

Jak komórki adaptują się do zmienionej dostępności tlenu – rola czynnika indukowanego hipoksją HIF-1

How do cells adapt to oxygen availability – the role of hypoxia-inducible factor HIF-1

Grażyna Sygitowicz, Dariusz Sitkiewicz

Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Dzięki pracom tegorocznych laureatów Nagrody Nobla poznaliśmy mechanizmy regulacji fundamentalnych procesów fizjologicznych i patofizjologicznych poprzez tlen. Zmienna dostępność tlenu wymaga od komórek uruchomienia szeregu procesów adaptacyjnych. Kluczową reakcją na obniżony poziom tlenu jest zahamowanie procesu degradacji podjednostki α czynnika indukowanego hipoksją (HIF-1). W tych warunkach dochodzi do powstania aktywnego czynnika transkrypcyjnego – dimeru HIF-1 α/β , który aktywuje ekspresję wielu genów. HIF-1 jest następnie gromadzony w jądrze komórkowym i wiązany z DNA genów regulowanych hipoksją. Produkty tych genów są zaangażowane nie tylko w tworzenie nowych naczyń krwionośnych (VEGF), proces erytropoezy (EPO), lecz także w przemianę metabolizmu energetycznego w mitochondriach z oksydacyjnej fosforylacji na glikolizę tlenową (LDH, kinaza fosfoglicerolu, aldolaza oraz GLUT1).

Abstract

Thanks to the works of this year's Nobel Laureates, we know much more about how different oxygen levels regulate fundamental physiological and pathophysiological processes. Variable oxygen availability requires the activation of multiple adaptation processes from cells. Inhibition of the degradation of α subunit of the hypoxia-inducible factor (HIF-1) is a key reaction of cells to hypoxic conditions. These conditions lead to generation of the active transcription factor – dimer HIF-1 α/β , which activates the expression of plenty of genes. HIF-1 is then accumulated in the nucleus and binded to DNA in hypoxia-regulated genes. The products of these genes are involved in generation of new blood vessels (VEGF), erythropoiesis process (EPO) and in energy metabolism in mitochondria from oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis (LDH, phosphoglycerol kinase, aldolase and GLUT1).

Keywords: HIF-1, hypoxia, oxygen homeostasis, metabolic adaptation

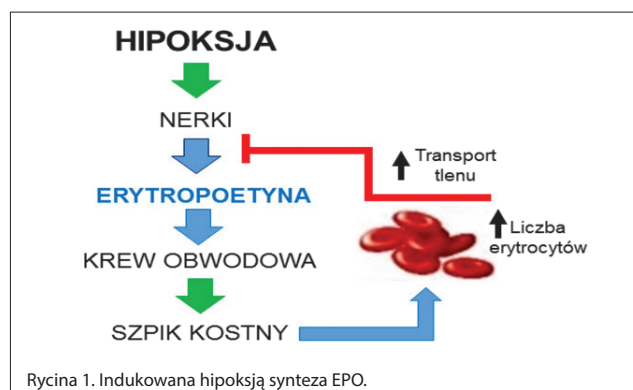
Słowa kluczowe: HIF-1, hipoksja, homeostaza tlenowa, adaptacja metaboliczna

Wprowadzenie

Wszystkie komórki organizmów eukariotycznych wymagają obecności tlenu do przemian substratów energetycznych (glukoza, wolne kwasy tłuszczowe) w użyteczną energię w postaci adenylozotrójfosforanu (ATP). Ten enzymatyczny proces zachodzi w mitochondriach obecnych w praktycznie każdej komórce zwierzęcej. Fundamentalne znaczenie tlenu dla życia było rozumiane już od zarania dziejów. Podczas ewolucji zostały wykształcone mechanizmy zapewniające dostarczanie wystarczającej ilości tlenu do tkanek i komórek. Kluczową, fizjologiczną odpowiedzią na hipoksję (zmniejszony poziom tlenu) jest wzrost syntezy hormonu erytropoetyny (EPO), który prowadzi do zwiększonej erytropoezy, a w konsekwencji zwiększonej ilości dostarczanego do komórek tlenu (ryc. 1).

