

Hypoxie a HIF

Chata Pohoda 08

Eva Lincová

Jana Kamarýtová

Filip Trčka



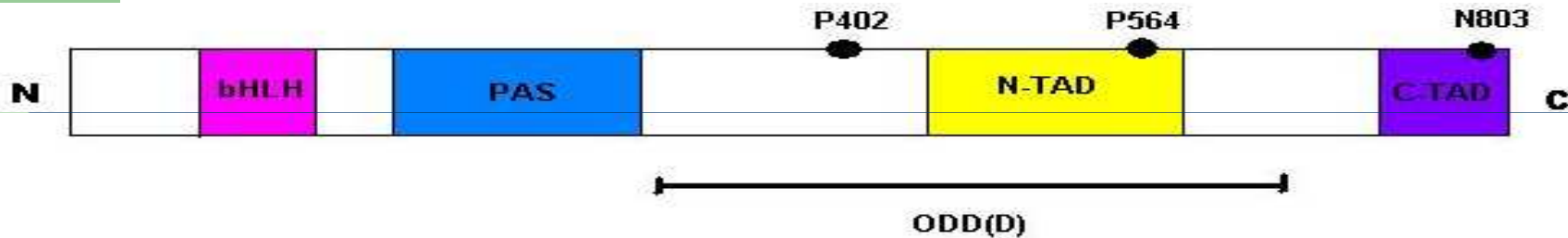
Hypoxie a HIF

- 1) Hypoxie a HIF – úvod, regulace
- 2) Hypoxie a vývoj
- 3) Hypoxie a kancerogeneze

Hypoxie a HIF

- **Hypoxie:** snížený parciální tlak O_2 ve tkáni X normoxie
- **HIF** – Hypoxia-Inducible Factor:
 - Heterodimerický TF aktivující geny obsahující v promotorové sekvenci HRE (Hypoxia response element), vlastní transkripce je iniciována pomocí koaktivátorů **p300** a **CBP** (CREB-binding protein)
 - Prozatím je známo kolem 60 (100) genů regulovaných HIF, řada z nich reguluje odpověď na hypoxii (angiogeneze, proliferace, metabolismus glukózy, migrace, apoptóza, erytropoeza, metabolismus Fe)
 - Heterodimer sestává ze tří α podjednotek (HIF1 α , 2 α , 3 α) a jedné podjednotky β (HIF β =ARNT)
 - **α podjednotky jsou při normoxii silně labilní**, podjednotka β je na koncentraci O_2 nezávislá
 - HIF3 α negativní regulátor funkce HIF

