF- κ B. *PLoS ONE* 5, no. 8: e12038. doi:10.1371/journal.pone.0012038.
- Rolfs, Andreas, Ivica Kvietikova, Max Gassmann, and Roland H. Wenger. 1997. Oxygen-regulated Transferrin Expression Is Mediated by Hypoxia-inducible Factor-1. *Journal of Biological Chemistry* 272, no. 32: 20055 -20062. doi:10.1074/jbc.272.32.20055.
- Sangeetha, M, Malini S Pillai, Linda Philip, Edward G Lakatta, and K Shivakumar. 2011. NF- κ B inhibition compromises cardiac fibroblast viability under hypoxia. *Experimental Cell Research* (January 4). doi:10.1016/j.yexcr.2010.12.024. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.is.cuni.cz/pubmed/21211536>.
- Scortegagna, Marzia, Kan Ding, Yavuz Oktay, Arti Gaur, Frederick Thurmond, Liang-Jun Yan, Brett T Marck, et al. 2003. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in Epas1^{-/-} mice. *Nature Genetics* 35, no. 4 (December): 331-340. doi:10.1038/ng1266.
- Sears, Rosalie, Faison Nuckolls, Eric Haura, Yoichi Taya, Katsuyuki Tamai, and Joseph R. Nevins. 2000. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes & Development* 14, no. 19 (October 1): 2501 -2514. doi:10.1101/gad.836800.
- Sears, Rosalie C. 2004. The life cycle of C-myc: from synthesis to degradation. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 3, no. 9 (September): 1133-1137.
- Semenza, G L, and G L Wang. 1992. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 12, no. 12 (December 1): 5447-5454.
- Shaulian, E., M. Schreiber, F. Piu, M. Beeche, E.F. Wagner, and M. Karin. 2000. The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell* 103, no. 6: 897-907.
- Shaulian, Eitan. 2010. AP-1 -- The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cellular Signalling* 22, no. 6 (June): 894-899. doi:10.1016/j.cellsig.2009.12.008.
- Schioppa, Tiziana, Badarch Uranchimeg, Alessandra Saccani, Subhra K. Biswas, Andrea Doni, Annamaria Rapisarda, Sergio Bernasconi, et al. 2003. Regulation of the Chemokine Receptor CXCR4 by Hypoxia. *The Journal of Experimental Medicine* 198, no. 9 (November 3): 1391 -1402. doi:10.1084/jem.20030267.
- Sodhi, Akrit, Silvia Montaner, Vyomesh Patel, Muriel Zohar, Carlos Bais, Enrique A. Mesri, and J. Silvio Gutkind. 2000. The Kaposi's Sarcoma-associated Herpes Virus G Protein-coupled Receptor Up-Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Secretion through Mitogen-activated Protein Kinase and p38 Pathways Acting on Hypoxia-inducible Factor 1 α . *Cancer Research* 60, no. 17: 4873 -4880.
- Staib, Frank, Ana I. Robles, Lyuba Varticovski, Xin W. Wang, Barry R. Zeeberg, Michail Sirotnin, Victor B. Zhurkin, et al. 2005. The p53 Tumor Suppressor Network Is a Key Responder to Microenvironmental Components of Chronic Inflammatory Stress. *Cancer Research* 65, no. 22 (November 15): 10255 - 10264. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1714.
- Sun, Zhongchan, Lan Shen, Xiang Sun, Guang Tong, Dongdong Sun, Tenglong Han, Guodong Yang, et al. 2011. Variation of NDRG2 and c-Myc expression in rat heart during the acute stage of ischemia/reperfusion injury. *Histochemistry and Cell Biology* 135, no. 1 (January): 27-35. doi:10.1007/s00418-010-0776-9.
- Tacchini, Lorenza, Laura Bianchi, Aldo Bernelli-Zazzera, and Gaetano Cairo. 1999. Transferrin Receptor Induction by Hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* 274, no. 34: 24142 -24146. doi:10.1074/jbc.274.34.24142.
- Takagi, Masatoshi, Michael J. Absalon, Kevin G. McLure, and Michael B. Kastan. 2005. Regulation of p53 Translation and Induction after DNA Damage by Ribosomal Protein L26 and Nucleolin. *Cell* 123, no. 1 (October 7): 49-63. doi:10.1016/j.cell.2005.07.034.
- To, Kenneth K -W, Olga A Sedelnikova, Melissa Samons, William M Bonner, and L Eric Huang. 2006. The phosphorylation status of PAS-B distinguishes HIF-1 α from HIF-2 α in NBS1 repression. *The EMBO Journal* 25, no. 20 (October 18): 4784-4794. doi:10.1038/sj.emboj.7601369.
