

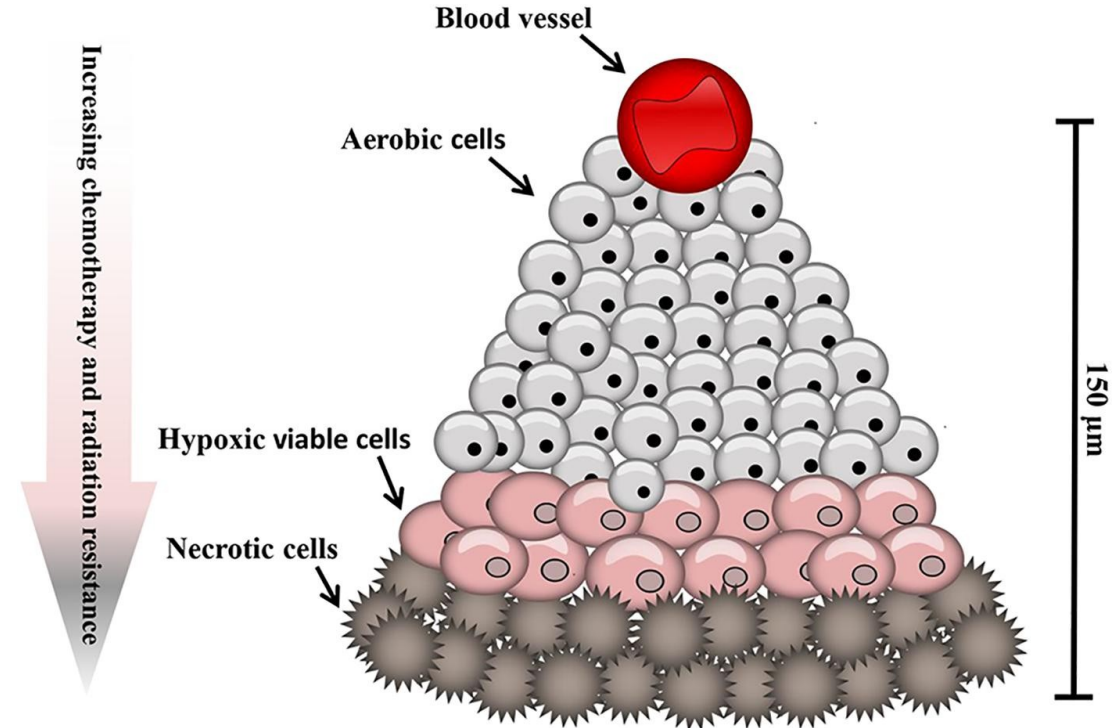
Hypoxie a buněčný metabolismus

anoxie - 0% kyslíku

tkáňová hypoxie – 0-3% kyslíku

tkáňová normoxie – 3-5% kyslíku

atmosféra – 21% kyslíku



In the human organisms, O_2 concentration varies significantly between the tissues: in the lung parenchyma and in circulation (McKinley and Butler, 1999; Saltzman et al., 2003; Johnson et al., 2005; Wild et al., 2005), as well as in well irrigated parenchymal organs (liver, kidneys, heart; Wolfle and Jungermann, 1985; Jungermann and Kietzmann, 1997; Roy et al., 2000; Welch et al., 2001; Mik et al., 2004) it is comprised between 14% and 4%. In other tissues, relatively less irrigated, O_2 concentration is even lower: in the brain, it varies from 0.5% to 7% (Whalen et al., 1970; Nwaigwe et al., 2000; Hemphill et al., 2005) in the eye (retina, corpus vitreous), from 1 to 5% (Buerk et al., 1993; reviewed in Yu and Cringle, 2005), in the bone marrow, from 0% to 4% (Tondevoid et al., 1979; Chow et al., 2000).

Regulace využití a dostupnost kyslíku:

> **Organismus** (tepová a dechová frekvence)

> **Orgány / Tkáně** (krevní tlak, angiogeneze, erythropoéza)

> **Buňky** (hypoxická odpověď a metabolická adaptace buněk)

Různé adaptace dle hierarchie, primární rozpoznání a odpověď vždy začíná na buněčné úrovni

Buněčné procesy vyžadující O₂

- Energetický metabolismus (OXPHOS)
- Hydroxylace (postranlační modifikace, detoxikace,..)
- Produkce ROS a NOS (oxidativní vzplanutí, vazokonstrikce, transdukce signálu,..)
-

Co ovlivní změna hladiny O₂ dostupného pro buňky / reakce buňky na změnu hladiny O₂

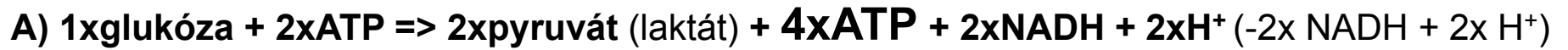
- Energetickou bilanci (hladina ATP x AMP => tvorba energie, ...)
- pH, aktivitu kanálů a transportérů (transformace energie, gradienty, ...)
- Pool intermediálních metabolitů (tvorba/transformace energie, výstavba buněk, ...)
- Genovou expresi
-

Mechanismy rozpoznání množství dostupného O₂ buňkou - sensing

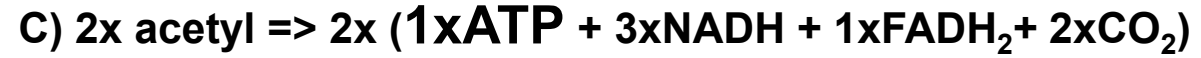
- Pokles produkce ATP, nárůst koncentrace AMP – aktivace AMPK (AMP-activated protein kinase)
- Nedostatek substrátu pro produkci –OH & ROS/NOS
- Stabilizace hypoxií indukovaných faktorů – HIFs (hypoxia-inducible factors)
-

Výsledek sensingu hladiny O₂ u buňky (intenzita a význam odpovědi je buněčně specifický)

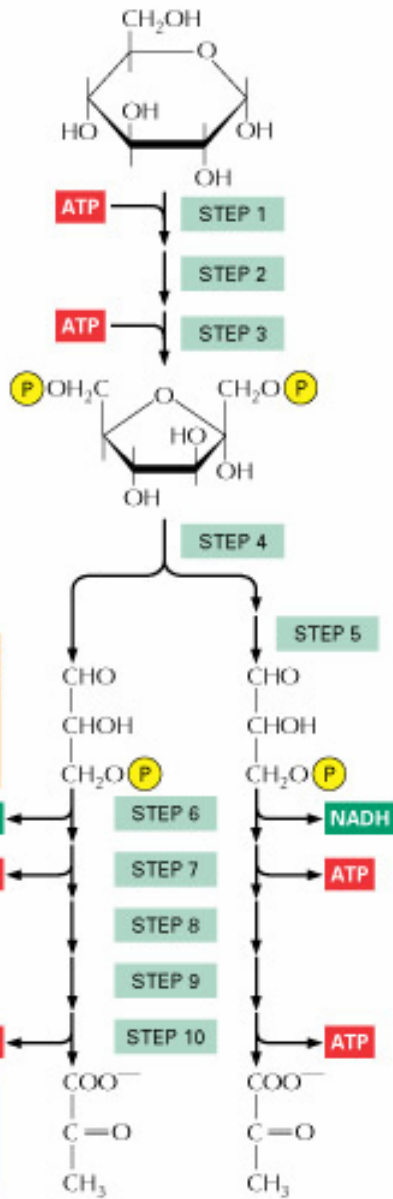
- Adaptace metabolismu (O₂ ↓ glykolýza x O₂ ↑ OXPHOS, využití lipidů)
- Produkce signálů a regulátorů vedoucí k celkové adaptaci (**VEGF/angiogeneze**;
EPO / erytropoéza; změna membránového napětí / **tepová a dechová frekvence**)
- Adaptace funkcí buňky (změny v expresi „pracovních“ proteinů)
- Změna osudu buněk (proliferace, diferenciací/(transformace), apoptóza,...)



Základní cesta energetického metabolismu



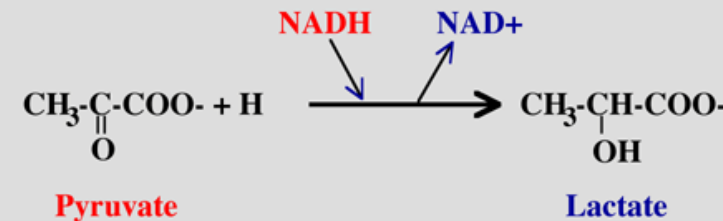
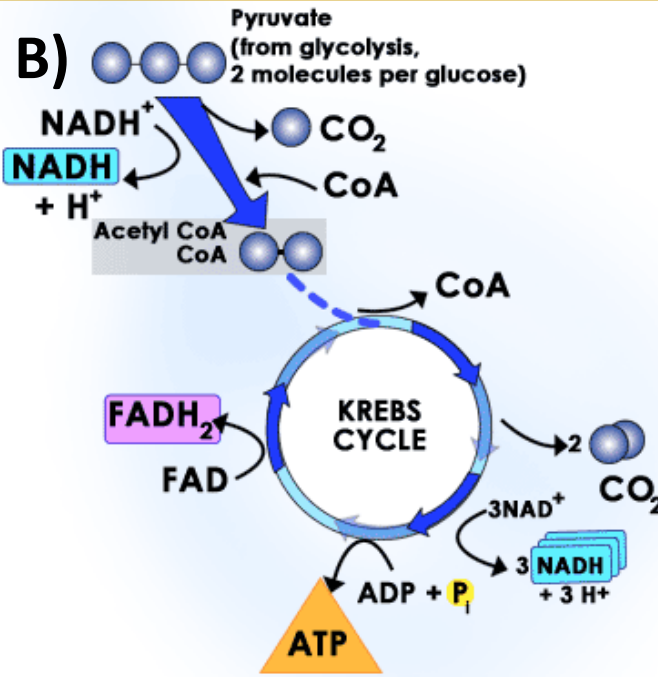
A) one molecule of glucose



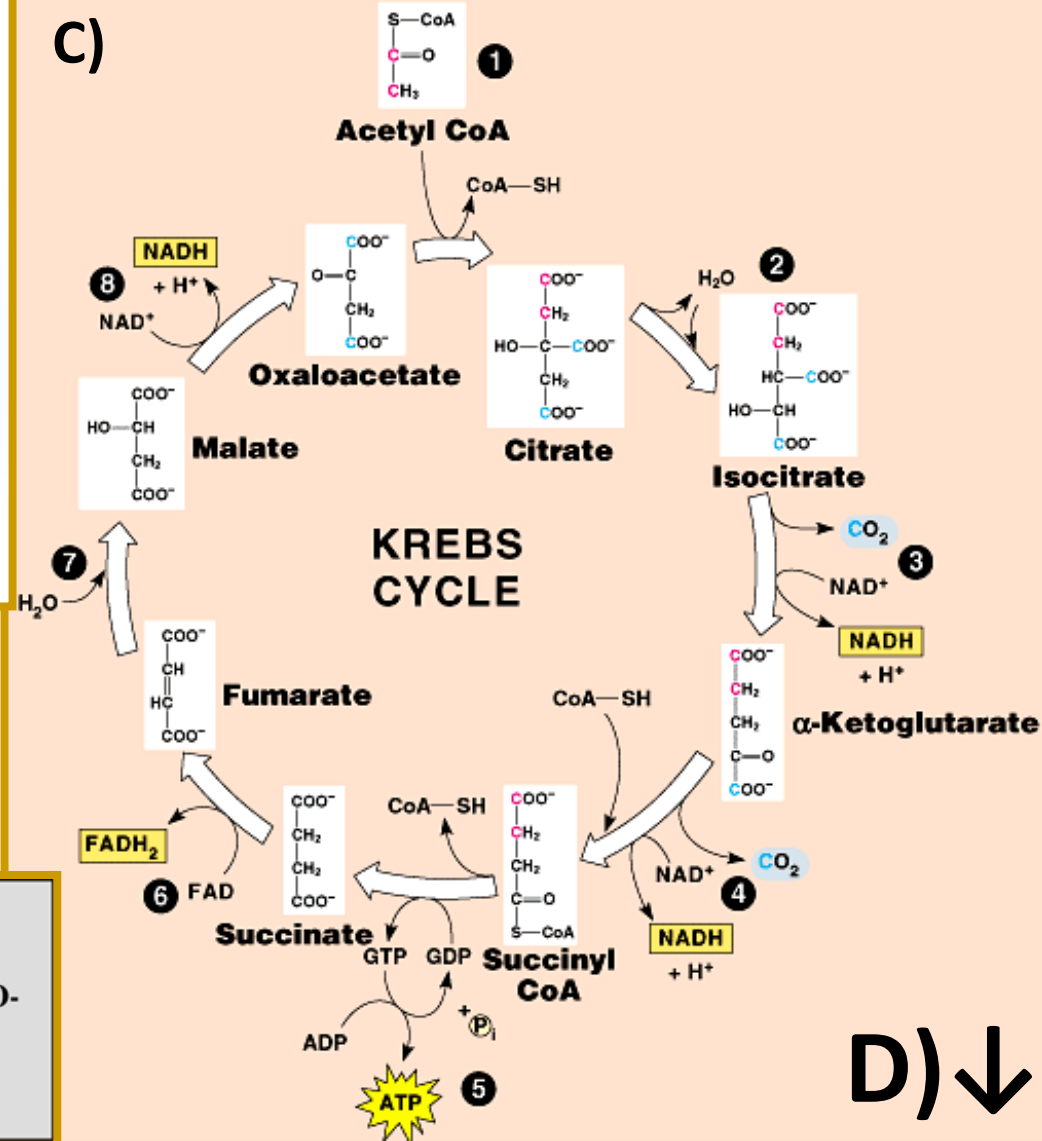
fructose 1,6-bisphosphate

two molecules of glyceraldehyde 3-phosphate

two molecules of pyruvate

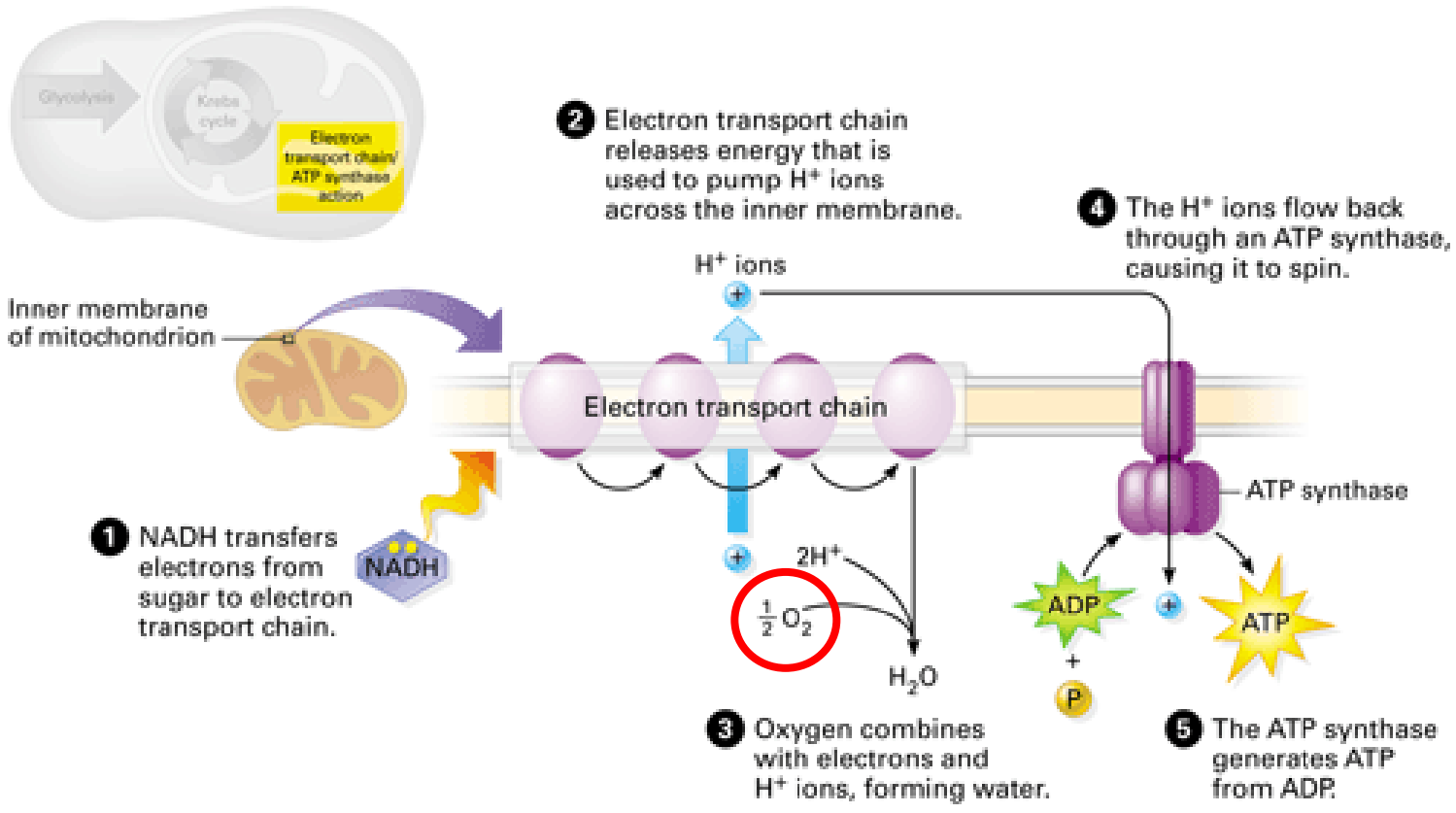


C)



D) ↓

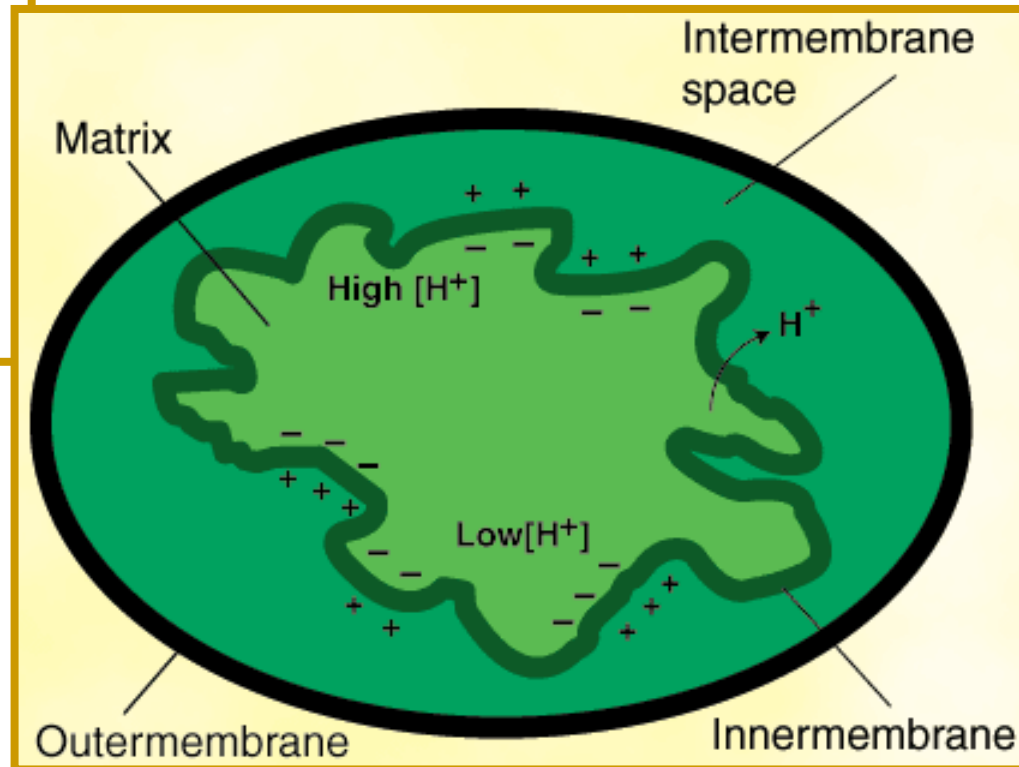
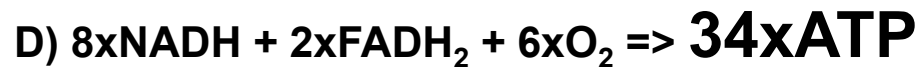
D)