Zwiększony transport tlenu do komórek hamuje ekspresję genu *EPO* w komórkach śródmiąższowych kory nerek. Mimo znajomości

powyższego szlaku otwartym pozostawało pytanie: *jaki jest mechanizm adaptacji komórek do zmian w dostępności tlenu?* Dopiero odkrycia tegorocznych laureatów Nagrody Nobla z fizjologii lub medycyny Willama G. Kaelina Jr, Sir Petera J. Ratcliffe'a i Gregga



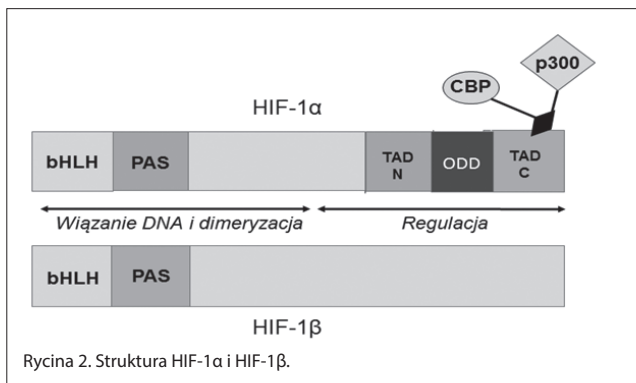
Rycina 1. Indukowana hipoksją synteza EPO.

L. Semenzi zidentyfikowały molekularne mechanizmy regulujące ekspresję genów, w tym genu erytropoetyny w zależności od poziomu tlenu. Semenzi i wsp. [1] wykazali obecność swobodnego segmentu DNA zlokalizowanego zaraz za genem *EPO*, którego ekspresja zachodzi w sposób zależny od dostępności tlenu. Zidentyfikował on również produkt tego genu, któremu nadał nazwę czynnik indukowany hipoksją-1 (HIF-1; ang. *hypoxia-inducible factor*). Ratcliffe [2] badał także zależną od tlenu regulację genu *EPO*. Obie grupy badawcze wykazały, że mechanizmy wrażliwości na dostępność tlenu są identyczne we wszystkich tkankach i komórkach, nie tylko w nerkach, gdzie zachodzi synteza erytropoetyny.

Struktura HIF-1

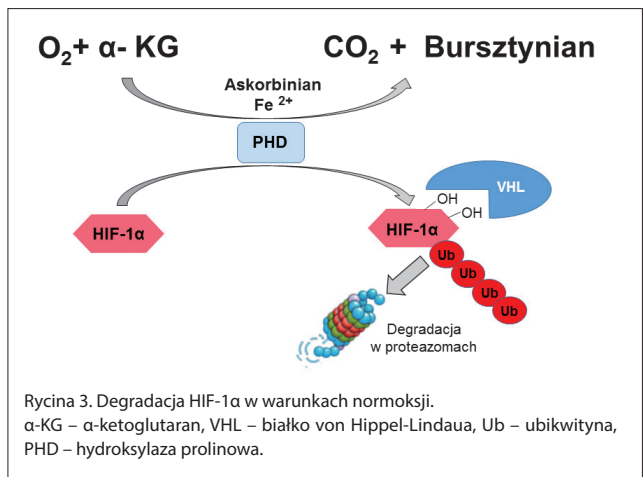
HIF-1 jest heterodimerskim czynnikiem transkrypcyjnym zawierającym podjednostkę β o masie cząsteczkowej 91 – 94 kDa i podjednostkę α o masie cząsteczkowej 120 kDa. Obydwie podjednostki zawierają podstawowy motyw: spirala-pętla-spirala (bHLH; ang. *basic helix-loop-helix*), który współdziałając z domeną PAS (ang. *PER-ARNT-SIM*), odpowiada za dimeryzację podjednostek i wiązanie z DNA (ryc. 2) [3].