Struktura HIF α podjednotek

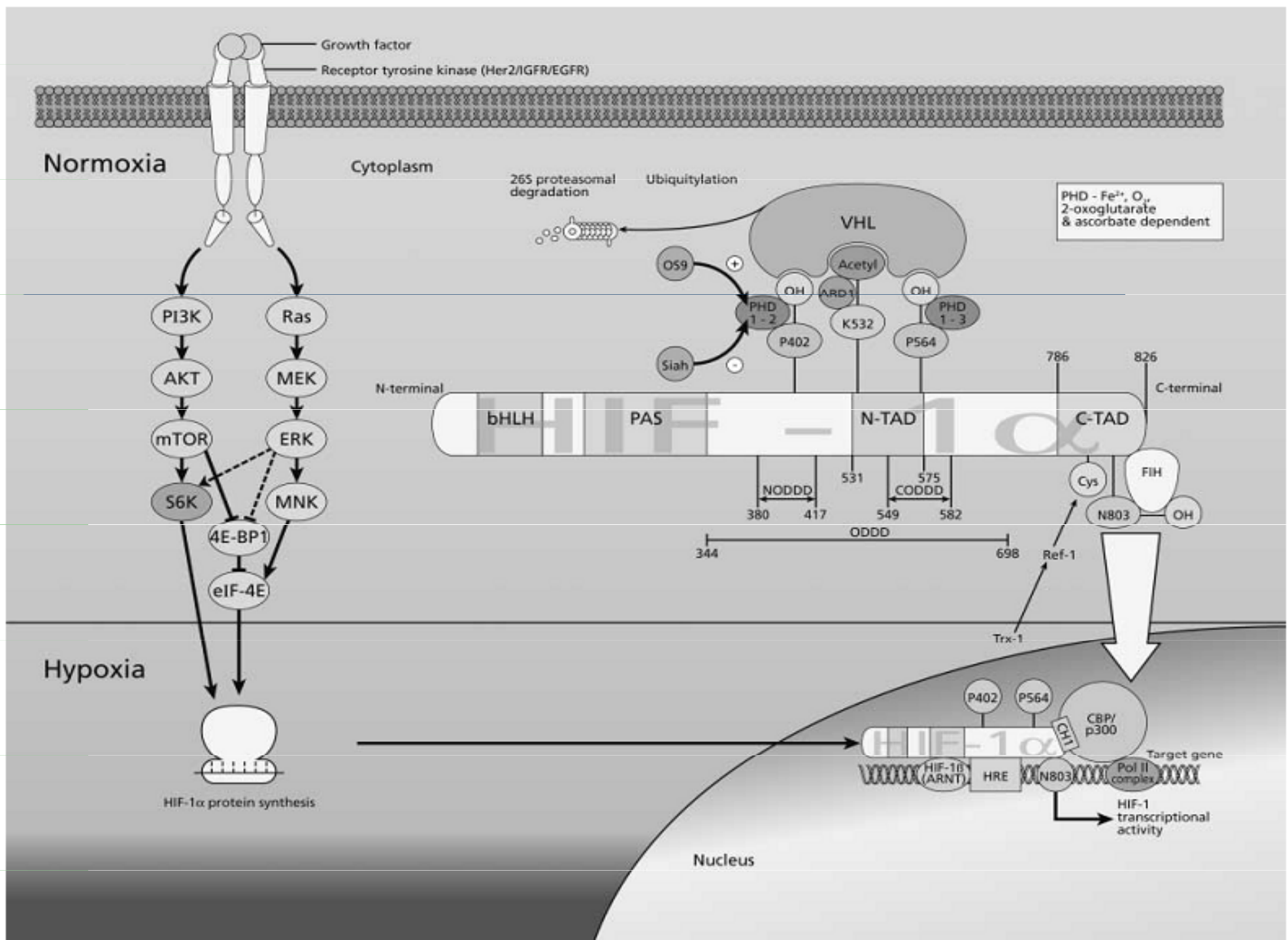


- bHLH (basic Helix-Loop-Helix) motiv: vazba na DNA, dimerizace
- PAS (Per/ARNT/Sim) doména: usnadňuje heterodimerizaci
- N-TAD (N-terminal transactivation domain)
- C-TAD (C-terminal transactivation domain)
- ODD(D) (Oxygen-dependent degradation domain)
- P402, P564: místa specifické hydroxylace v ODD při normoxii
- N803: místo specifické hydroxylace asparaginu mimo ODD
- (NLS: nuclear localisation signal)
- (podjednotky β obsahují rovněž bHLH a PAS)

Degradace HIF α při normoxii

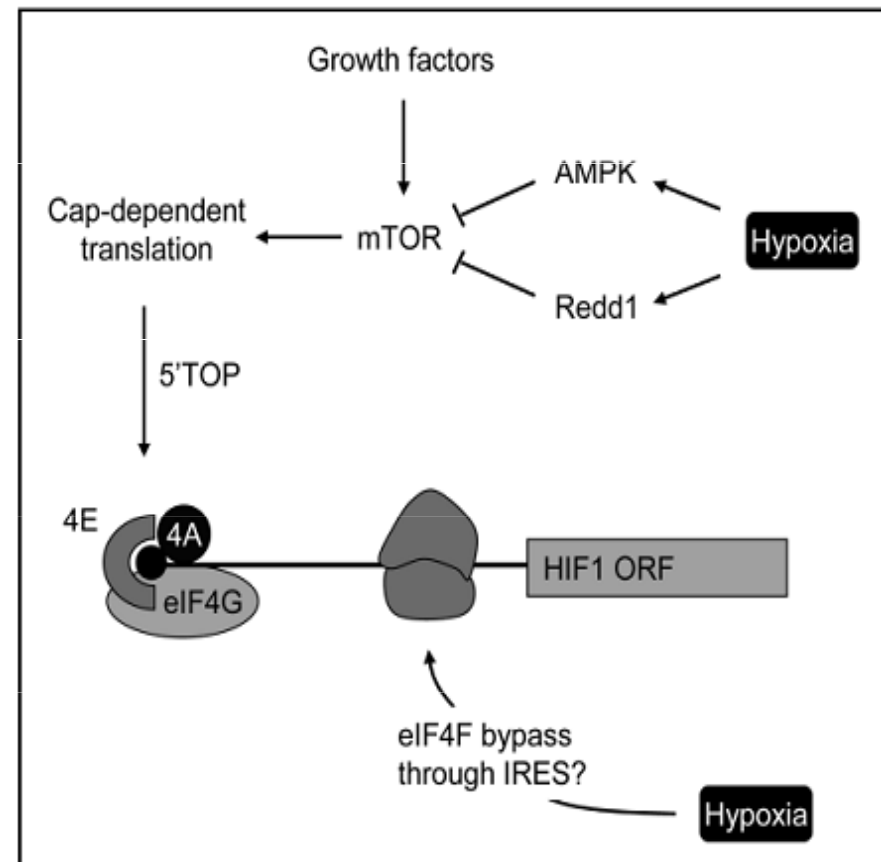
VHL (von Hippel-Lindau) - tumor supresorový gen:

- VHL tvoří komplex s Elonginem B, Elonginem C, Cul2 a Rbx1
ECV (elongins/Cul2/VHL) komplex
- ECV komplex je analogem SCF komplexu u kvasinek – má funkci
E3-ubiquitinligázy – > úloha v **proteasomální** degradaci proteinů
- ECV komplex se váže k ODD přes protein VHL
- VHL je směřován k vazbě na ODD **hydroxylací** specifických zbytků P402 a P564 = > následuje polyubiquitinizace HIF α a degradace v proteasomu
- Hydroxylace P402 a P564 je zprostředkována prolinhydroxylázami
PHD 1,2,3 – substrátem reakce je **O₂** (kofaktory: vitamin C, 2-oxoglutarát, Fe)
- N803 v C-TAD je hydroxylován asparaginhydroxylázou **FIH** (Factor-Inhibiting HIF), tato hydroxylace stericky brání vazbě koaktivátorů p300 a CBP
- FIH je rovněž silně O₂-dependentní