OXPHOS

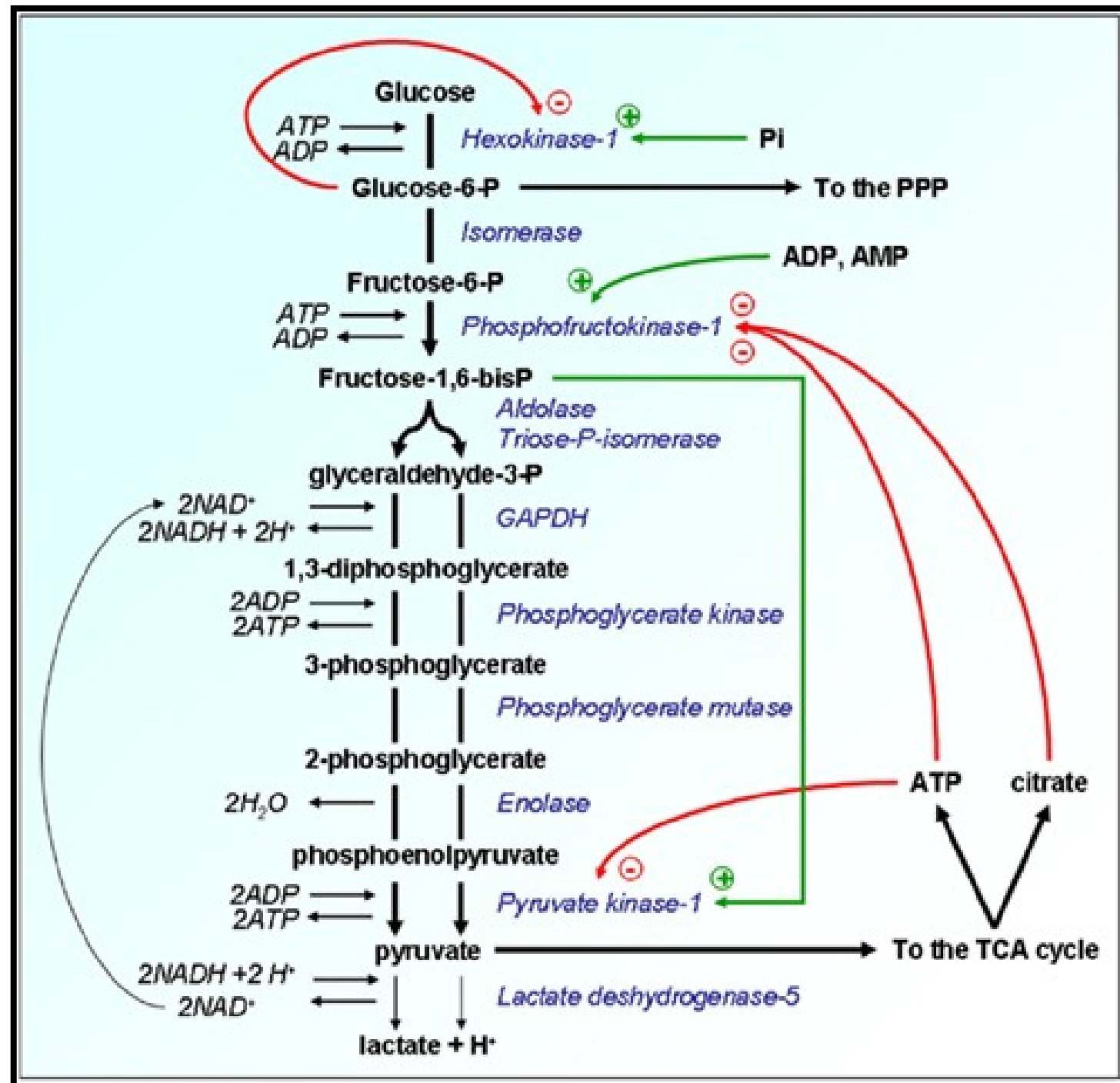
❖ **Krebs. cyklus** => dostatek NADH a FADH₂ pro tvorbu protonového gradientu v mitochondriích jako pohonu ATPsyntáz

<https://www.youtube.com/watch?v=zJNx1DDqIVo>

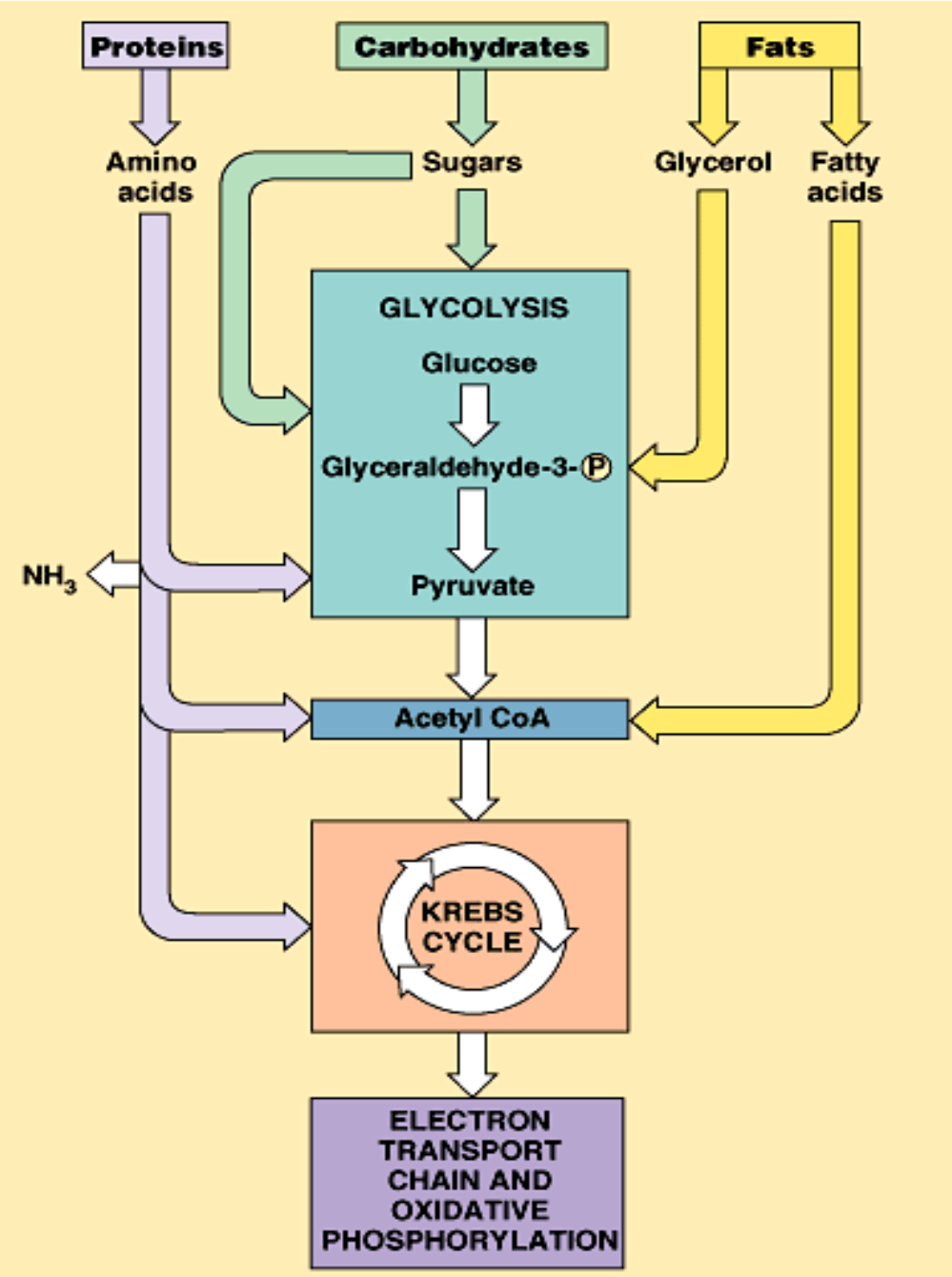


Inhibice glykolýzy v důsledku oxidativní fosforylace

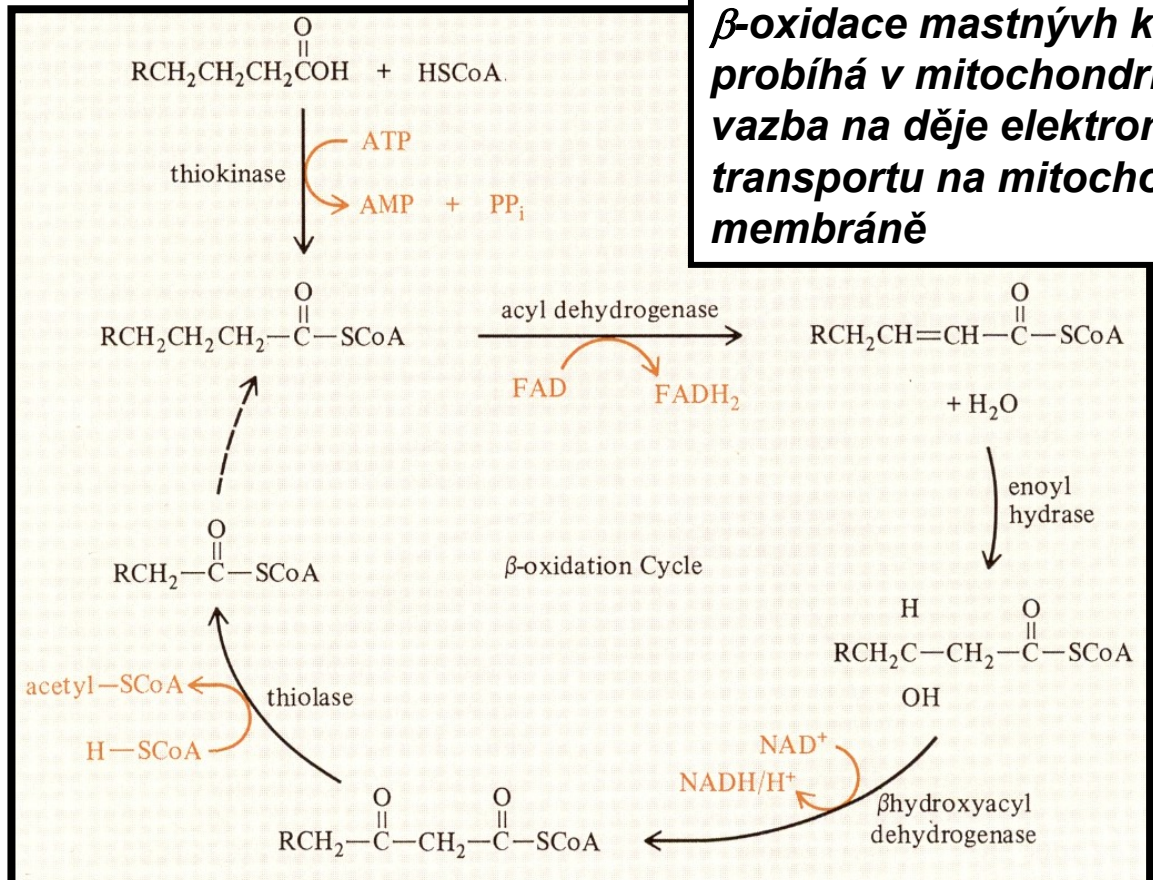
Produkty aktivity mitochondrií
inhibují aktivitu enzymů glykolýzy



Zapojení sacharydů, proteinů a lipidů v jednotlivých krocích energetického metabolismu



β -oxidace mastných kyselin probíhá v mitochondriích, vazba na děje elektronového transportu na mitochondriální membráně

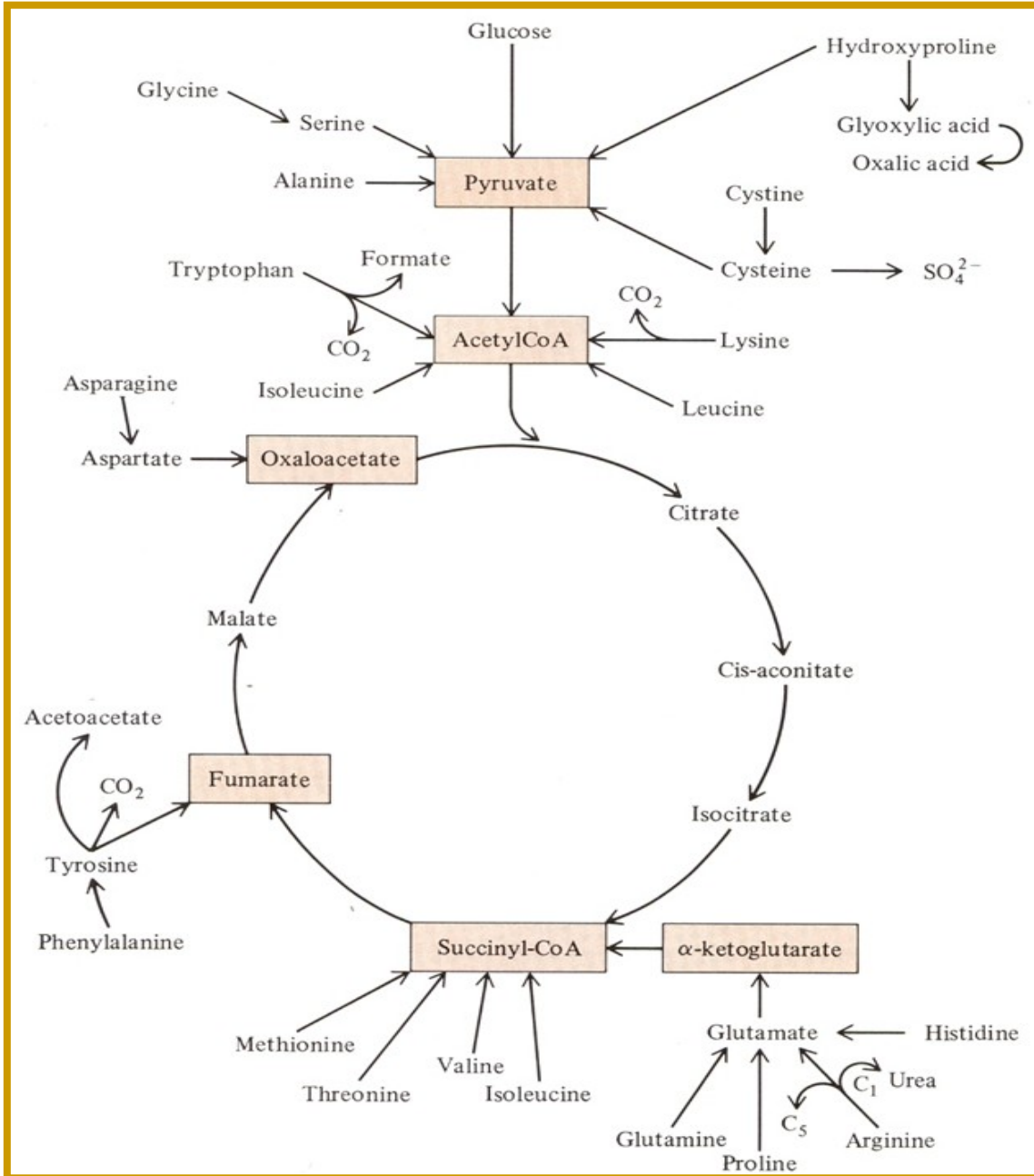


β -oxidation of Palmitic Acid $(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$; 7 turns of cycle

palmitic acid	----->	palmitoyl-SCoA	-1 ATP, -1 PP _i
7 FADH ₂ + 7 NADH/H ⁺ + 7 O ₂	----->	7 FAD + 7 NAD + 14 H ₂ O	+ 35 ATP
8 acetyl-SCoA + 16 O ₂	----->	16 CO ₂ + 16 H ₂ O	+ 96 ATP

	$\Delta G^{\circ'}$
palmitic acid + 23 O ₂ + 129 ADP -----> 16 CO ₂ + 16 H ₂ O + 129 ATP	-5851
palmitic acid + 23 O ₂ -----> 16 CO ₂ + 16 H ₂ O	-9791

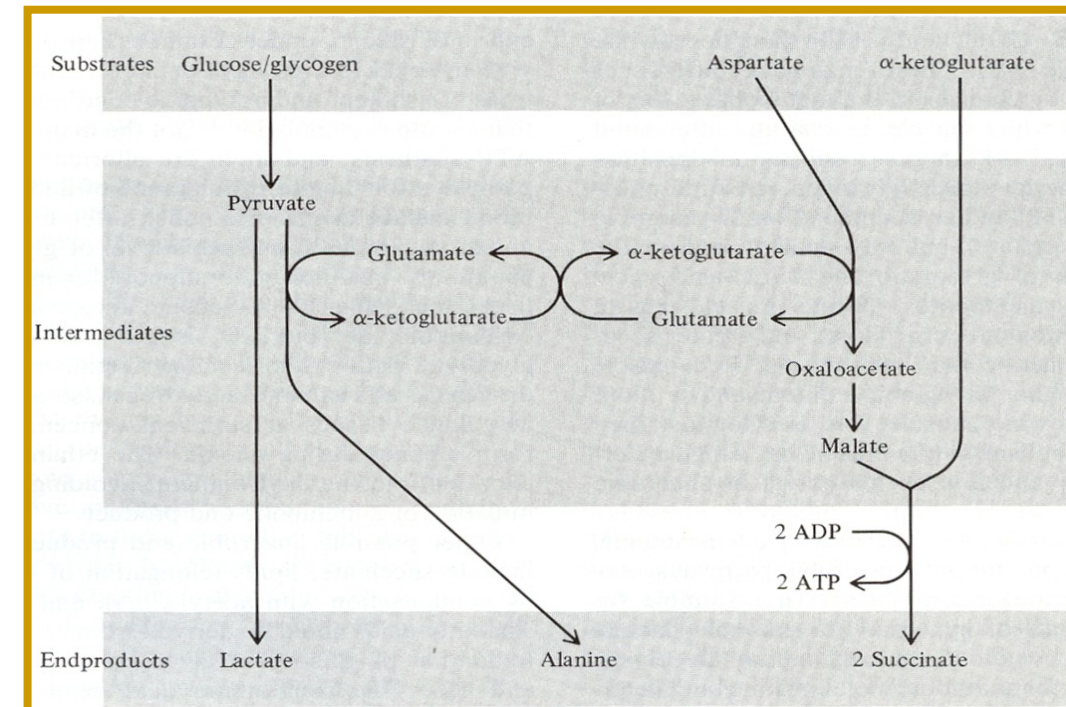
Zapojení aminokyseliny (proteinů) do energetického metabolismu