Podjednostka α zawiera także domeny regulacyjne: ODD (ang. *oxygen dependent degradation domain*), odpowiadającą za zależną od tlenu degradację HIF-1 oraz dwie domeny transaktywacyjne TAD-N i TAD-C (ang. *transactivation domain*), które regulują aktywność genów docelowych dla HIF-1. Białka CBP i p300 związane z C-końcową domeną TAD pełnią rolę koaktywatorów transkrypcji HIF-1, będąc niezbędnym elementem warunkującym ekspresję HIF-1α (ryc. 2). Blokada interakcji TAD-C-HIF-1α przez hydroksylację proliny hamuje ekspresję genu *HIF-1*. Ostatnio wykazano, że HIF-1β jest identyczny z wcześniej wykrytym białkiem ARNT (ang. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) [4].



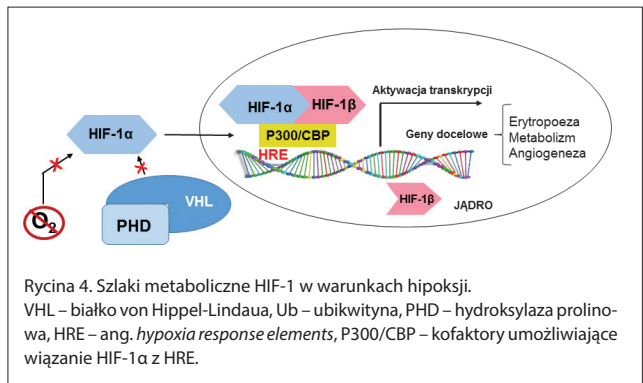
Metabolizm HIF-1

Obie podjednostki ulegają konstytutywnej ekspresji, jednak ich okres półtrwania w warunkach normoksji jest różny. Poziom HIF-1β w tych warunkach jest stały, podczas gdy poziom HIF-1α szybko spada. Jego okres półtrwania wynosi mniej niż 5 minut [5]. Regulacja aktywności HIF-1α odbywa się na poziomie potranslacyjnym i jest związana z zależną od ubikwityny degradacją w proteasomach (ryc. 3). Proces ten jest zależny od tlenu i przebiega w trzech etapach. Pierwszym etapem jest katalizowana przez hydroksylazę prolinową (PHD) – hydroksylacja reszt proliny (Pro 402 i Pro 564) w cząsteczce HIF-1α. Do pełnej



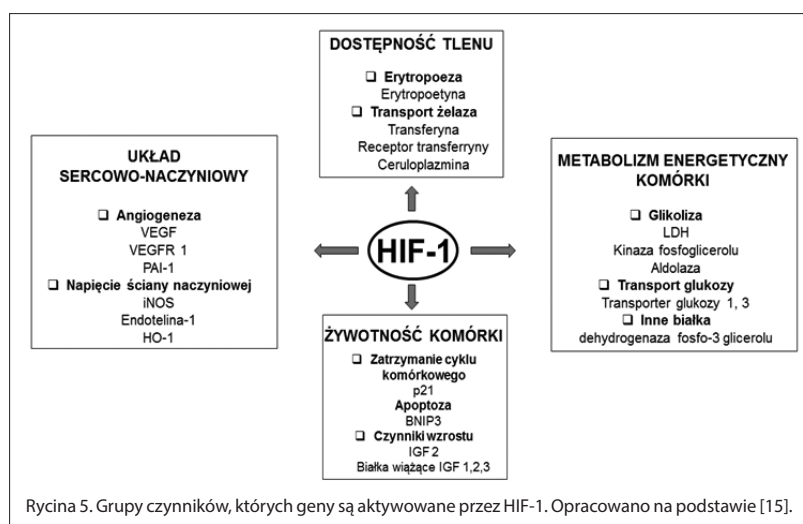
aktywności enzymatycznej hydroksylaza PHD wymaga obecności tlenu i α-ketoglutaranu, które są substratami reakcji, a także kofaktorów: jonów żelaza (Fe²⁺) i askorbinianu [6 – 8]. Z drugiej strony aktywność enzymatyczna PHD może być hamowana przez tlenek azotu (NO) czy niektóre intermediały cyklu kwasów trikarboksylowych (TCA), takich jak: bursztynian czy fumaran oraz reaktywne formy tlenu [9]. Drugi etap to proces ubikwitynacji, który jest zależny od wykrytego przez Kaelina białka VHL (białko von Hippel-Lindau) [9 – 10]. Białko VHL jest składnikiem kompleksu znakującego HIF-1 ubikwityną. Trzecim etapem jest degradacja HIF-1α w proteasomach [11 – 13].