Regulace translace HIF α

- Mechanismus O₂-independentní regulace hladiny HIF α
- Umožňuje buněčně specifické zvýšení hladiny HIF α
- Dráha **PI3K/Akt/mTOR/p70S6K** aktivovaná vazbou růstového faktoru (př. HER2/Neu)
- **mTOR** (mammalian target of rapamycin): všeobecný aktivátor translace „odblokováním“ IF nebo fosforylací S6
- 5' terminal oligopyrimidine tract (TOP) v UTR
- **IRES** (internal ribosome entry site)

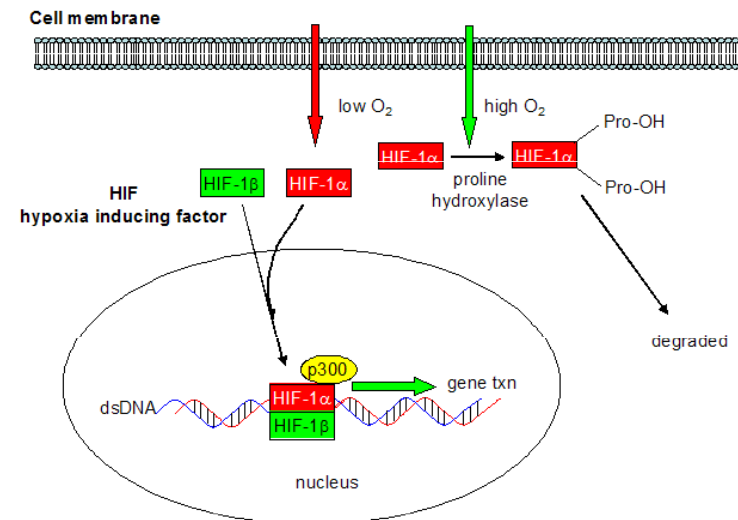


HYPOXIE A HIF SYSTÉM VE VÝVOJI JEDINCE



Vývojové změny spojené s hypoxií

- embryonální vývoj
- angiogenese
- růst chrupavek
- krvetvorba – aktivace EPO genu

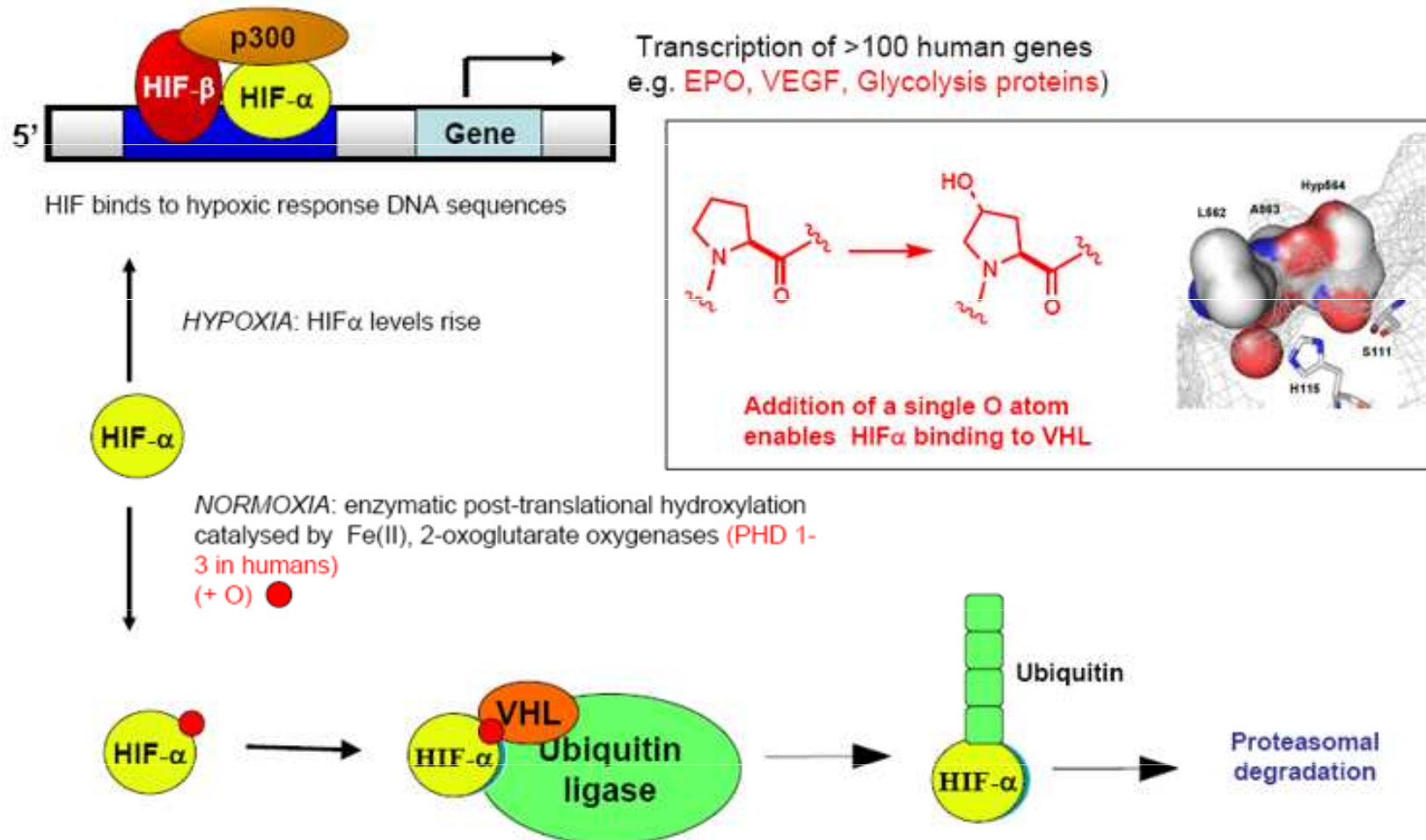


Genes upregulated:

- erythropoietin (induce RBC formation)
- glycolytic enzymes (needed if O₂ low)
- angiogenesis (new blood vessel growth)
- embryonic development
- placenta (for vascularization)
- macrophage and neutrophils (work in hypoxic wound conditions)

After: Science, 303, pg 1454 (2004)

HIF při normoxii a hypoxii

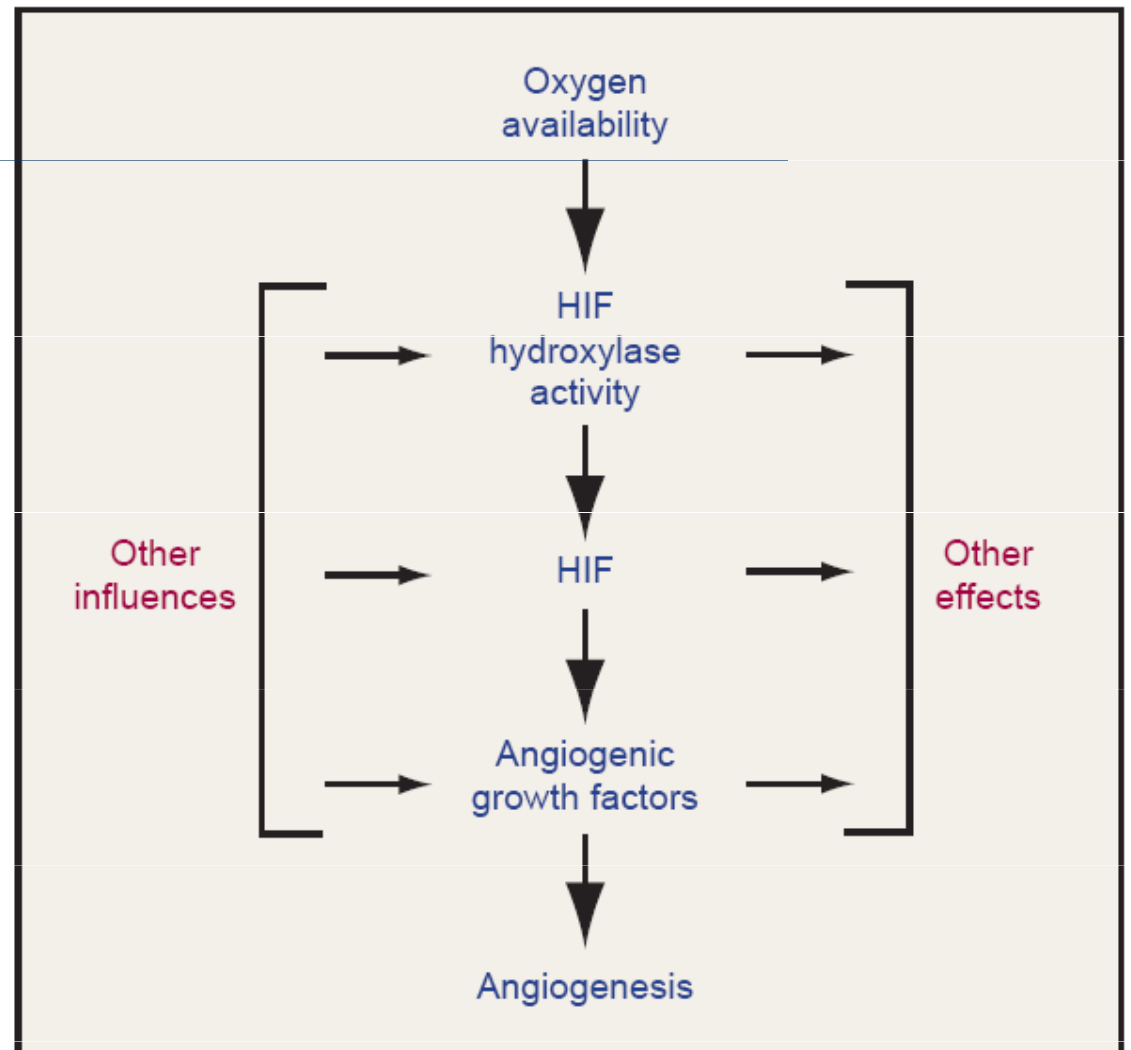


<http://www.chem.ox.ac.uk/oc/cjschofield/images/new-2.png>

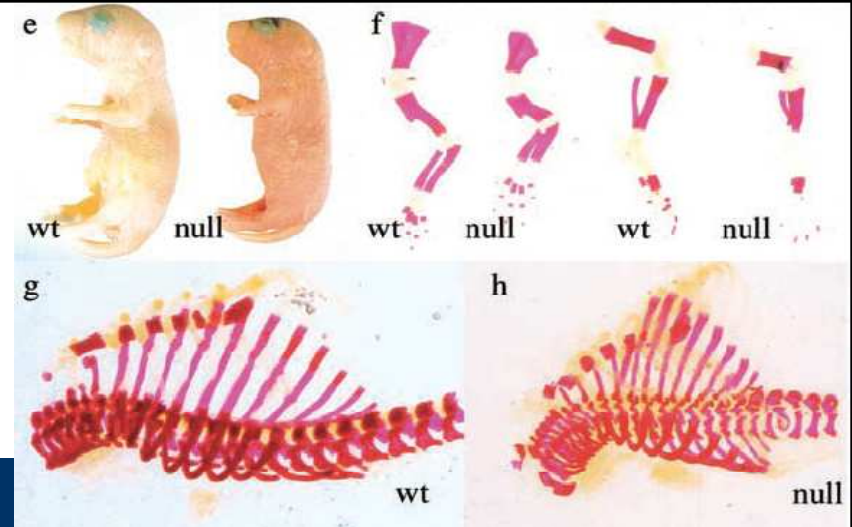
Levels of Hypoxia Inducible Factor- α mediate the hypoxic response