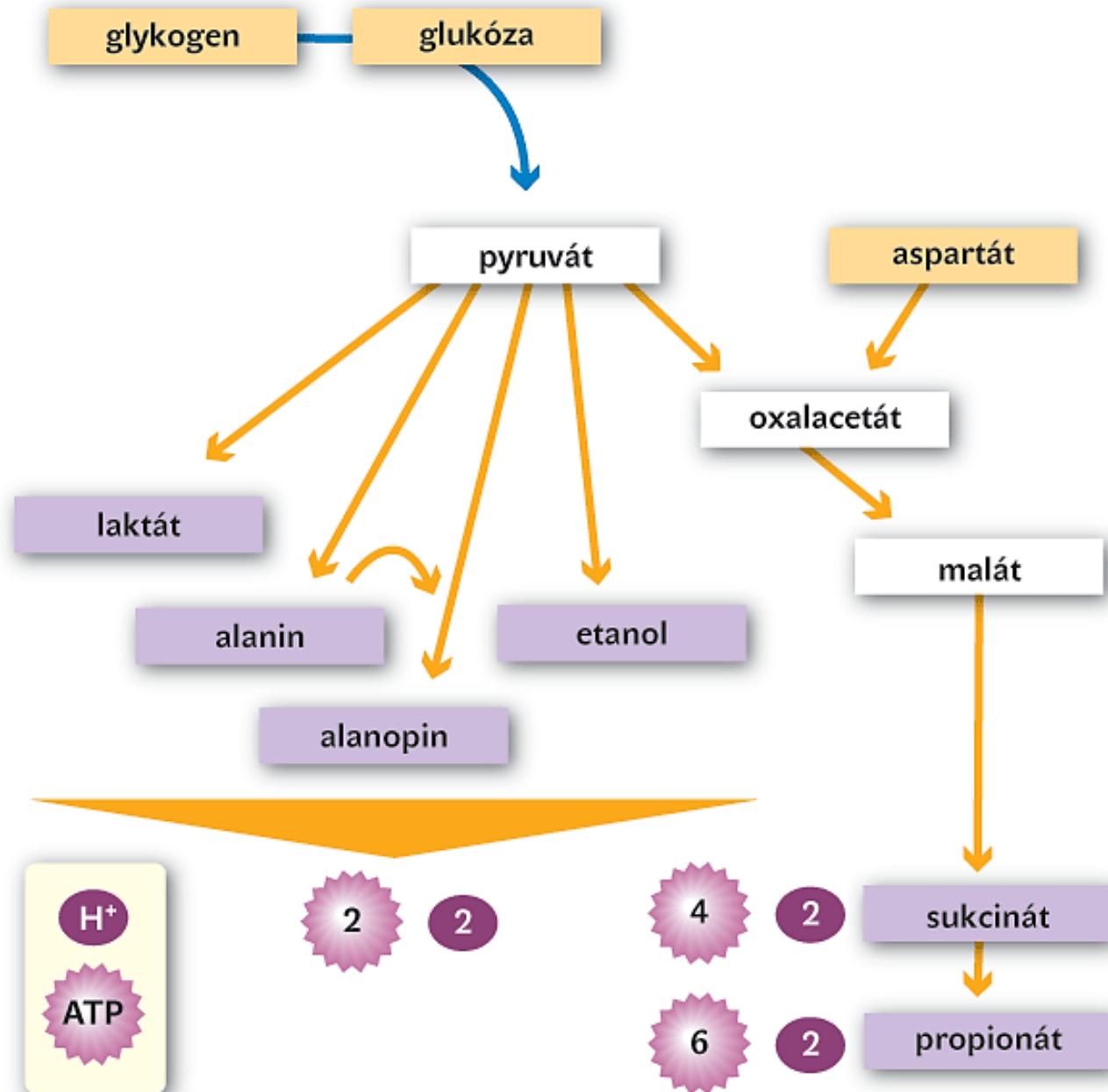
	Intermediates	Products	ATP
ALANINE	Pyruvate NADH/H ⁺ NH ₃	CO ₂ $\frac{1}{2}$ urea	18 3 -2 19
TRYPTOPHAN	Alanine Acetyl-CoA NH ₃	Formate CO ₂ , $\frac{1}{2}$ urea CO ₂ $\frac{1}{2}$ urea	0 19 30 -2 47
CYSTEINE	Pyruvate NH ₃	SO ₄ ²⁻ CO ₂ $\frac{1}{2}$ urea	1 18 -2 17
MEAT PROTEIN	Amino acids	4.11 CO ₂ 0.70 urea 0.034 SO ₄ ²⁻	22.2

I. na O₂ závislé – OXPHOS
(dominantní)

II. na O₂ nezávislé, alternativní
(relativně malé zastoupení)



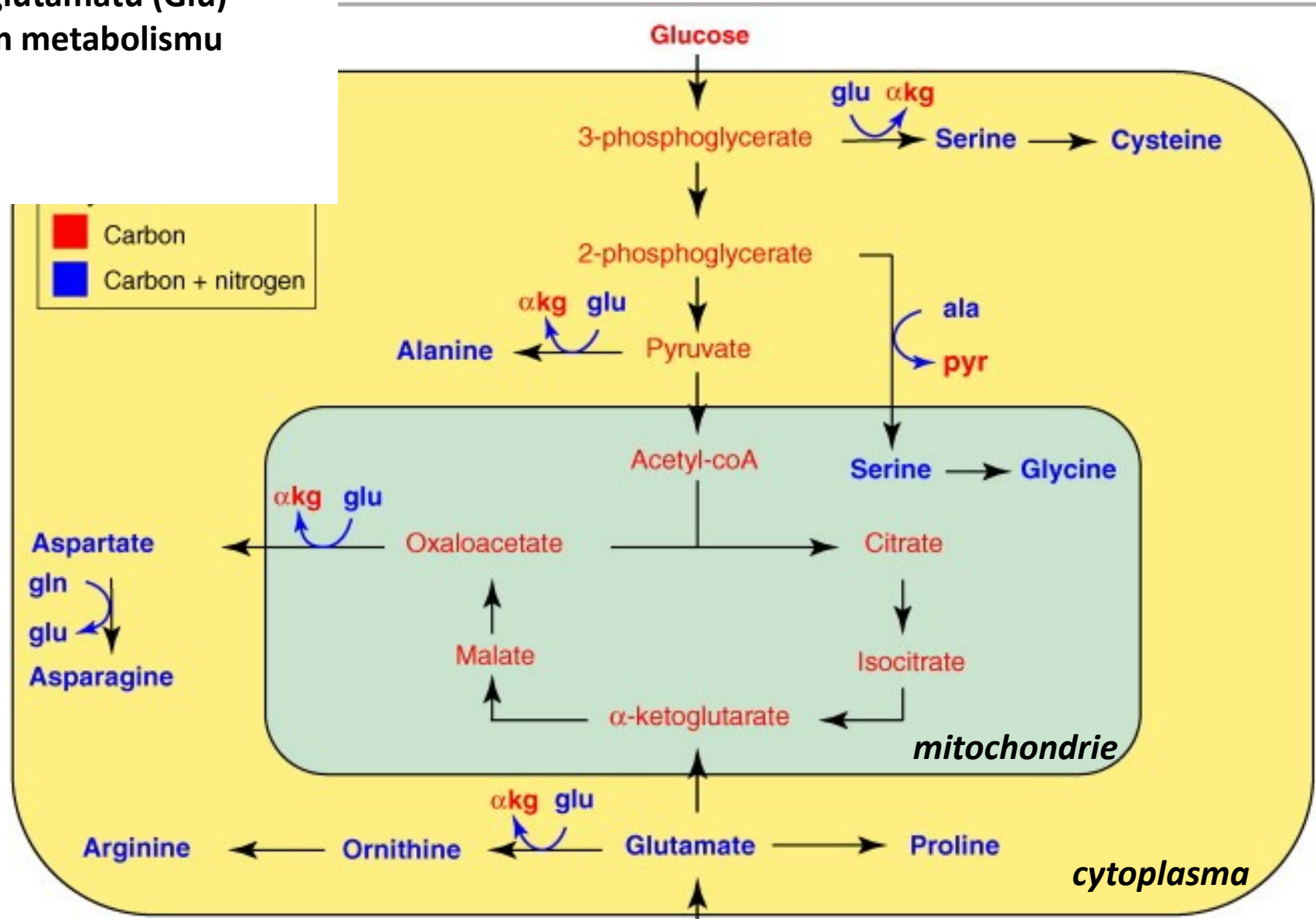
Zjednodušená sumarizace produktů anaerobní glykolýzy



H⁺ - redukované kofaktory

Alternativní přeměny jsou spojeny s utilizací NH_4^+

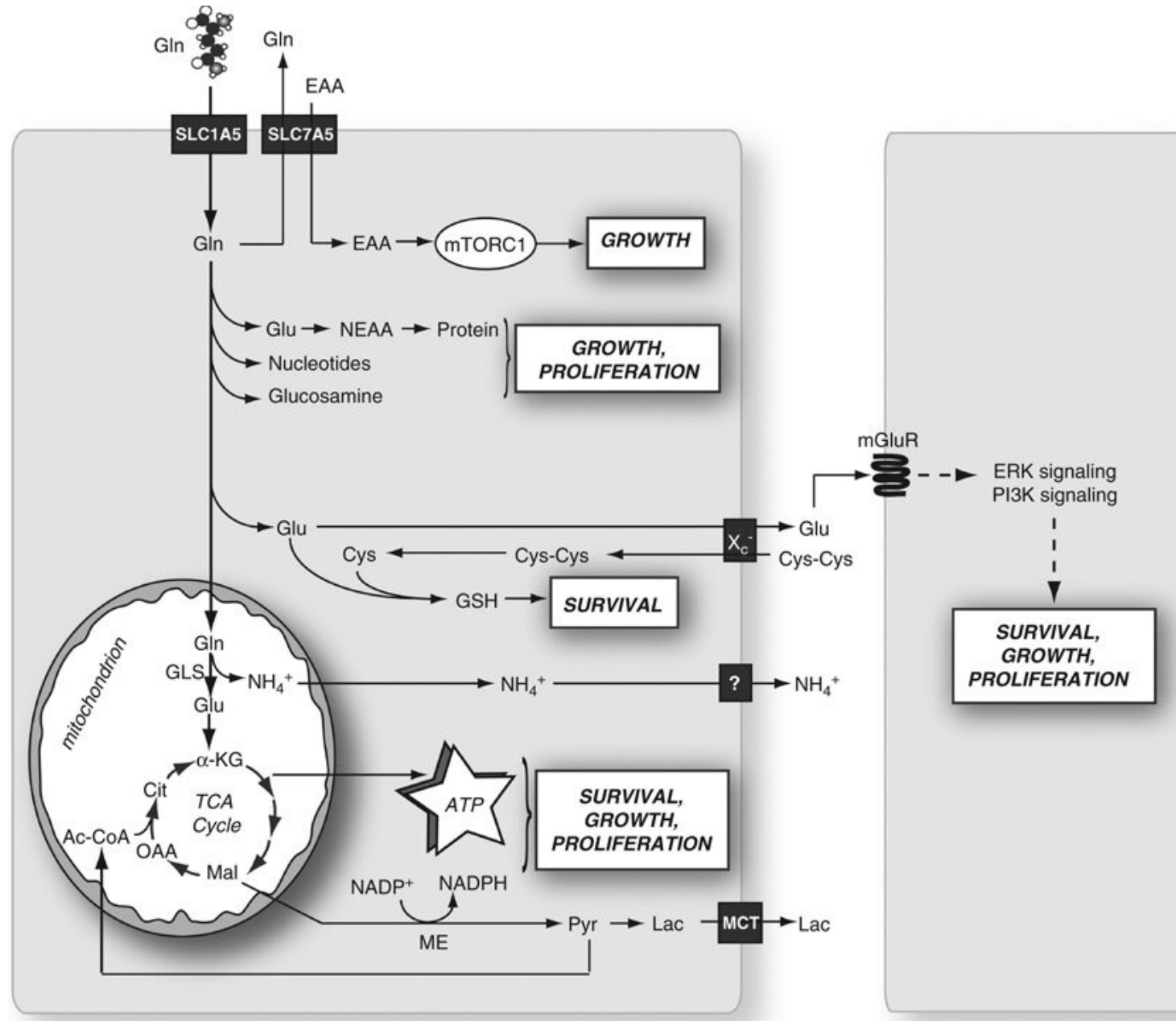
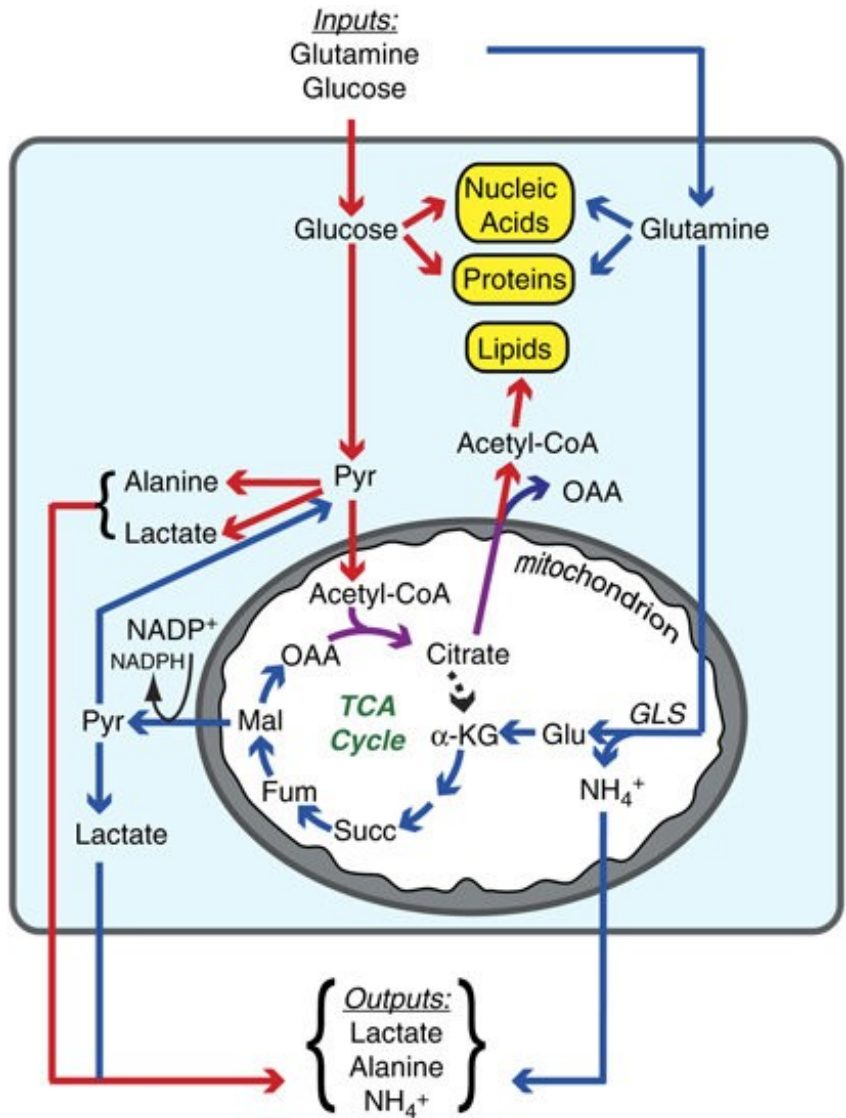
- Využití glutaminu (Gln) / glutamátu (Glu)
- Alternativy v energetickém metabolismu
- Syntéza AA
- Zpracování NH_4^+
- ...

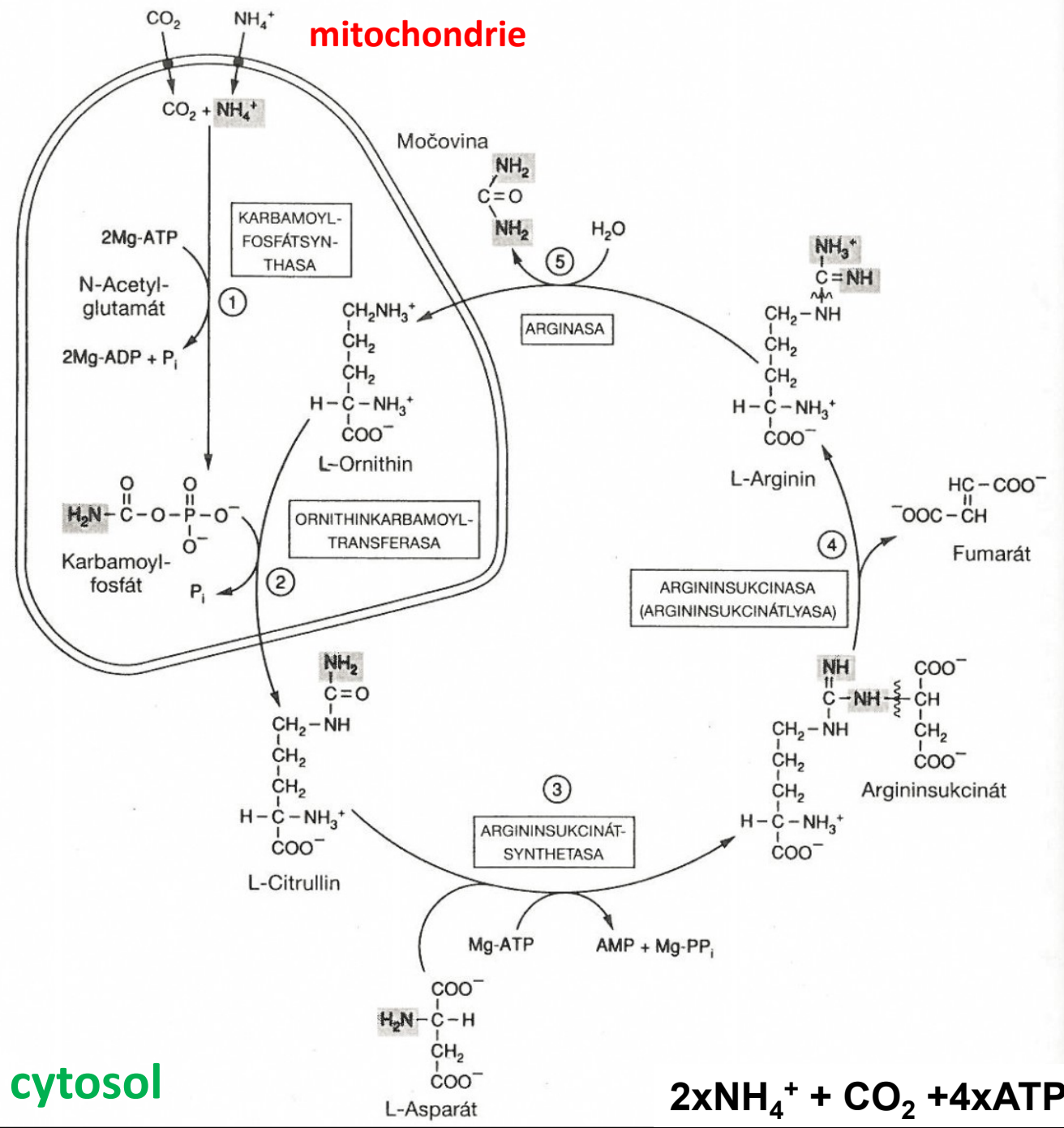


Gln – glutamin
 Glu – glutamát/kyselina glutamová

Sumarizace úlohy a možnosti využití glutaminu (Gln) v metabolismu buňky

- zdroj α -ketoglutarátu, alternativní tvorba ATP
- utilizace NH_4^+
- ...