W warunkach zmniejszonej dostępności tlenu (hipoksja) następuje stabilizacja HIF-1α. W hipoksji dochodzi do zablokowania aktywności PHD, a także białka VHL, co w konsekwencji umożliwia ubikwitynację i degradację HIF-1α w proteasomach. Dochodzi wówczas do translokacji HIF-1α do jądra komórkowego, gdzie zachodzi proces dimeryzacji z cząsteczką HIF-1β i związania kompleksu z sekwencją HRE (ang. *hypoxia response elements*) w DNA (ryc. 4). Aktywacja genów docelowych wymaga rekrutacji kofaktorów, w tym między innymi p300/CBP (ang. *p300/Creb-binding protein*) [14]. Oba te białka stabilizują kompleks inicjacji transkrypcji zawierający polimerazę RNA II oraz posiadają aktywność acylotransferazy histonów. Stanowią więc podstawowy element umożliwiający regulację ekspresji genów przez HIF-1.



Geny docelowe HIF

Kompleks HIF-1α/β związany z HRE reguluje ekspresję wielu genów odpowiedzialnych za odpowiedź na obniżoną dostępność tlenu zarówno na poziomie komórkowym, jak i systemowym (ryc. 5).



Geny docelowe HIF-1 są przede wszystkim zaangażowane w adaptację komórek do warunków hipoksji. Ekspresja tych genów prowadzi do obniżenia aktywności procesów wymagających energii, przekierowania metabolizmu komórek na procesy anaerobowe oraz te, które mają na celu przywrócenie normalnej dostępności tlenu. Istotnym elementem adaptacji do warunków hipoksji jest przemiana generacji energii z zależnej od tlenu oksydacyjnej fosforylacji w mitochondriach na rzecz fosforylacji substratowej na szlaku glikolizy. HIF-1 α aktywuje ekspresję transporterów glukozy GLUT-1 i GLUT-3 oraz enzymów glikolizy. Konwersja pirogronianu w kwas mlekowy jest ułatwiona przez indukcję dehydrogenazy mlekoczanowej (LDH). HIF-1 α indukuje również kinazę dehydrogenazy pirogronianowej-1 (PDK-1), która fosforyluje dehydrogenazę pirogronianową. Tym samym hamuje przemianę pirogronianu w acetylo-CoA i jego katabolizm w cyklu kwasów trójkarboksylowych (cykl Krebsa). Przemiana glukozy w mleczan w warunkach tlenowych została opisana po raz pierwszy przez niemieckiego biochemika Otto Warburga na początku ubiegłego stulecia. Wykazał on, że komórki nowotworowe preferują proces oddychania beztlenowego, a nie tlenowego. Przekształcają one duże ilości glukozy do mleczanu w procesie fermentacji prowadzonej nawet w obecności tlenu. Zjawisko to dziś znane jest pod pojęciem *efektu Warburga* lub glikolizy tlenowej.

W dążeniu do przezwyciężania hipoksji ogromną rolę odgrywa regulowana przez HIF-1 ekspresja wielu genów, które promują dostęp tlenu dla komórek, takich jak: EPO, transferyny czy naczyniowego, śródbłonkowego czynnika wzrostu VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*), który jest zaangażowany w proces tworzenia nowych naczyń (angiogenezy).