Angiogenesis

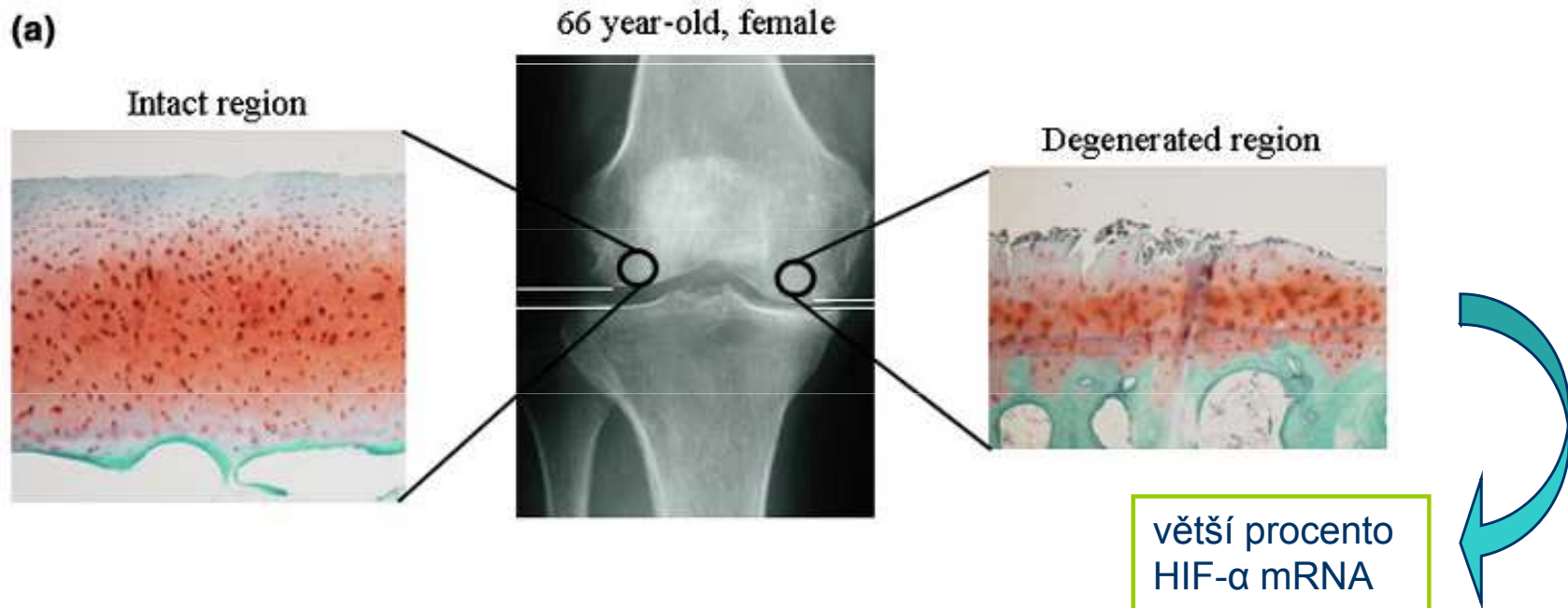
- Angiogenesis
 - tvorba nových krevních cév
- **HIF-2** se váže do oblasti promotoru a iniciuje transkripci receptoru **VEGFR 2** i expresi **VEGF** (Vascular Endothelial Growth Factor)
 - hlavní faktor angiogenesis
- v normálním vývoji ale i během nádorového růstu