- Tsang, Andrew, Derek J. Hausenloy, Mihaela M. Mocanu, and Derek M. Yellon. 2004. Postconditioning: A Form of "Modified Reperfusion" Protects the Myocardium by Activating the Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway. *Circ Res* 95, no. 3 (August 6): 230-232.

doi:10.1161/01.RES.0000138303.76488.fe.

- van Uden, Patrick, Niall S. Kenneth, Ryan Webster, H. Arno Müller, Sharon Mudie, and Sonia Rocha. 2011. Evolutionary Conserved Regulation of HIF-1 β by NF- κ B. *7*, no. 1 (January). doi:10.1371/journal.pgen.1001285.
- Venugopal, R., and A.K. Jaiswal. 1998. Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* 17, no. 24: 3145-3156.
- Vlahopoulos, Spiros A., Stella Logotheti, Dimitris Mikas, Athina Giarika, Vassilis Gorgoulis, and Vassilis Zoumpourlis. 2008. The role of ATF-2 in oncogenesis. *BioEssays* 30, no. 4 (4): 314-327. doi:10.1002/bies.20734.
- Wang, Feng, Ruixue Zhang, Xiaomeng Wu, and Oliver Hankinson. 2010. Roles of Coactivators in Hypoxic Induction of the Erythropoietin Gene. *5*, no. 4. doi:10.1371/journal.pone.0010002.
- Wang, G L, B H Jiang, E A Rue, and G L Semenza. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, no. 12 (June 6): 5510-5514.
- Wang, Guang L., and Gregg L. Semenza. 1995. Purification and Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1. *Journal of Biological Chemistry* 270, no. 3 (January 20): 1230 -1237. doi:10.1074/jbc.270.3.1230.
- Wiesener, Michael S, Jan Steffen Jürgensen, Christian Rosenberger, Charlotte K Scholze, Jan H Hörstrup, Christina Warnecke, Stefano Mandriota, et al. 2003. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17, no. 2 (February): 271-273. doi:10.1096/fj.02-0445fje.
- Wolff, Nicholas C, Silvia Vega-Rubin-de-Celis, Xian-Jin Xie, Diego H Castrillon, Wareef Kabbani, and James Brugarolas. 2011. Cell-Type-Dependent Regulation of mTORC1 by REDD1 and the Tumor Suppressors TSC1/TSC2 and LKB1 in Response to Hypoxia. *Molecular and Cellular Biology* 31, no. 9 (May): 1870-1884. doi:10.1128/MCB.01393-10.
- Wu, Gen Sheng. 2004. The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy* 3, no. 2 (February): 156-161.
- Yasinska, Inna M, and Vadim V Sumbayev. 2003. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1[α] protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Letters* 549, no. 1-3 (August 14): 105-109. doi:10.1016/S0014-5793(03)00807-X.
- Yet, S F, R Tian, M D Layne, Z Y Wang, K Maemura, M Solovyeva, B Ith, et al. 2001. Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circulation Research* 89, no. 2 (July 20): 168-173.
- Yuan, Zhongmin, Shoufang Gong, Jingyan Luo, Zhihao Zheng, Bin Song, Shanshan Ma, Jiaoli Guo, et al. 2009. Opposing Roles for ATF2 and c-Fos in c-Jun-Mediated Neuronal Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 29, no. 9 (May): 2431-2442. doi:10.1128/MCB.01344-08.
- Zampetaki, A, S A Mitsialis, J Pfeilschifter, and Stella Kourembanas. 2004. Hypoxia induces macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) gene expression in murine macrophages via NF- κ B: the prominent role of p42/ p44 and PI3 kinase pathways. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, no. 10 (July): 1090-1092. doi:10.1096/fj.03-0991fje.
- Zeller, Karen I., XiaoDong Zhao, Charlie W. H. Lee, Kuo Ping Chiu, Fei Yao, Jason T. Yustein, Hong Sain Ooi, et al. 2006. Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, no. 47 (November 21): 17834 -17839. doi:10.1073/pnas.0604129103.
- Zhang, Huafeng, Marta Bosch-Marce, Larissa A Shimoda, Yee Sun Tan, Jin Hyen Baek, Jacob B Wesley, Frank J Gonzalez, and Gregg L Semenza. 2008. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry* 283, no. 16 (April 18): 10892-10903. doi:10.1074/jbc.M800102200.
- Zhang, Huafeng, Ping Gao, Ryo Fukuda, Ganesh Kumar, Balaji Krishnamachary, Karen I. Zeller, Chi V. Dang, and Gregg L. Semenza. 2007. HIF-1 Inhibits Mitochondrial Biogenesis and Cellular Respiration in VHL-Deficient Renal Cell Carcinoma by Repression of C-MYC Activity. *Cancer Cell* 11, no. 5 (May 8): 407-420. doi:10.1016/j.ccr.2007.04.001.