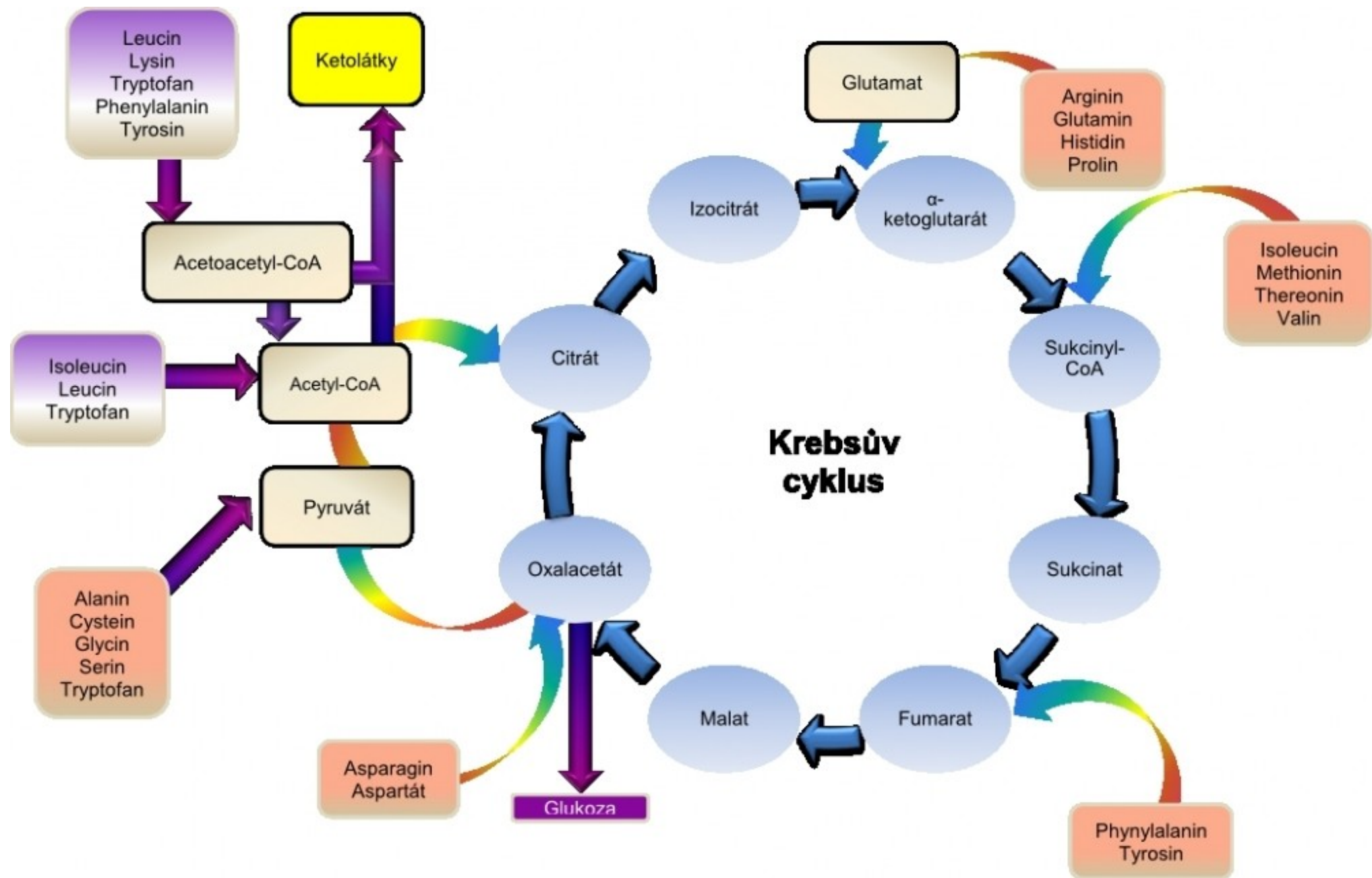




Ornitinový cyklus

- Odbourání NH_4^+ - energeticky náročné
- ⇒ Komplikace při sníženém energetickém metabolismu
- ⇒ Vázáno na mitochondrie

Duplikace předchozího + vznik ketoláték a glukósy z oxalacetátu



HYPOXIE ↓ **O₂**

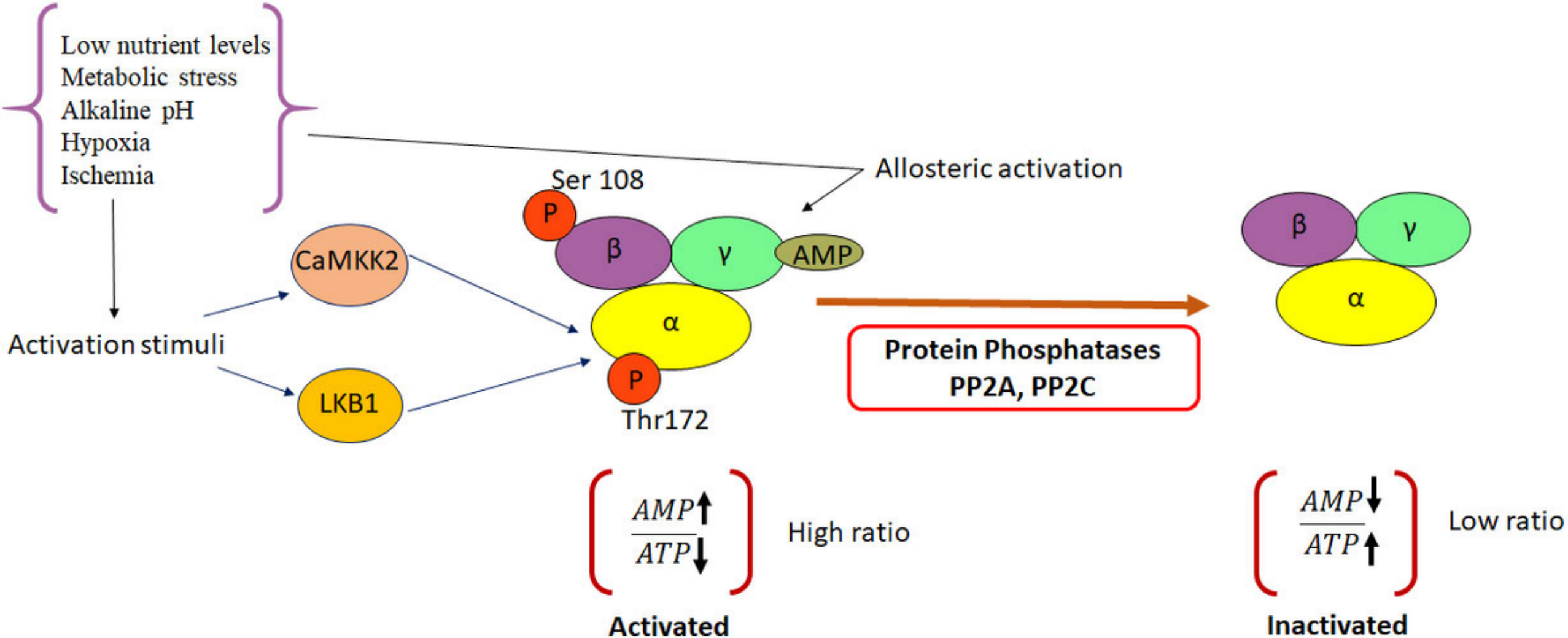


Zajištění chodu buňky vyžaduje přeměnu chemické energie spojenou:

- se s potřebou substrátů (glukóza, aminokyseliny, mastné kyseliny,...)
- s regenerací kofaktorů – NADH/NAD⁺, FADH₂/FAD, NADPH/NADP⁺
- s tvorbou ATP, GTP,...
- **se spotřebou O₂**
- s uvolněním finálních produktů (H₂O, CO₂, NH₄⁺, laktát, ketolátky, vybraných AA,...)
- se syntézou potřebných molekul
- ...

Energetický sensing poklesu O_2

Pokles O_2 pro OXPHOS => pokles ATP / nárůst AMP => aktivace **AMPK** (AMP-activated protein kinase)

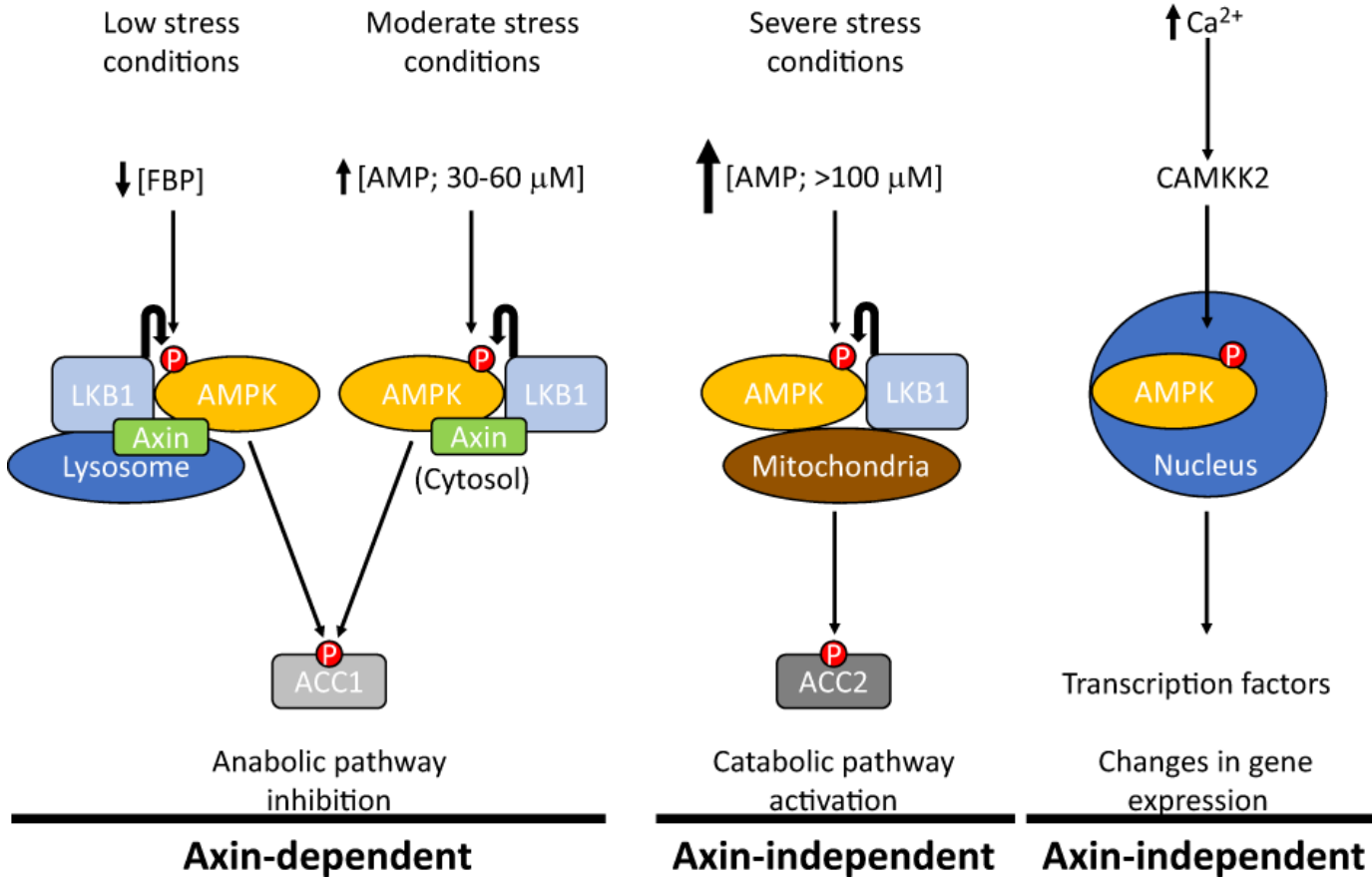


CaMKK2 - Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase

LKB1 – Liver kinase B1

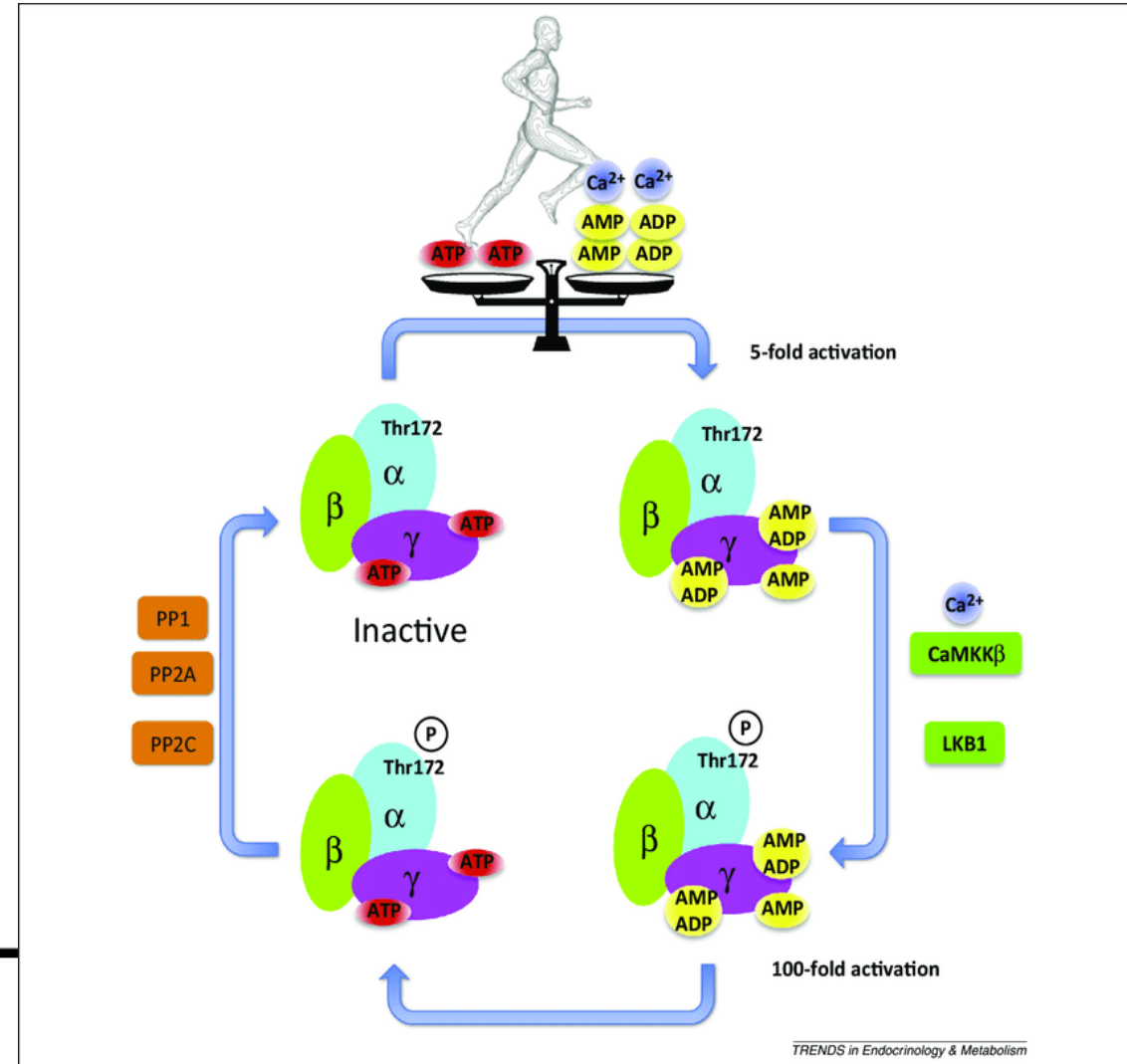
Aktivace AMPK v závislosti na intenzitě stresu