Růst chrupavek



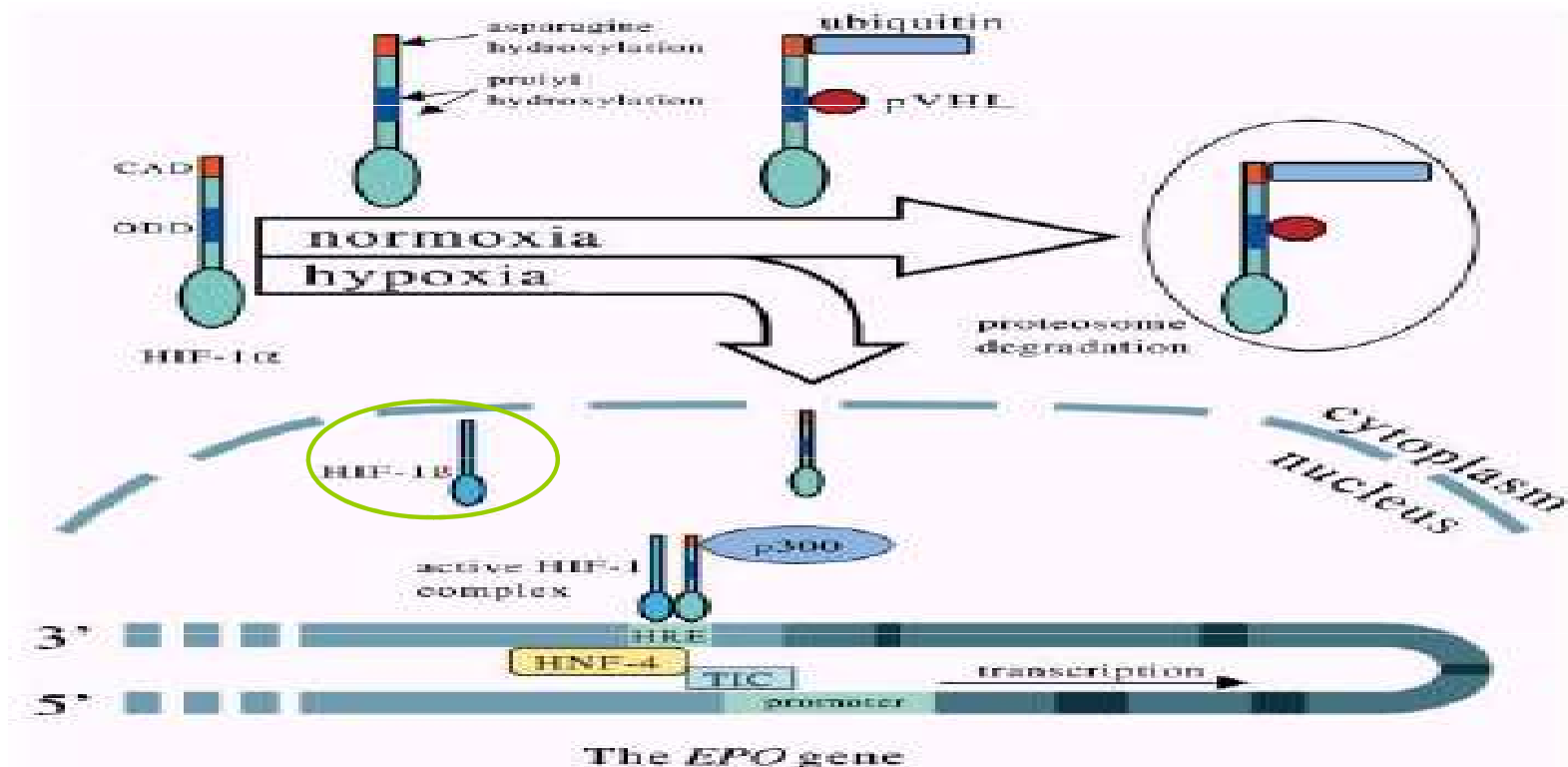
- HIF přítomen při růstu chrupavek
- HIF-1 může hrát roli v adaptaci chondrocytů na nízký tlak kyslíku
- osteoarthritis



Krvetvorba – regulace EPO genu

- EPO gen

- gen pro erythropoetin (hormon tvořený v ledvinách – hl. hormon hemopoézy)
- exprese řízená hladinou kyslíku – HIF faktor



Embryonální vývoj a hypoxie

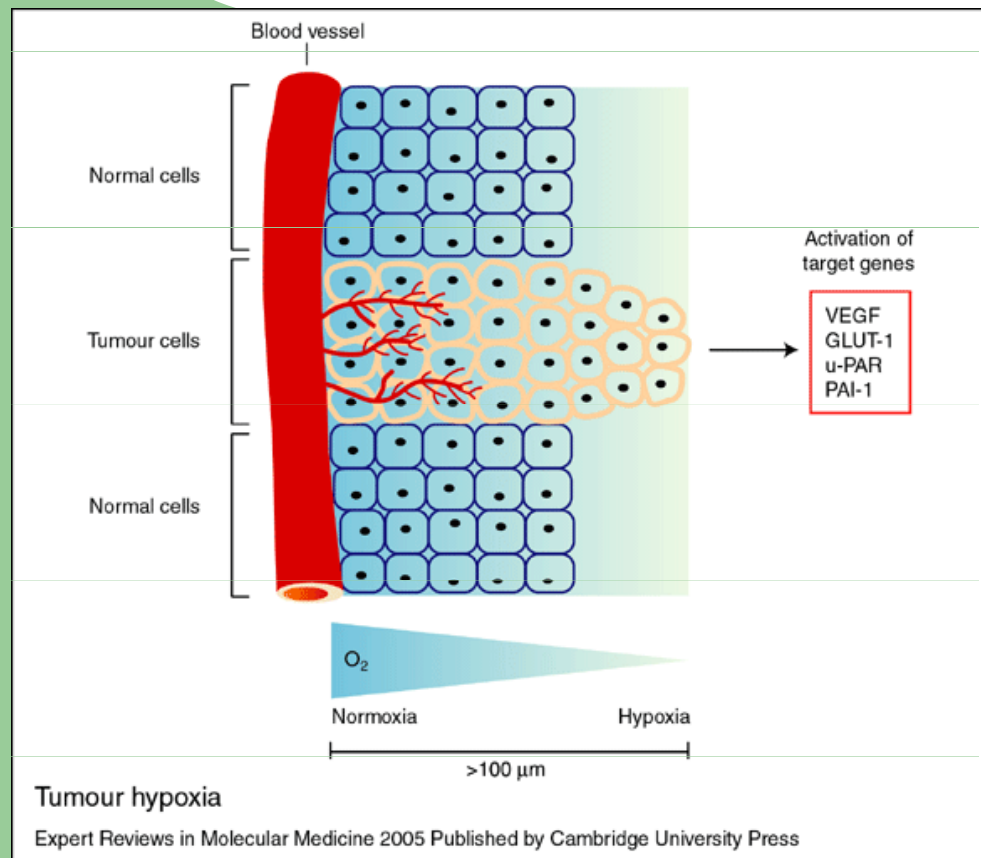
- Existuje již mnoho důkazů pro to, že hypoxické stavy během prvního trimestru mohou způsobit defekty
 - např. defekty srdce
 - teratogenní efekt u ryb, obojživelníků a kuřat
- Marker hypoxie – pimonidazol
 - tvoří se v imunologicky detekovatelné formě v buňkách s parciálním tlakem kyslíku nižším než 1,3kPa
 - vyskytuje se většinou s HIF faktorem a VEGF
 - hypoxie – regulátor pro normální vývoj vaskulárního systému
- více než 10% genomu může být aktivováno HIF faktorem
 - při normoxii je průběžně degradován během 1 minuty
- hypoxický stav může být způsoben maternální anémií