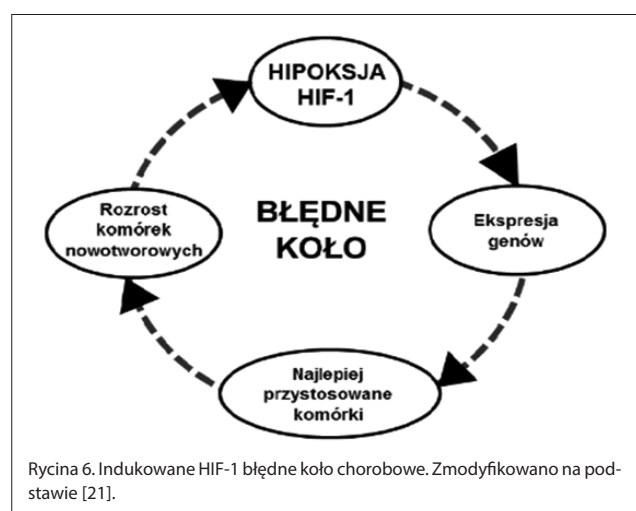
Rola HIF-1 w progresji nowotworów

Guzy nowotworowe zawierają regiony hipoksji jako efekt wzmożonej patologicznej proliferacji komórek. W diagnostycznych biopsjach wielu guzów stwierdza się zwiększony poziom HIF-1 α i jest to związane ze znacznym wzrostem śmiertelności. Zwiększona ekspresja HIF-1 α prowadzi do intensywnego rozwoju nowotworu, podczas gdy jej spadek ogranicza wzrost guza [16]. Jego poziom jest zależny także od zaburzeń genetycznych, w szczególności dotyczących aktywności białka VHL, które jest odpowiedzialne za proces degradacji HIF-1 α , co zostało wykazane w komórkach

raka nerek [17]. HIF-1 aktywuje transkrypcję wielu genów, które odgrywają istotną rolę w biologii nowotworów. Regulują one procesy angiogenezy, erytropoezy, generacji energii oraz indukują przemiany metabolizmu, przeżycia komórek oraz proliferacji (ryc. 6) [18 – 20].

Hipoksja jest cechą charakterystyczną dla guzów litych. Stymuluje ekspresję wielu genów, co umożliwia przystosowanie komórek do powstałych, trudnych warunków metabolicznych. Najlepiej przystosowane komórki ulegają szybkiemu rozrostowi, pogłębiając warunki hipoksji. Powstaje więc swoiste błędne koło o charakterze *perpetuum mobile*, co prowadzi do progresji guza. Powyższe obserwacje potwierdzają wielowymiarową rolę

HIF-1 w patogenezie chorób nowotworowych i jednocześnie wskazują na poszczególne etapy szlaku metabolizmu HIF-1 α jako potencjalne cele terapeutyczne [16].



Protekcyjne działanie HIF-1 w chorobach sercowo-naczyniowych

Tworzenie blaszki miażdżycowej w głównych naczyniach wieńcowych prowadzi do niewystarczającej perfuzji, szczególnie w warunkach intensywnej konsumpcji tlenu niezbędnej dla właściwej pracy serca. Fizjologiczną odpowiedzią na niedotlenienie *miokardium* jest powstawanie krążenia obocznego, omijającego zwężony region tętnicy wieńcowej. U około 3/4 pacjentów, u których dochodzi do istotnego zwężenia światła tętnicy (> 70%), występuje jedno lub więcej naczyń okalających. Uszkodzenie blaszki miażdżycowej i całkowita okluzja tętnicy wieńcowej u pacjentów z wytworzonym krążeniem obocznym skutkuje znacznie mniejszym obszarem zawału – a zatem mniejszym ryzykiem zgonu. U pacjentów z krytycznym zwężeniem światła tętnicy wieńcowej i obecnością krążenia obocznego polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) w obrębie genu *HIF-1 α* , skutkujący zamianą proliny w pozycji 582 na serynę, w porównaniu do pacjentów bez krążenia obocznego [22], występuje 5-krotnie częściej. Ten polimorfizm oraz inne zmiany w genie *HIF-1 α* są raczej związane z chorobą niedokrwienną serca niż z zawałem mięśnia sercowego [23]. Dane te wskazują, że indukowana przez HIF-1 ekspresja genów czynników angiogennych (tj. VEGF, VEGF-R oraz PAI-1)

jest związana procesem wytworzenia krążenia obocznego, zapewniającego zwiększenie dostępności tlenu do niedokrwionych kardiomiocytów. Niezwykle istotnym elementem protekcyjnego działania HIF-1 jest również indukcja adaptacji komórek, polegająca na zmianie mechanizmów tworzenia użytecznej energii (ATP) w mitochondriach z oksydacyjnej fosforylacji na glikolizę tlenową.