FBP - Fructose-1,6-biphosphate



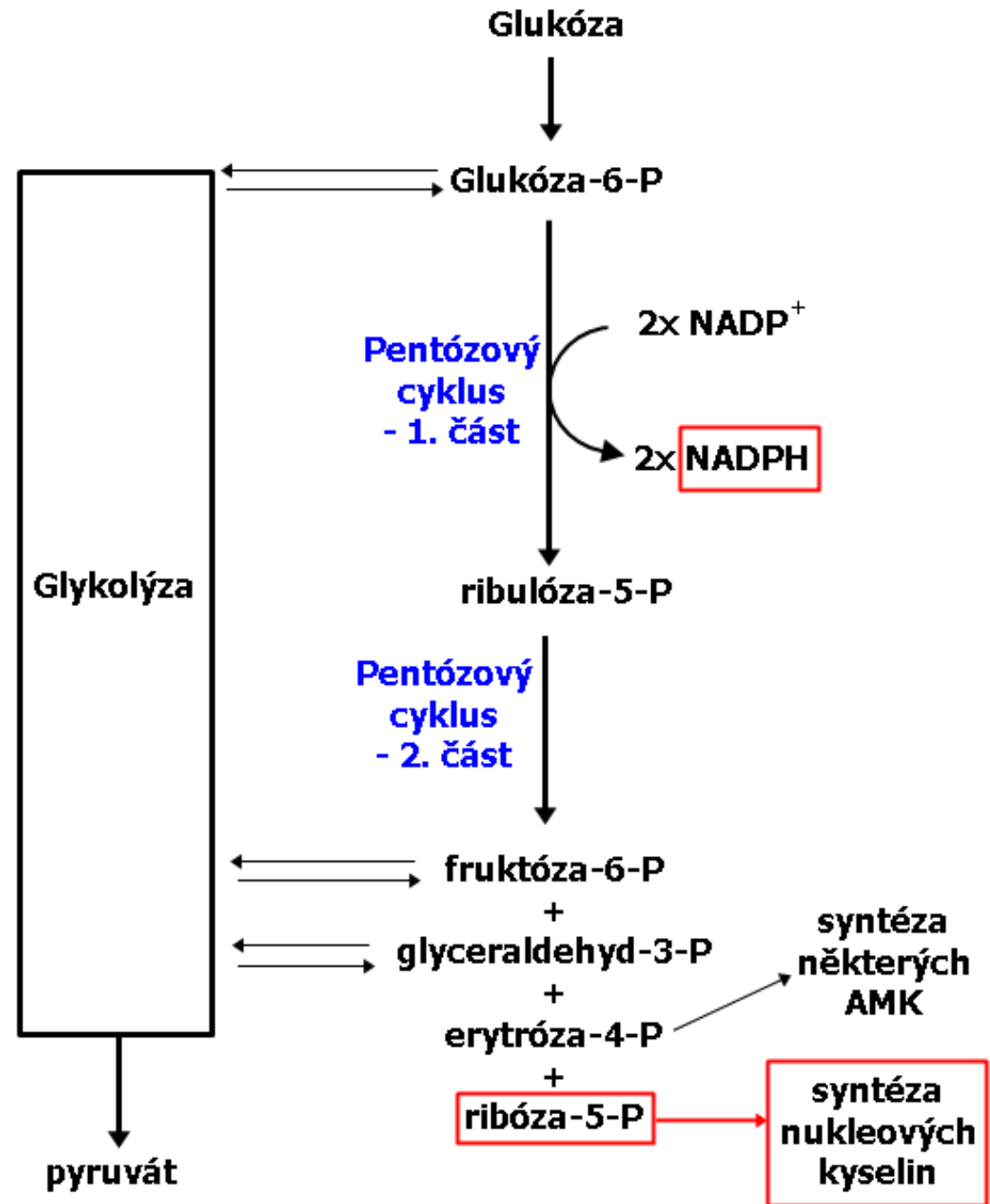
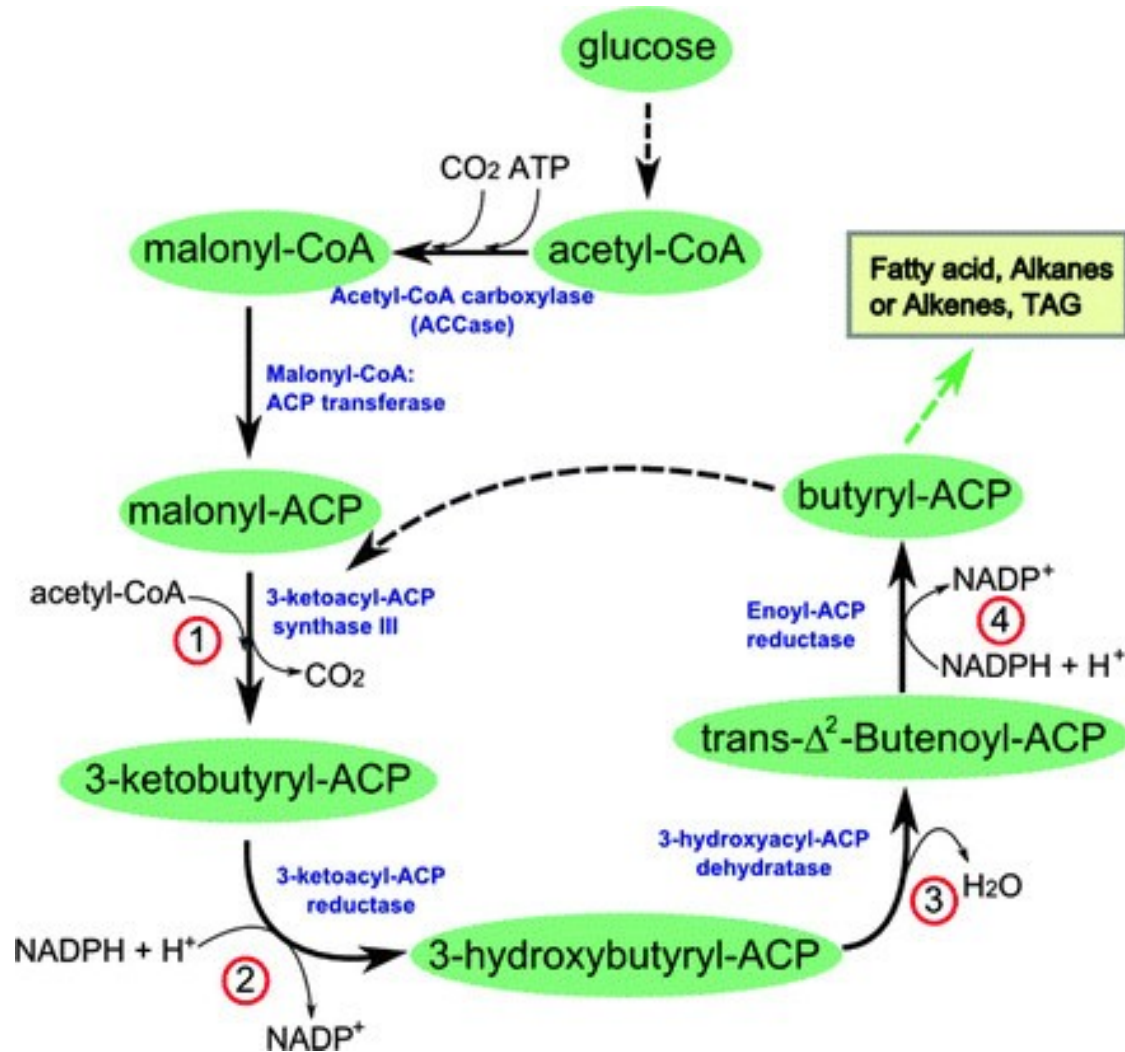
ACC - Acetyl-CoA carboxylase

(acetyl-CoA ⇒ malonyl-CoA, 1st krok v syntéza FA)

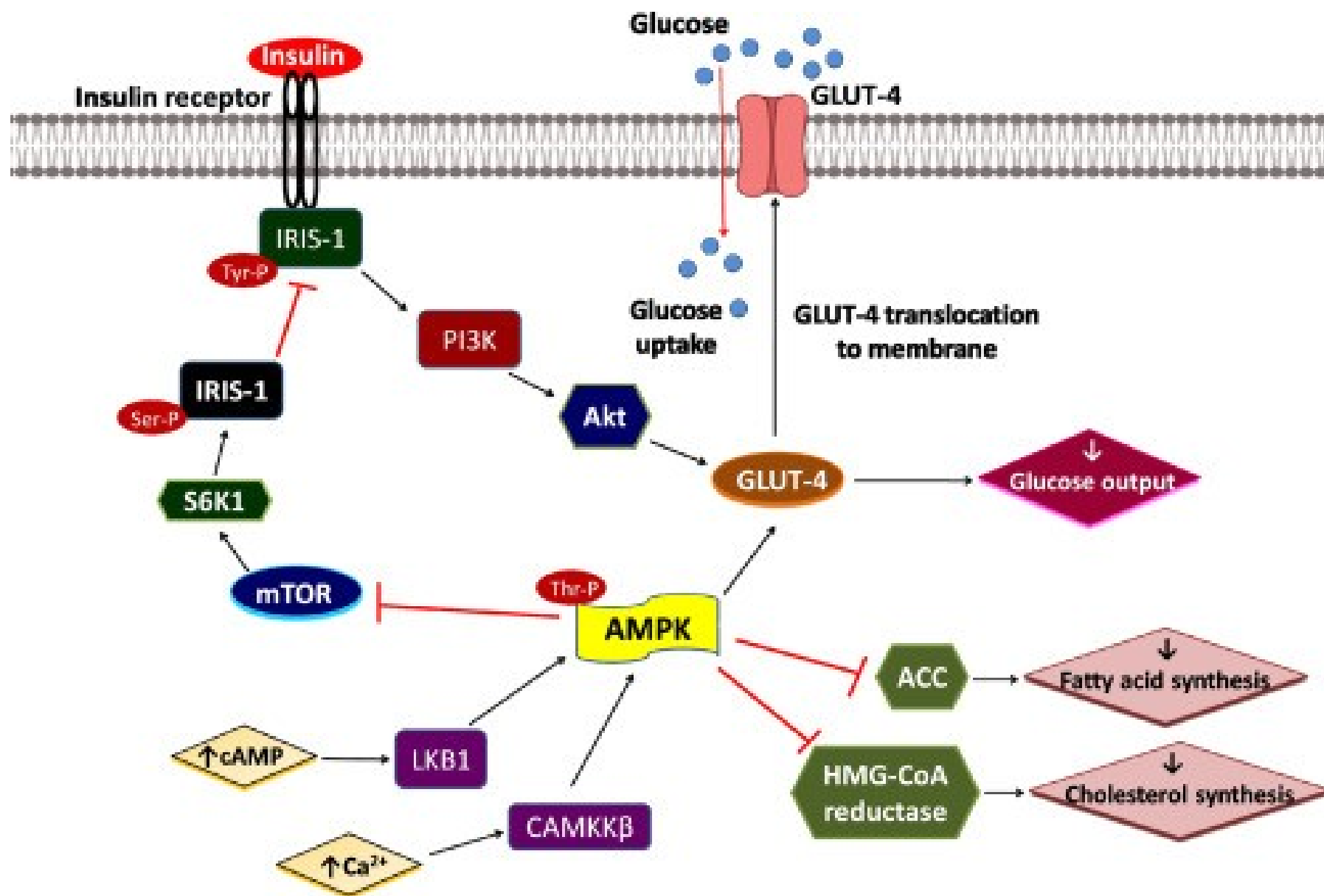


Syntéza lipidů a pentózový cyklus

- Význam acety-CoA
- Regenerace NADP⁺/NAD
- Syntéza nukleových kyselin

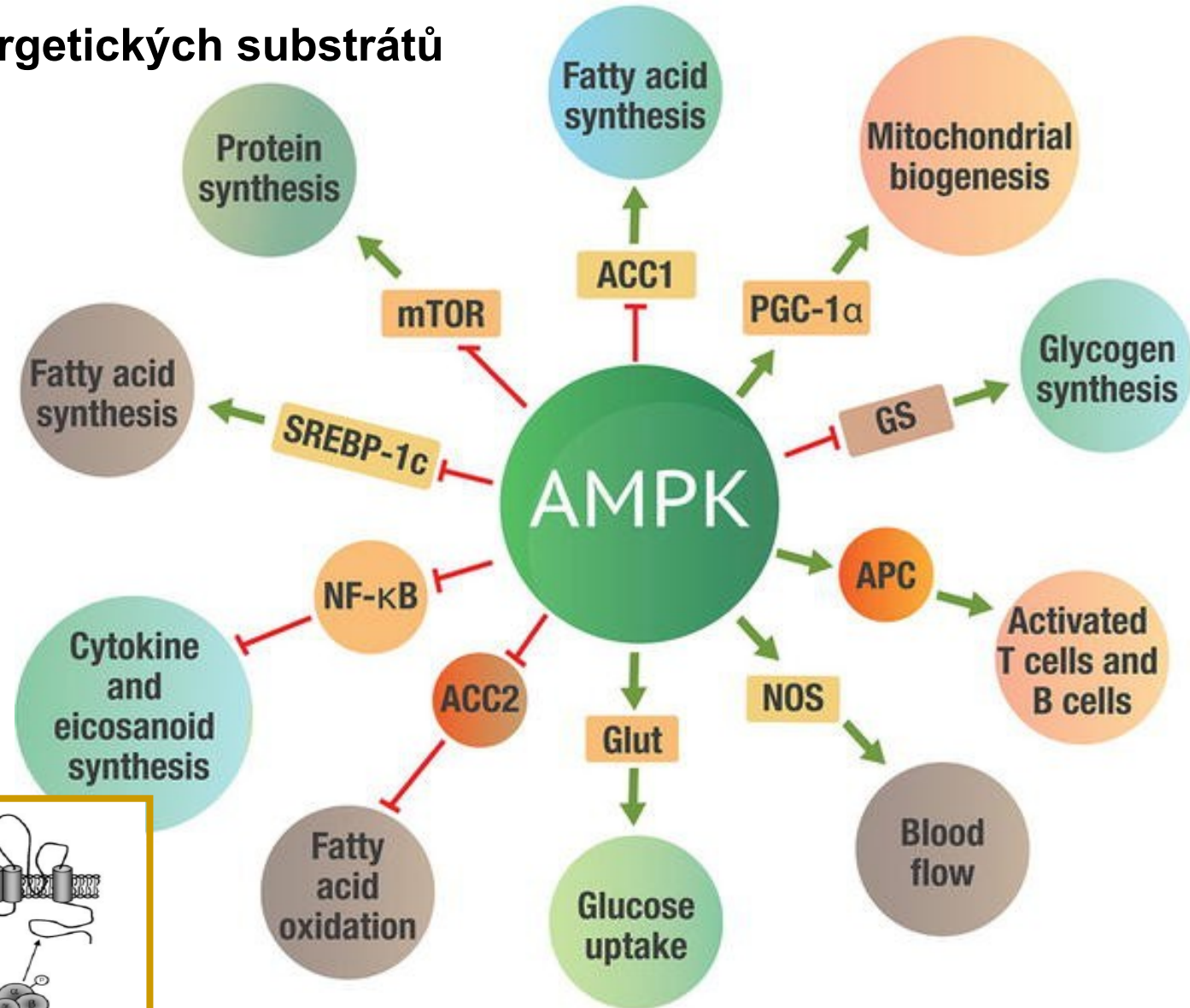
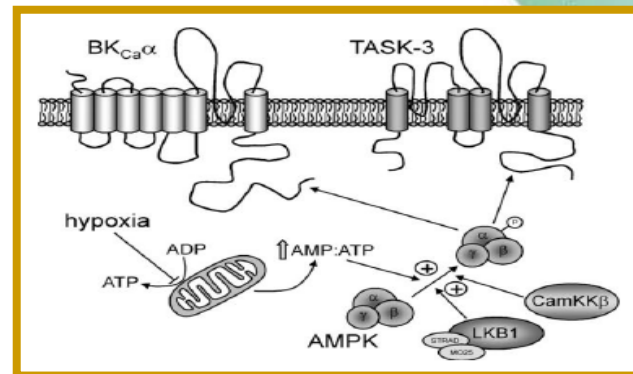
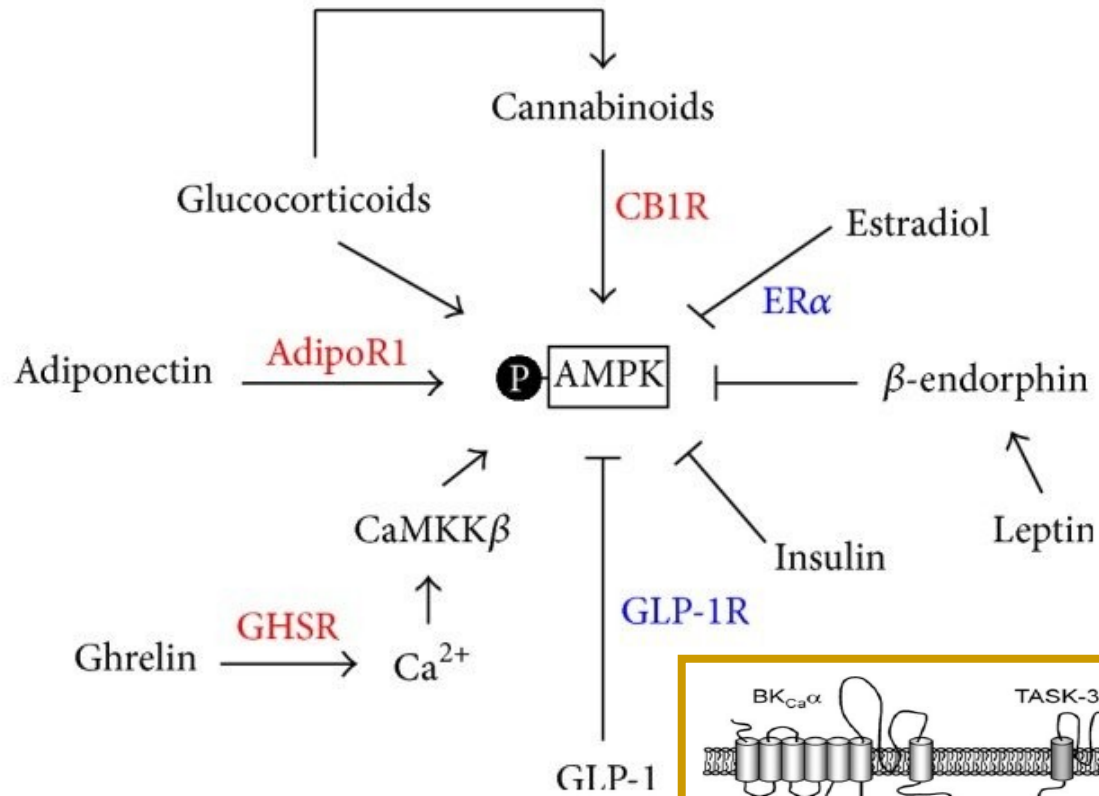


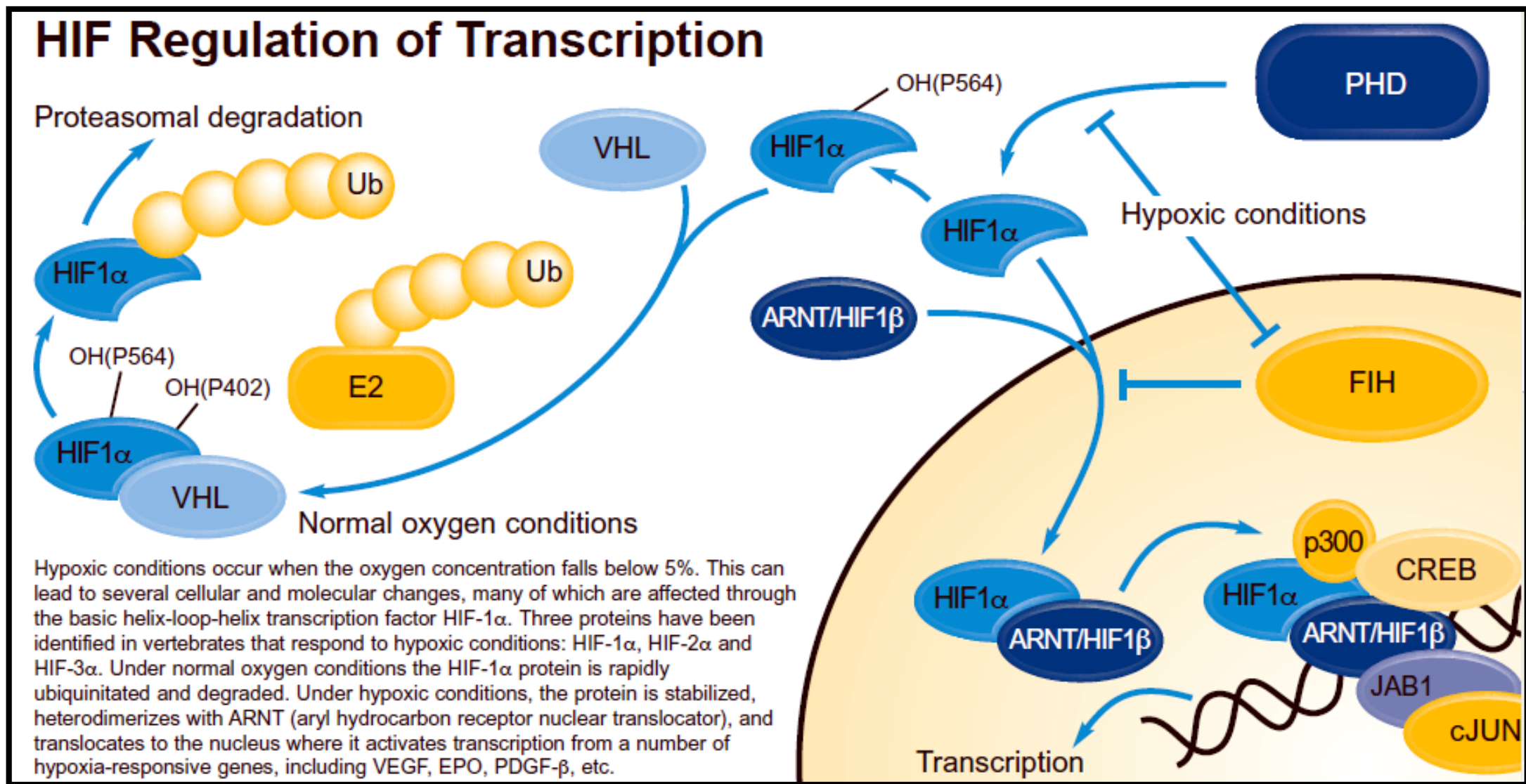
Aktivní AMPK zvyšuje uptake glukózy a potlačuje syntézu mastných kyselin