Embryonální vývoj a hypoxie

- Krátké periody hypoxie
 - možná redukce končetin
 - distální části končetin degenerují, mohou chybět nehty i celé končetiny



Hypoxie v karcinogenezi



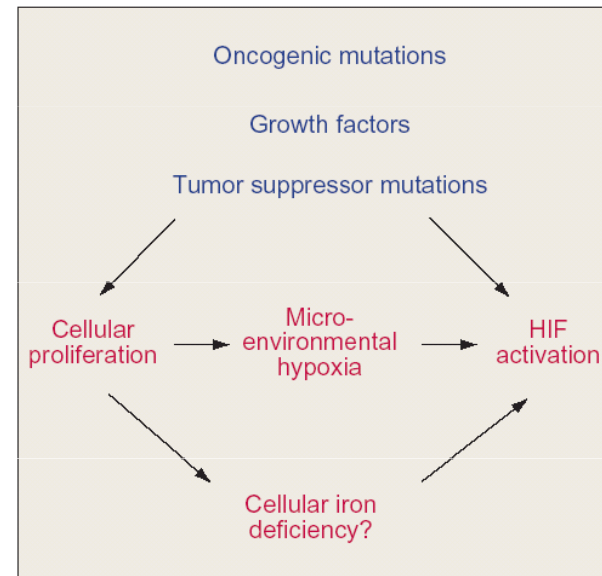
- Hypoxie je již ve vzdálenosti 100 μM od cévy

- Aktivované geny podporují angiogenezi a metastázování

Příčiny a důsledky aktivace HIF

- PŘÍČINY
- Hypoxie
- Působení růstových faktorů a onkogenních signálních drah (EGF, Ras, Src, ...)
- Mutace nádorových supresorů (p53, PTEN, **pVHL**)
- Nedostatečná aktivita hydroxyláz

- DŮSLEDKY
- Podpora angiogeneze a růst nádoru
- Metabolická adaptace na hypoxii (podpora glykolýzy)



Nádory, v nichž je nižší parciální tlak O_2 , hůře odpovídají na léčbu

- Radiační terapie a některé typy chemoterapie potřebují O_2 k maximální efektivitě
- Hypoxie ovlivňuje aktivitu široce působících transkripčních faktorů (HIF-1, AP-1, NF- κ B)
- Ty ovlivňují expresi celé řady genů, regulujících buněčnou proliferaci, apoptózu, angiogenezi a migraci