Podsumowanie

Czynnik indukowany hipoksją (HIF-1) stanowi centralny punkt regulujący zarówno wykrywanie, jak i adaptację do komórkowego poziomu tlenu, który na poziomie transkrypcji aktywuje geny modulujące homeostazę tlenową. Mechanizmy adaptacyjne uruchamiane w warunkach niskiego stężenia tlenu odgrywają bardzo ważną rolę w działaniu naszego systemu immunologicznego oraz w wielu innych procesach fizjologicznych. Reakcja na poziom tlenu jest niezwykle istotna w prawidłowym rozwoju płodu poprzez kontrolę tworzenia naczyń krwionośnych i rozwój łożyska. Regulowane przez tlen mechanizmy mają istotne znaczenie w rozwoju wielu stanów patologicznych. W chorobach nowotworowych mechanizmy te są wykorzystywane do stymulacji tworzenia naczyń i zmian metabolicznych, umożliwiających efektywną proliferację komórek nowotworowych. Sygnalizacja HIF-1 odgrywa także kluczową rolę w chorobach sercowo-naczyniowych (zawał, udary czy niewydolność serca) zarówno z metabolicznego punktu widzenia, jak i tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Jednocześnie HIF-1, a szczególnie jego podjednostka α , wydaje się atrakcyjnym, terapeutycznym punktem docelowym w przypadku wielu chorób.

Piśmiennictwo

1. Semenza GL, Neufeldt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 5680–5684.
2. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999; 399: 271–275.
3. Wang GL, Jiang B-H, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O_2 tension. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 5510–5514.
4. Dery MA, Michaud MD, Richard DE. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxia and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Bio*. 2004; 37: 535–540.
5. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological function. *Exp Mol Med*. 2004; 36: 1–12.
6. Jakkola P, Mole DR, Tian Y-M, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O_2 -regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001; 292: 468–472.
7. Ivan M, Kondo K, Yang H et al. HIF α targeted for CHL-mediated destruction by proline hydroxylase: Implication for O_2 sensing. *Science*. 2001; 292: 464–468.
8. Ilipoulos O, Levy AP, Jiang C et al. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Landau protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 10595–10598.
9. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*. 2005; 7: 77–85.
10. Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*. 2008; 30: 393–402.

11. Ohh M, Park CW, Ivan M et al. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Landau protein. *Nat Cell Biol*. 2000; 2: 423–427.
12. Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999; 399: 271–272.
13. Kamura T, Sato S, Iwai K et al. Activation of HIF-1 α ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Landau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 10430–10435.
14. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O_2 – sensing protein hydroxylase, hypoxia-inducible transcription factors, and O_2 –regulated gene expression. *Faseb J*. 2002; 16: 1151–1162.
15. Stachurska A, Florczyk U, Józowska A, et al. Nowe oblicza czynnika indukowanego przez hipoksję – HIF-1 i HIF-2 a stres oksydacyjny. *Post Biochem*. 2010; 56: 156–164.
16. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*. 2010; 29: 625–634.
17. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxia stress. *Mol Cell*. 2010; 40: 294–309.
18. Liao D, Johnson RS. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2007; 26: 281–290.
19. Luo W, Hu H, Chang R, et al. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell*. 2011; 145: 732–744.
20. Chan DA, Giaccia AJ. Hypoxia, gene expression, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2007; 26: 333–339.
21. Krszyna K, Stokłosa T. Czynniki indukowane przez hipoksję-1 (HIF-1): Budowa, regulacja ekspresji, funkcja oraz rola w progresji nowotworów. *Post Biol Kom*. 2005; 32: 707–728.
22. Resar JR, Roguin A, Voner J, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α polymorphism and coronary collaterals in patients with ischaemic heart disease. *Chest*. 2005; 128: 787–791.
23. Hlatky MA, Quertermous T, Boothroyd DB, et al. Polymorphism in hypoxia inducible factor 1 and the initial clinical presentation of coronary disease. *Am Heart J*. 2007; 154: 1035–1042.

Autor do korespondencji:

dr hab. Grażyna Sygitowicz
Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
02-097 Warszawa, ul. Banacha 1
e-mail: gsygitowicz@poczta.onet.pl

Nie zgłoszono sprzeczności interesów.

Otrzymano: 02.02.2020

Akceptacja do druku: 04.05.2020