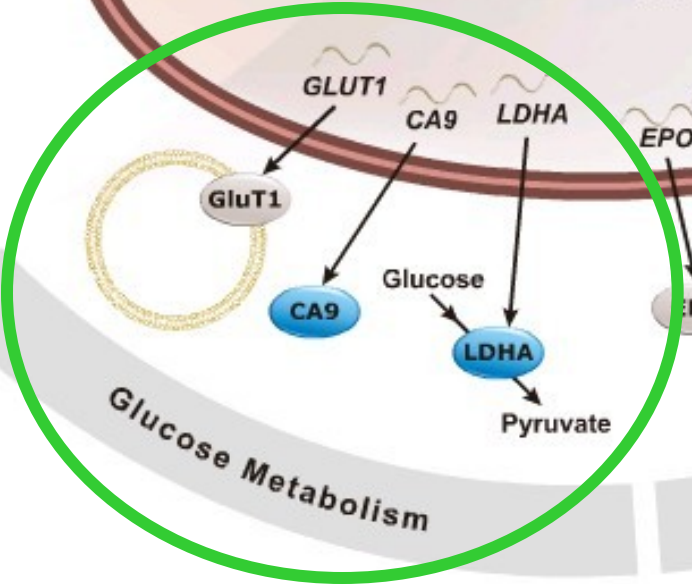
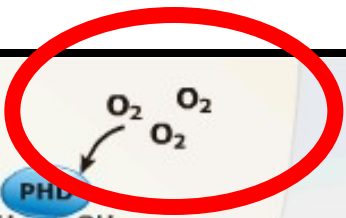
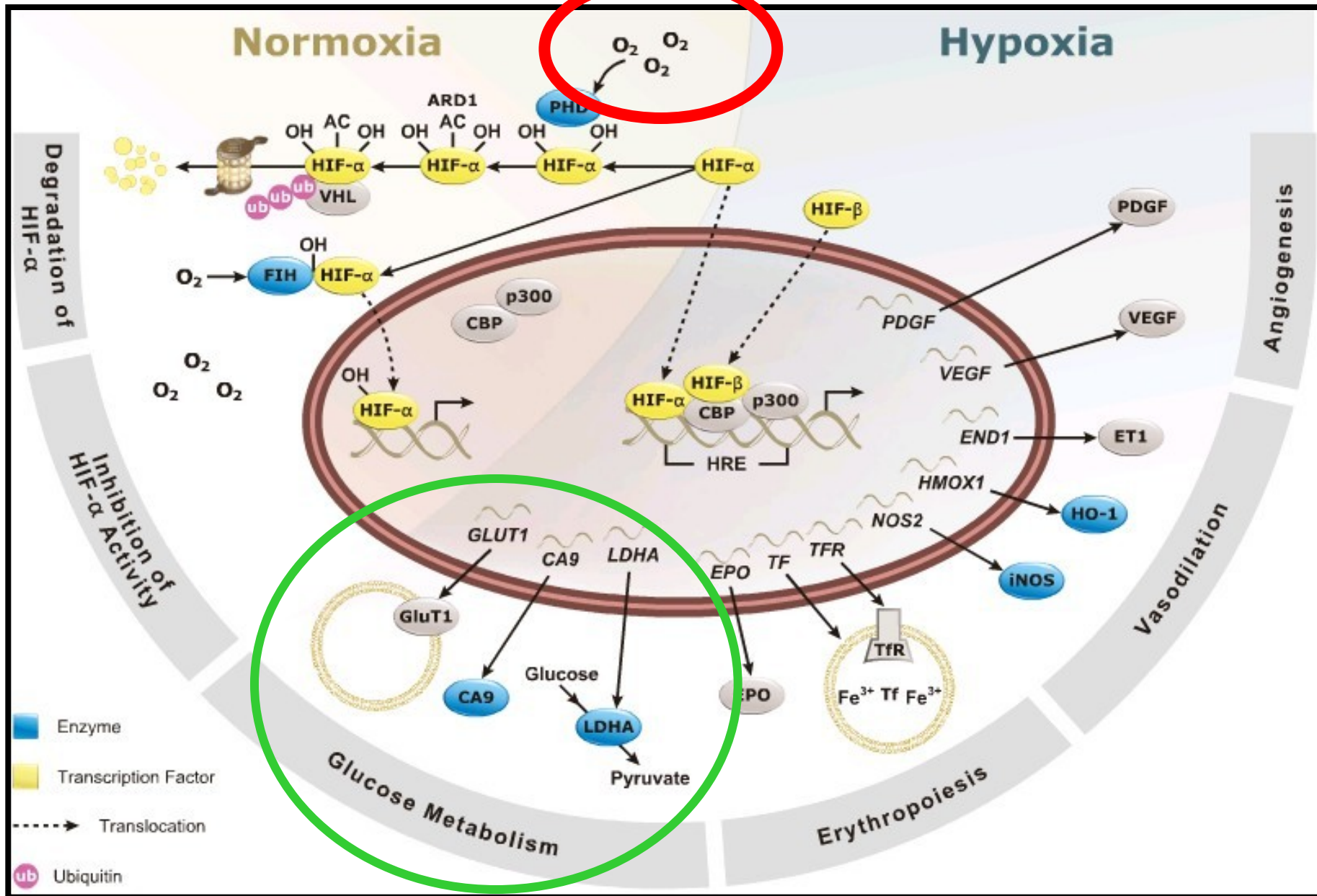
Další regulátory aktivity AMPK a jí regulované procesy

- obecně podpora tvorby ATP, uvolnění energetických substrátů
- Inhibice anabolických procesů / syntézy





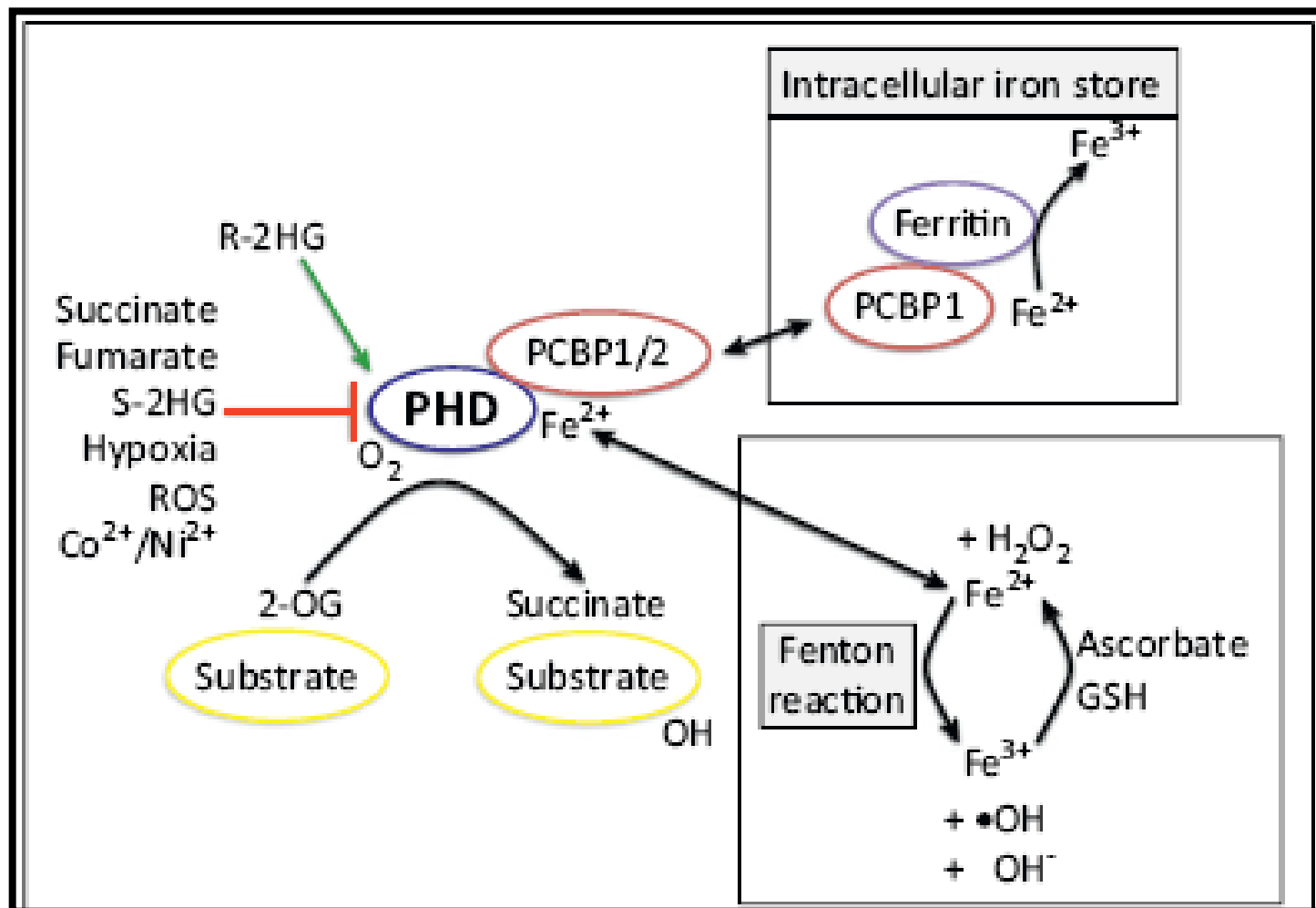
- jsou součástí obecné odpovědi na hypoxii
- jsou konstitutivně exprimovány
- přítomnost kyslíku indukuje jeho degradaci
- nedostatek kyslíku způsobuje jeho akumulaci



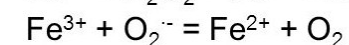
Prolyl hydroxylásy (PHD)

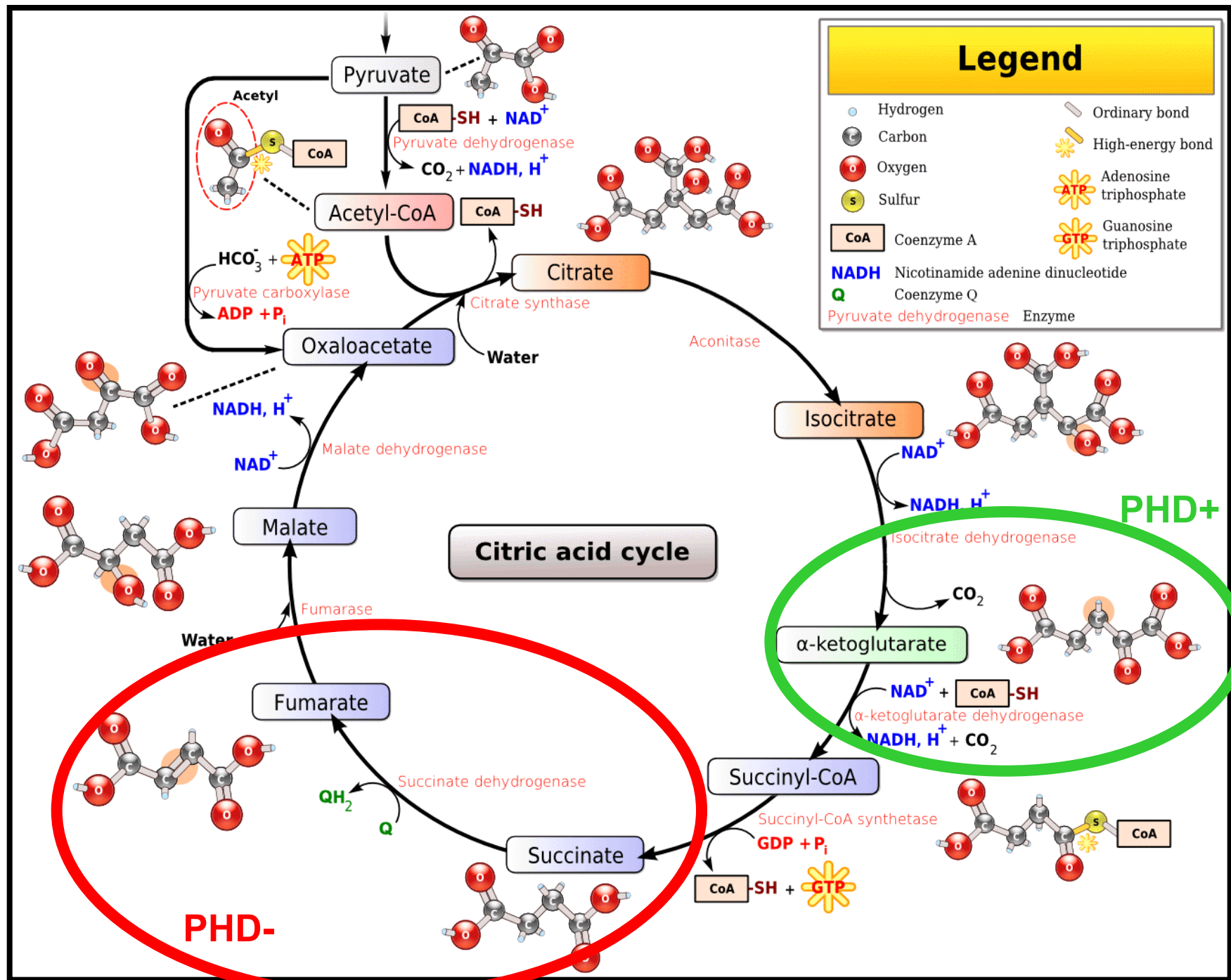
Asparagin hydroxylásy (FIH)

- sensory kyslíku a regulátory stabilizace HIF-1 α
- substráty α -ketoglutarát (2-oxoglutarát), O_2 , *kofaktor* Fe^{2+} , ...



Fentonova reakce



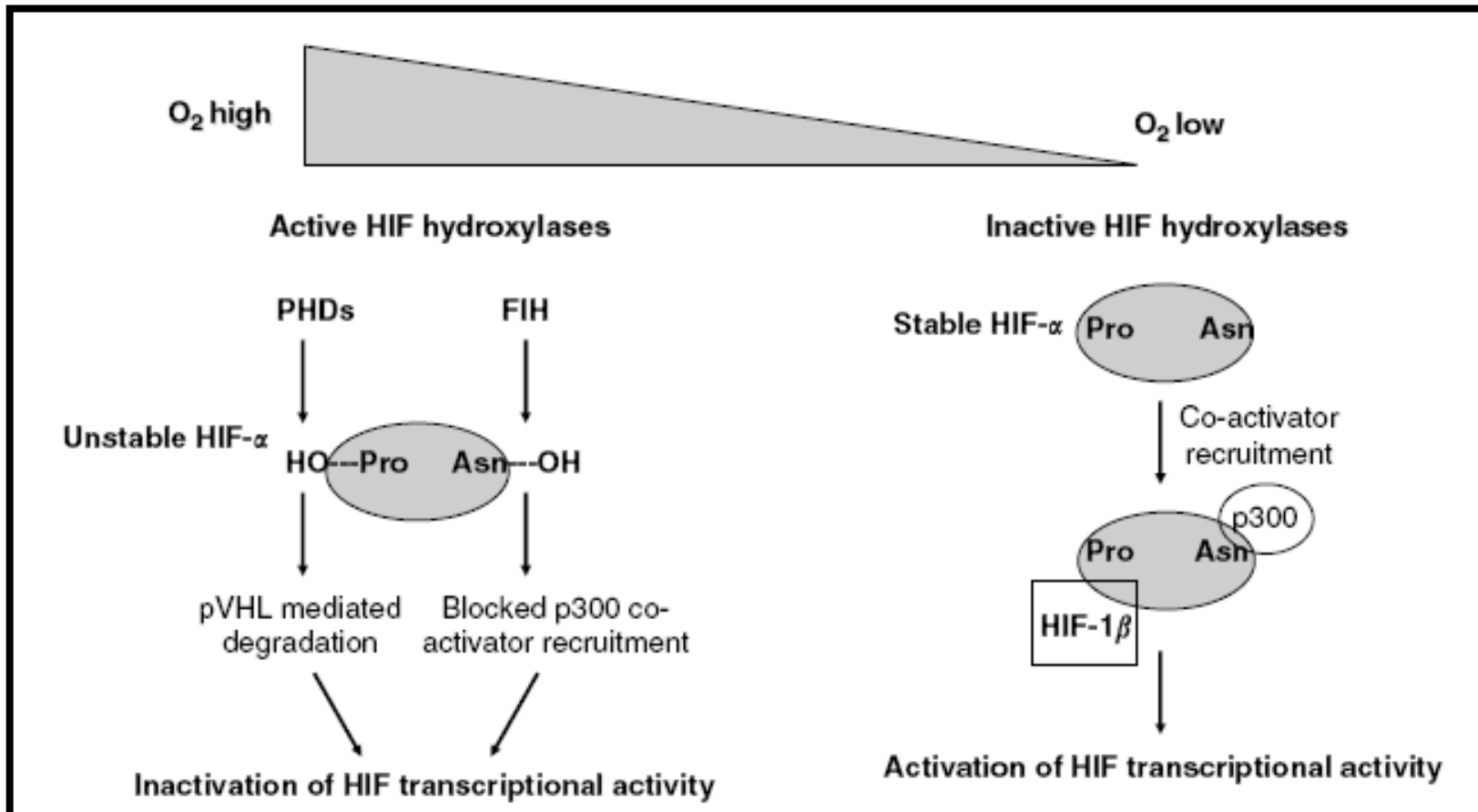


Regulace HIF

- všechny podjednotky HIF prakticky konstitutivní exprese
- regulace zejména degradací podjednotek HIF α
(- částečně i regulací transkripce)