Zvýšená buňkác

**Table 1. M
expression**

Alteration in tu

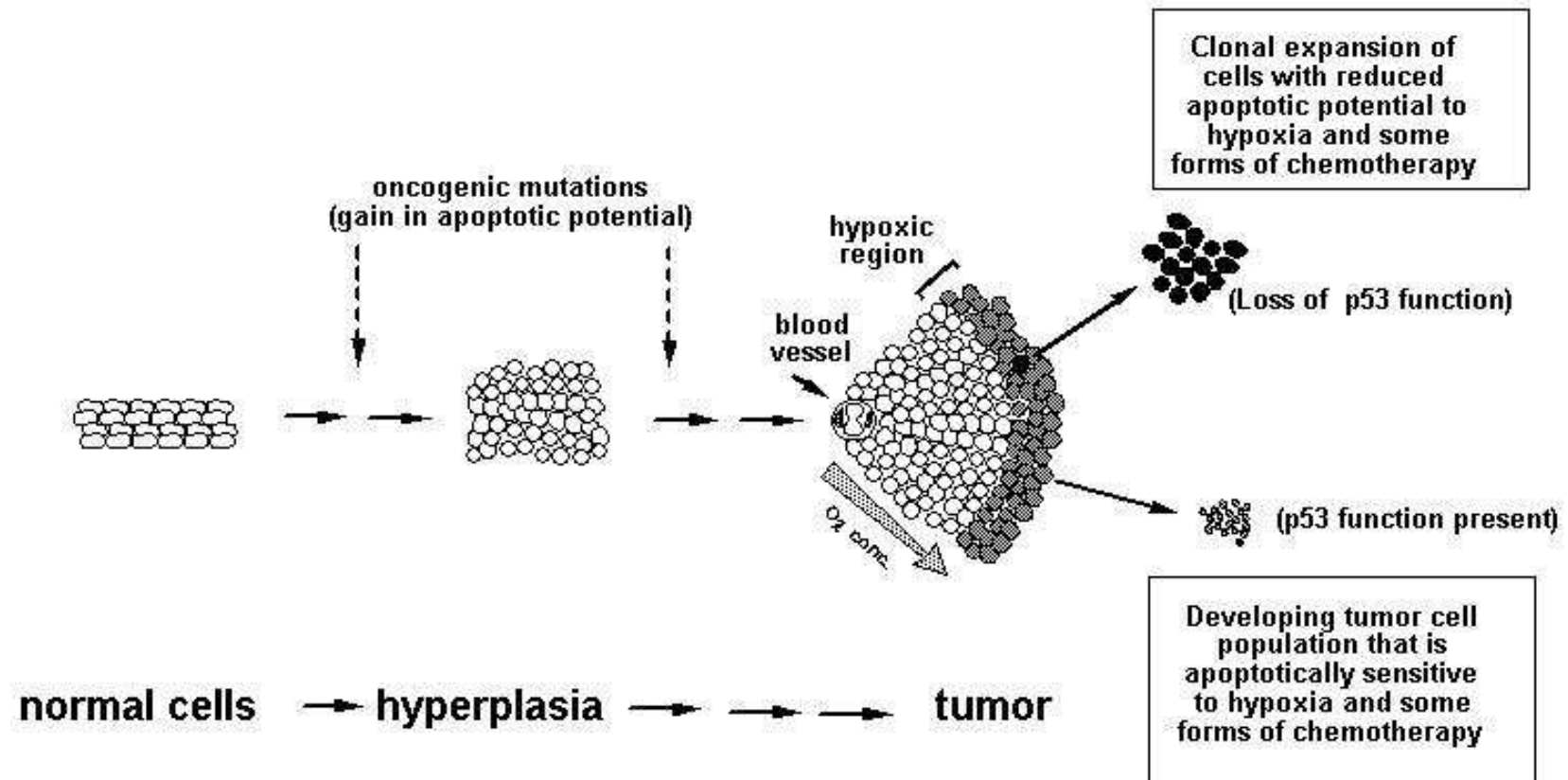
| | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Hypoxia | Decreased ubiquitination |
| VHL loss-of-function | Decreased ubiquitination |
| p53 loss-of-function | Decreased ubiquitination |
| PTEN loss-of-function | Increased synthesis |
| PI3K/AKT/FRAP signaling | Increased synthesis |
| SRC gain-of-function | Increased synthesis |
| p14 ^{ARF} loss-of-function | Decreased nucleolar sequestration |

^aHIF-1 α , hypoxia-inducible factor-1 α ; VHL, von Hippel-Lindau tumor suppressor protein; PTEN, phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10; PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase; AKT, protein kinase B; FRAP, FKBP-rapamycin-associated protein.

Table 2. Association of HIF-1 α overexpression with adverse clinical outcome

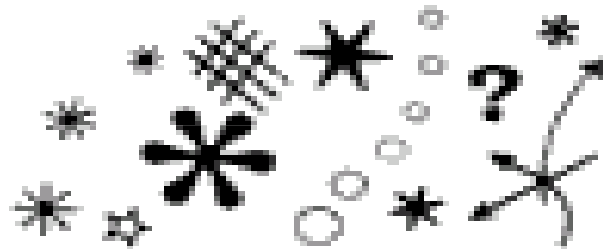
| Tumor type | Association |
|---|------------------------------|
| Breast cancer, lymph-node negative | Mortality |
| Cervical cancer, early-stage | Mortality |
| Oligodendroglioma | Mortality |
| Oropharyngeal squamous cell carcinoma | Treatment failure, mortality |
| Esophageal cancer, early-stage, BCL2-positive | Treatment failure |
| Ovarian cancer, p53 mutant | Mortality |

The Role of Hypoxia in Malignant Progression



Děkujeme za pozornost

**LACK OF
OXYGEN !**



**Can cause the same
effect as a couple
of Martinis**

OVERCONFIDENCE...InCoOrDiNaTiOn

USE OXYGEN OVER 12,000 FEET

Literatura

- Twan van den Beucken *et al.* **Translational Control of Gene Expression During Hypoxia**, *Cancer Biology & Therapy* 5:7, 749-755, July 2006
- Michal Safran and William G. Kaelin, Jr. **HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway**, *J. Clin. Invest.* 111:779–783, 2003
- GUANG L. *et al.* **Hypoxia-inducible factor is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol.92, pp.5510-5514, June 1995
- Stacy Zamudio *et al.* **Human Placental Hypoxia-Inducible Factor-1 expression Correlates with Clinical Outcomes in Chronic Hypoxia in Vivo**, *The American Journal of Pathology*, Vol.170, No.6, June 2007
- Jennifer E. Ziello , Ion S. Jovin , and Yan Huang. **Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Regulatory Pathway and its Potential for Therapeutic Intervention in Malignancy and Ischemia**, *YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE* 80 pp.51-60. 2007
- Shalini Patiarand, Adrian L. Harris. **Role of hypoxia-inducible factor-1a as a cancer therapy target**, *Endocrine-Related Cancer*, 2006
- Michael Ohh. **Ubiquitin Pathway in VHL Cancer Syndrome**, *Neoplasia* . Vol.8, No.8, August 2006