Degradace HIF v přítomnosti O₂

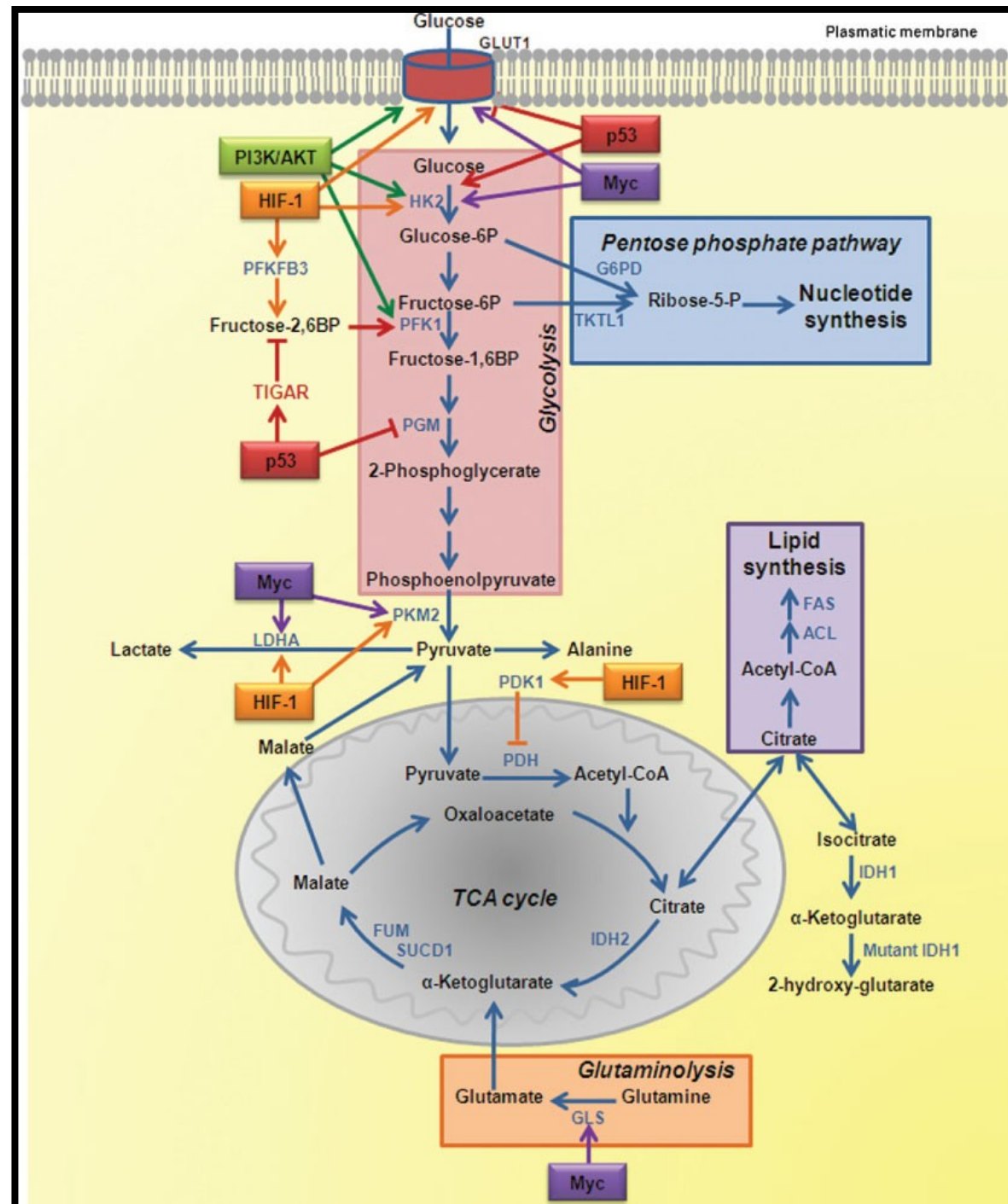
- hydroxylace prolyl hydroxylásami PHD, asparagin hydroxylázami FIH
- degradace v proteasomu zprostředkovaná pVHL faktorem (Von Hippel–Lindau tumor suppressor)

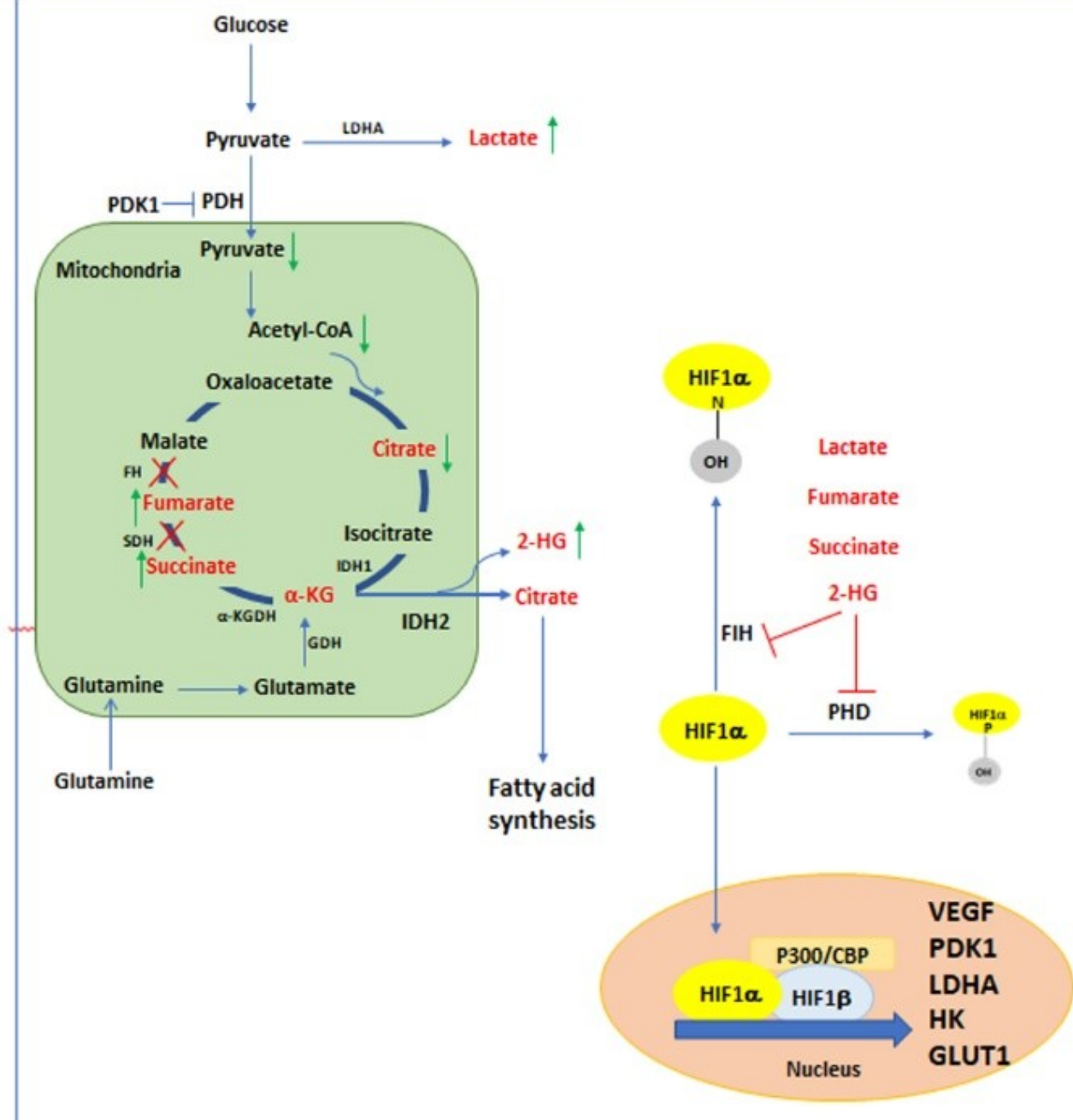
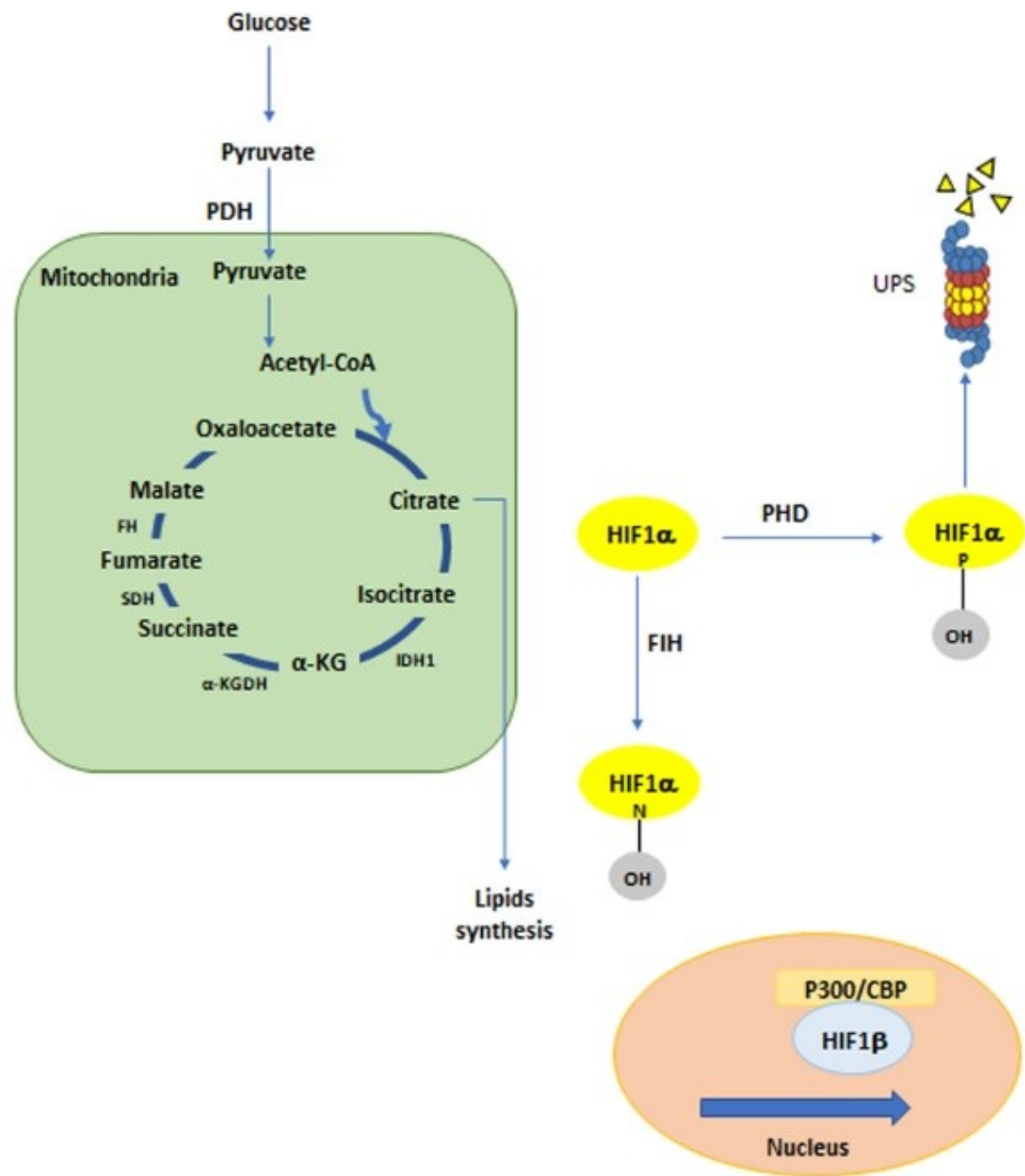


Podpora glykolýzy prostřednictvím HIF-1

- zvýšení exprese GLUT1,4
- zvýšení exprese enzymů glykolýzy
- inhibice přeměny pyruvátu na AcetylCoA

Glykolýza – substráty intermediální produkty
=> růst buněk
OXPHOS – energie => práce, produkce





Normoxia

Hypoxia/Pseudo-Hypoxia

HIF – hypoxií indukovaný faktor

HIF1 β (ARNT) / HIF1 α => **HIF1** (obecná buněčná odpověď na hypoxii)

- (-) exprese c-myc / cD1 => cell cycle arrest
- stabilizace NICD (Notch)/ β -cat (Wnt) => (+) glykolýza
- (+) glykolýza (PDK, Glut1/3, LDHA, HK,..)
- (+) MTC4 (eflux laktátu)
- (-) mitochondrie = (-) oxid. fosforylace (-) ROS
-

/ HIF2 α => **HIF2** (částečně buněčně specifické, EPO)

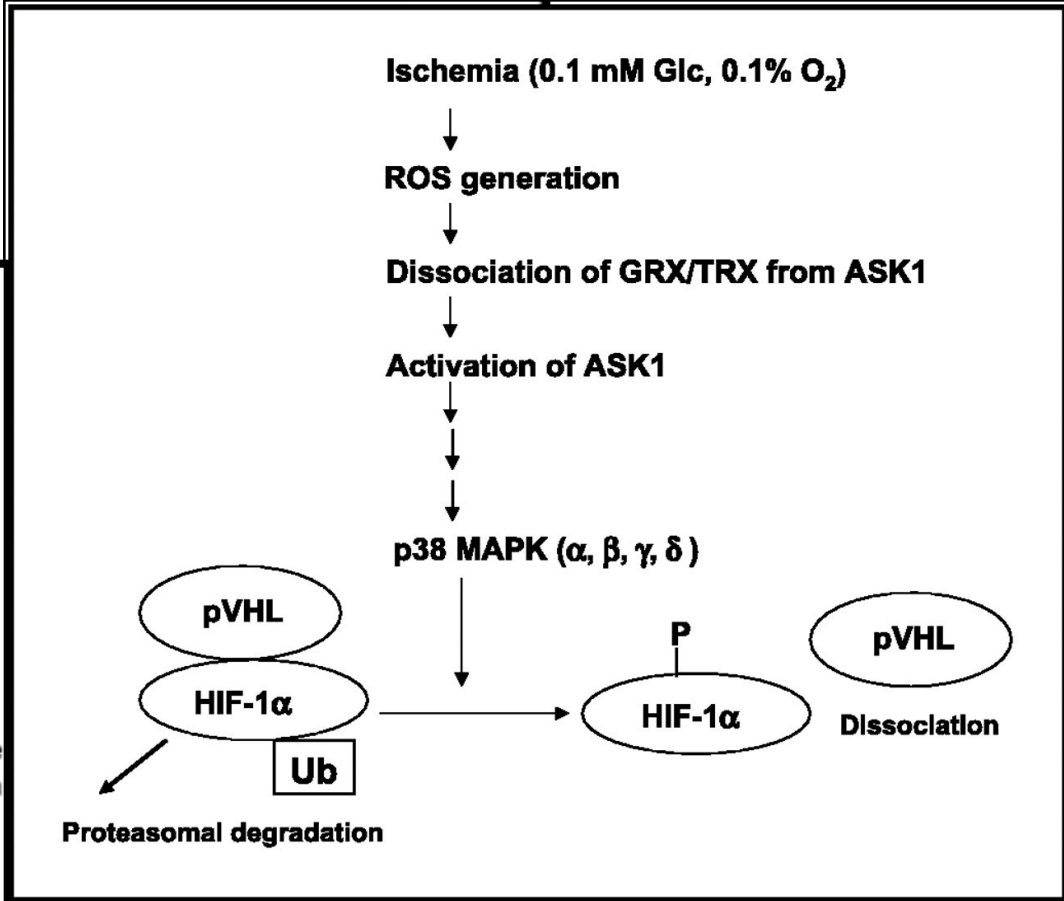
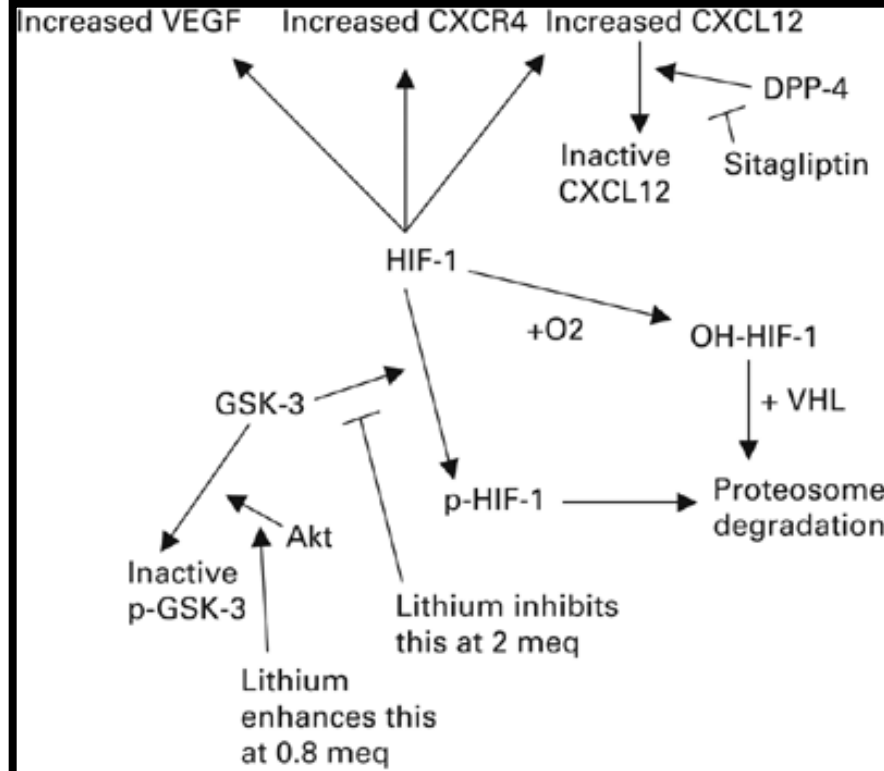
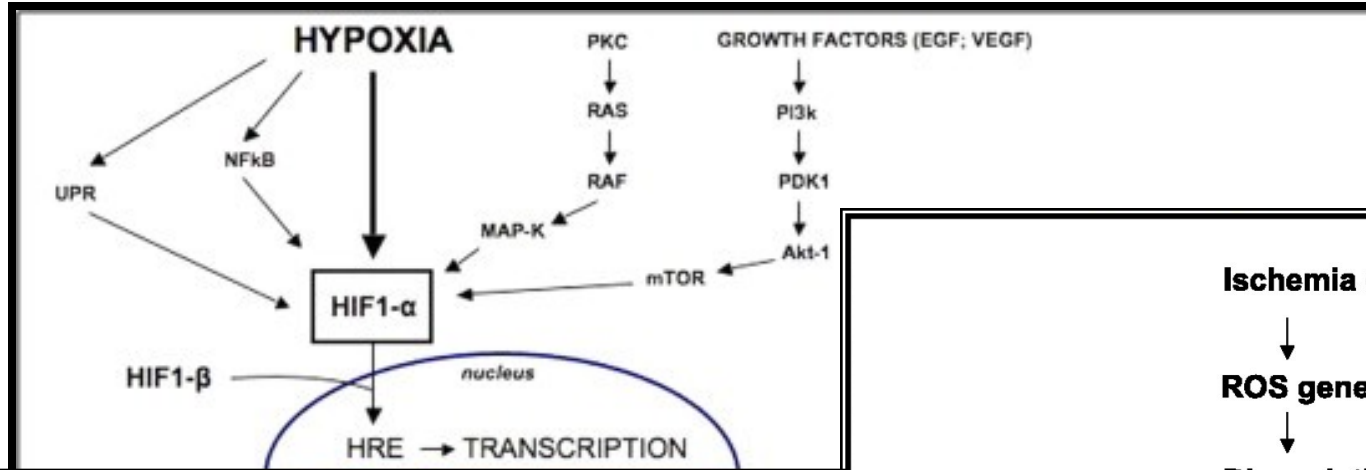
(EPAS1)

- podpora buněčného cyklu (+) exprese c-myc / cD1
- syntéza FA
- ...

/ HIF3 α => **HIF3** (kompetuje s HIFa, buněčně specifické)

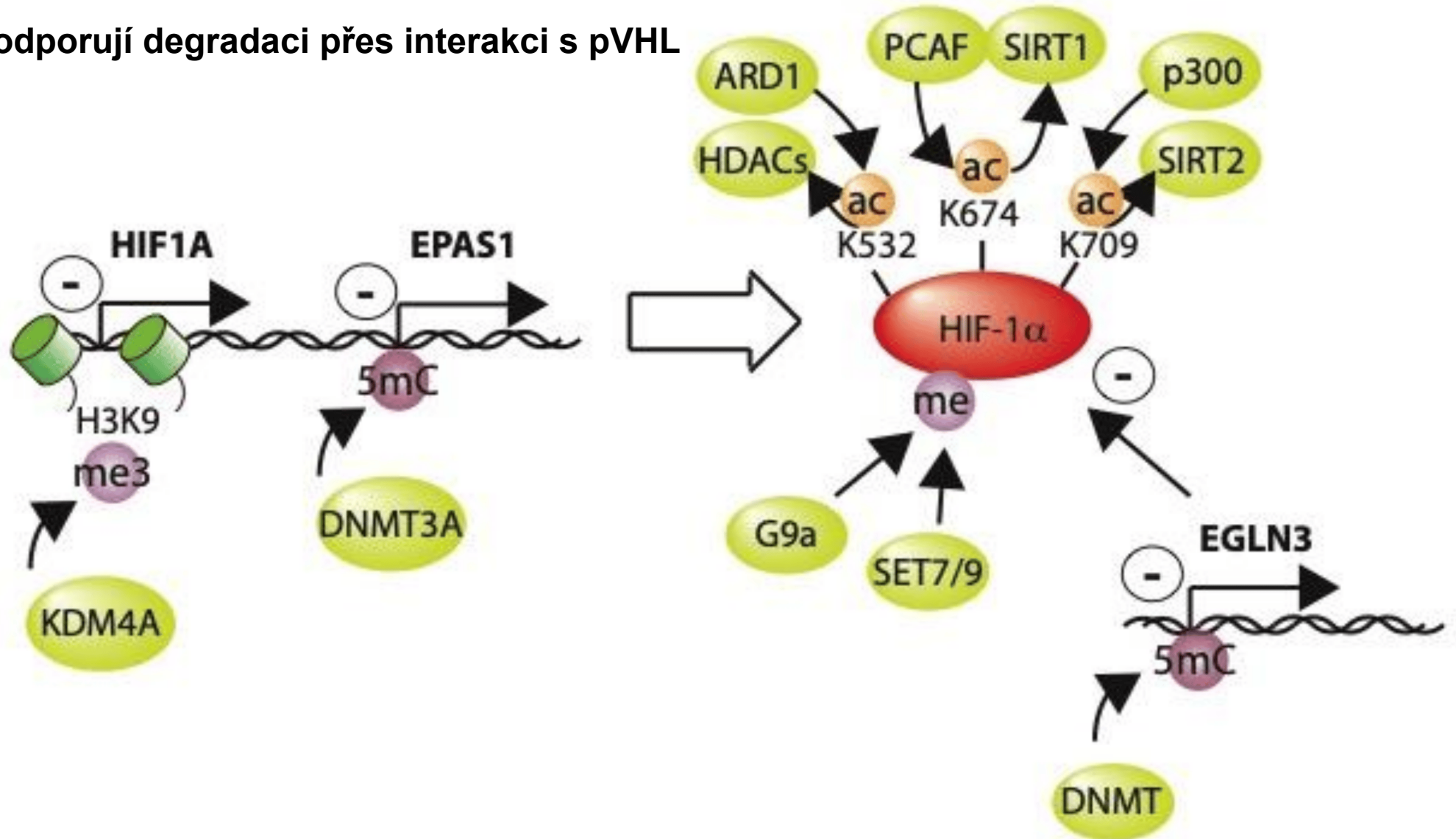
- inhibitor akce HIF (?)
- ...

Stabilita a transkripční aktivita HIF je také regulována dalšími postranlačními modifikacemi včetně fosforylace (vazba na buněčné signalizace)



Expres a stabilita HIF-1 α jsou regulovány i metylací a acetylací, jak na DNA tak proteinové úrovni

- Acetylace protein podporují degradaci přes interakci s pVHL

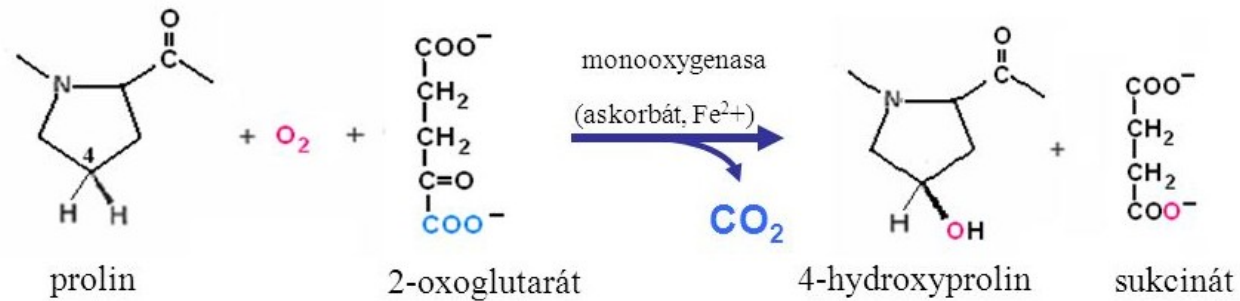


Příklady dalších partnerů a substrátů PHD

Activating transcription factor 4	ATF4	PHD1/3	Binding	Negative regulation of transcription factor activity
Human precursor RNA processing 19	hPRP19	PHD3	Binding	Inhibition of cell death
Paired box gene 2	Pax2	PHD3	Hydroxylation (?)	Negative regulation of transcription factor activity
Sprouty homolog 2	Spry2	PHD1/2/3	Hydroxylation	Negative regulation of Sprouty 2-mediated inhibition of FGF-induced ERK1/2 activation ^a
TCP-1 ring complex ^a	TRiC	PHD3	Binding	Protein folding (?); activity (?)
Osteosarcoma amplified 9	OS-9	PHD2/3	Binding	Enhanced hydroxylase activity
A-kinase (PRKA) anchor protein 12	AKAP12	PHD2	Binding (?)	Enhanced association of HIF-1 α and PHD2
Mitogen-activated protein kinase organizer 1	Morg1	PHD3	Binding	Enhanced hydroxylase activity
Inhibitor of growth protein 4	ING4	PHD2	Binding	Enhanced hydroxylase activity
Iron-only hydrogenase-like protein 1	IOP1	PHD2	Binding (?)	Enhanced hydroxylase activity (?)
Melanoma antigen gene protein-A11	MAGE-11	PHD2	Binding	Decreased hydroxylase activity
Cerebellar degeneration-related protein 2	Cdr2	PHD1	Binding	Enhanced repression of HIF
Myogenin	Myogenin	PHD3	Hydroxylation	Stabilization of myogenin protein
Kinesin-like protein 1B β	KIF1B β	PHD3	Hydroxylation (?)	Induction of apoptosis
Large subunit of RNA polymerase II	Rbp1	PHD1/2	Hydroxylation	Activation of Rbp1 and tumor growth promotion
β (2)-Adrenergic receptor	β (2)AR	PHD3	Hydroxylation	Regulation of receptor degradation
Human homolog of the <i>Caenorhabditis elegans</i> biological clock protein CLK-2	HCLK2	PHD3	Hydroxylation	Promotes DNA damage response
Cysteine synthase like-1	CYSL-1	EGL-9	Binding	Inhibition of Egl-9 in hypoxia
Phospho-diesterase 4D	PDE4D	PHD2	Binding; hydroxylation	Regulation of intracellular cAMP levels

Další příklady významu O₂ a hydroxylace

Hydroxylace prolinu v kolagenu



Skorbut (kurděje)

Nedostatek kyseliny askorbové → nedochází k hydroxylaci

Nemůže docházet ke vzniku příčných můstků

Značná část abnormálního kolagenu je degradována v buňce

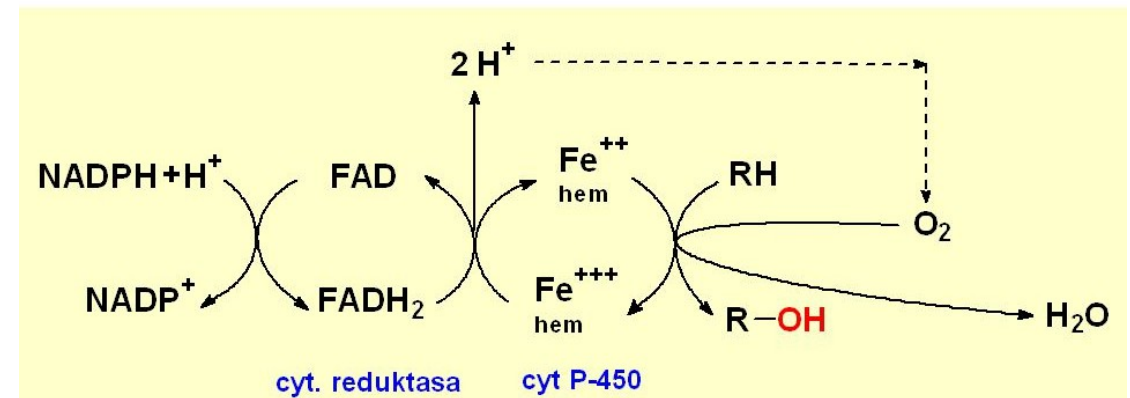
Krvácivost, uvolnění zubů, špatné hojení ran, praskání jizev apod.

Jazyková poznámka

askorbová odvozeno z:

α- (ne, anti) + *skorbut*

Hydroxylace systémem cytochromu (součást detoxikace)



MITOCHONDRIE x HYPOXIE

Zralejší mitochondrie => víc ATP

=> víc ROS (reaktivní kyslíkové radikály)

=> poškození DNA

=> peroxidace lipidů, deregulace signálních drah

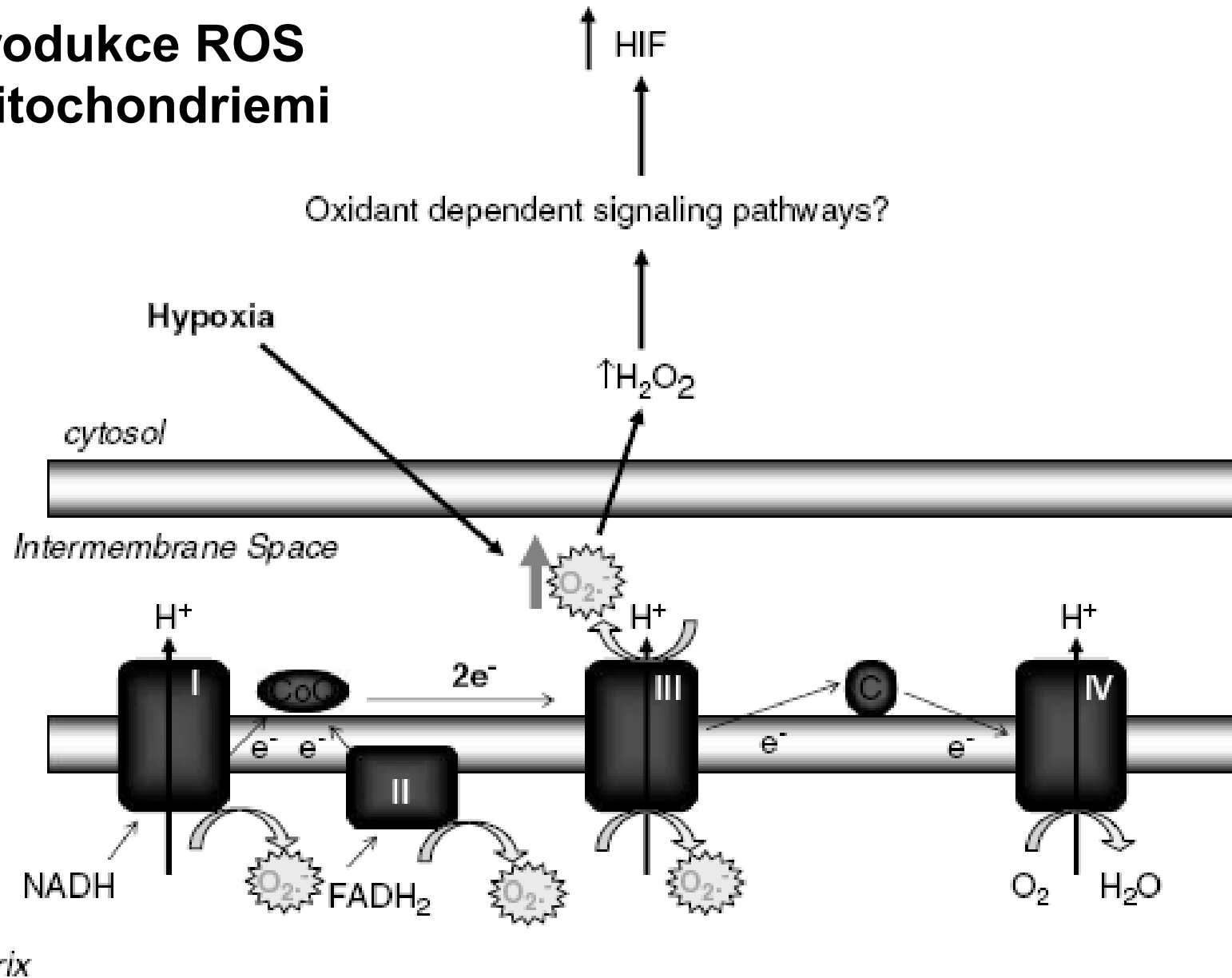
HYPOXIE => stresované mitochondrie (bez O₂ a Acetyl-CoA)

=> přechodně víc ROS (=> stabilizace HIF1)

=> přechodně akumulace fumarátu a sukcinátu

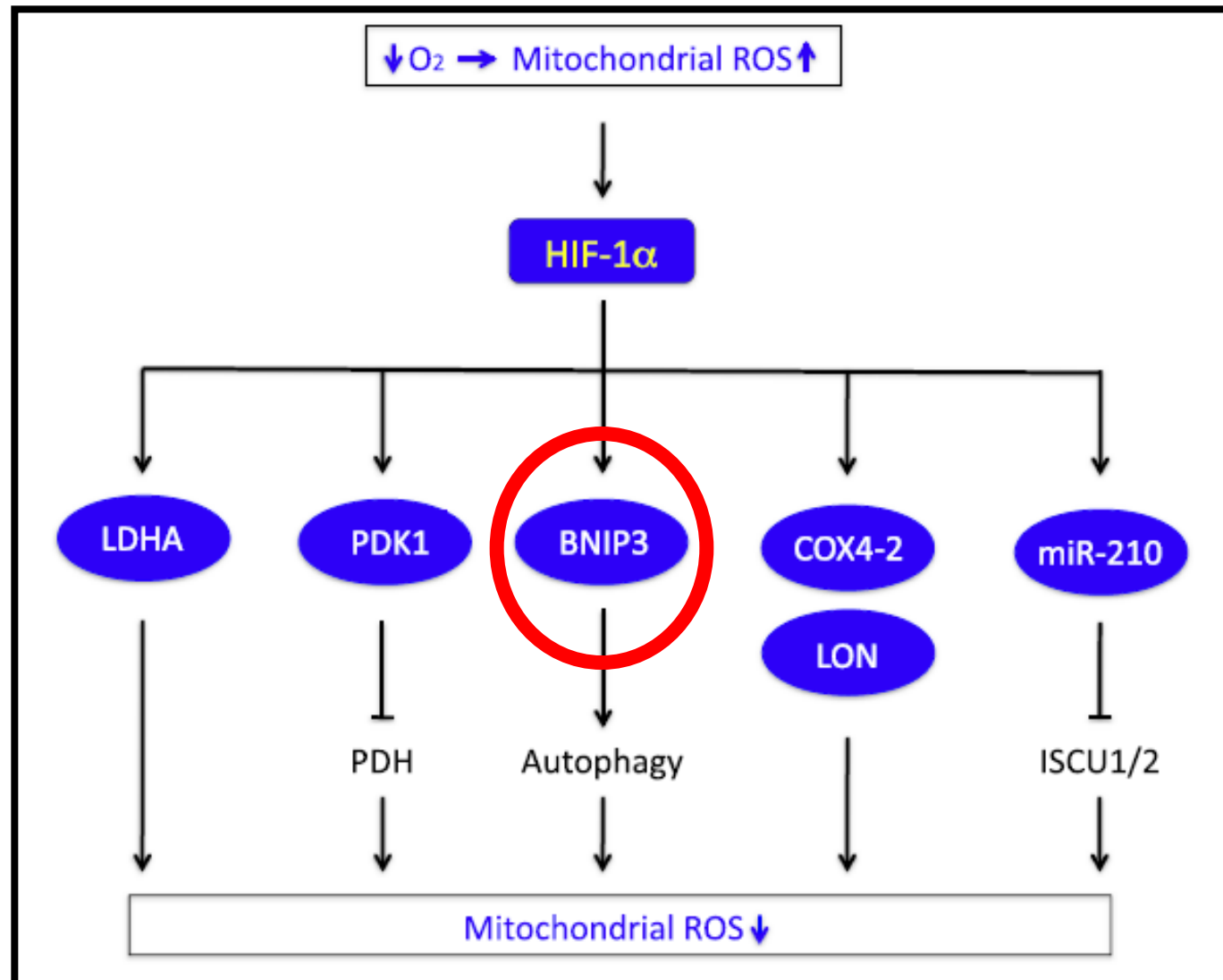
(=> inhibice PHD => stabilizace HIF1)

Produkce ROS mitochondriemi



HIF1 - indukuje autofagii mitochondrií

- potlačuje biogenezi mitochondrií => snížení ROS
- potlačuje maturaci mitochondrií

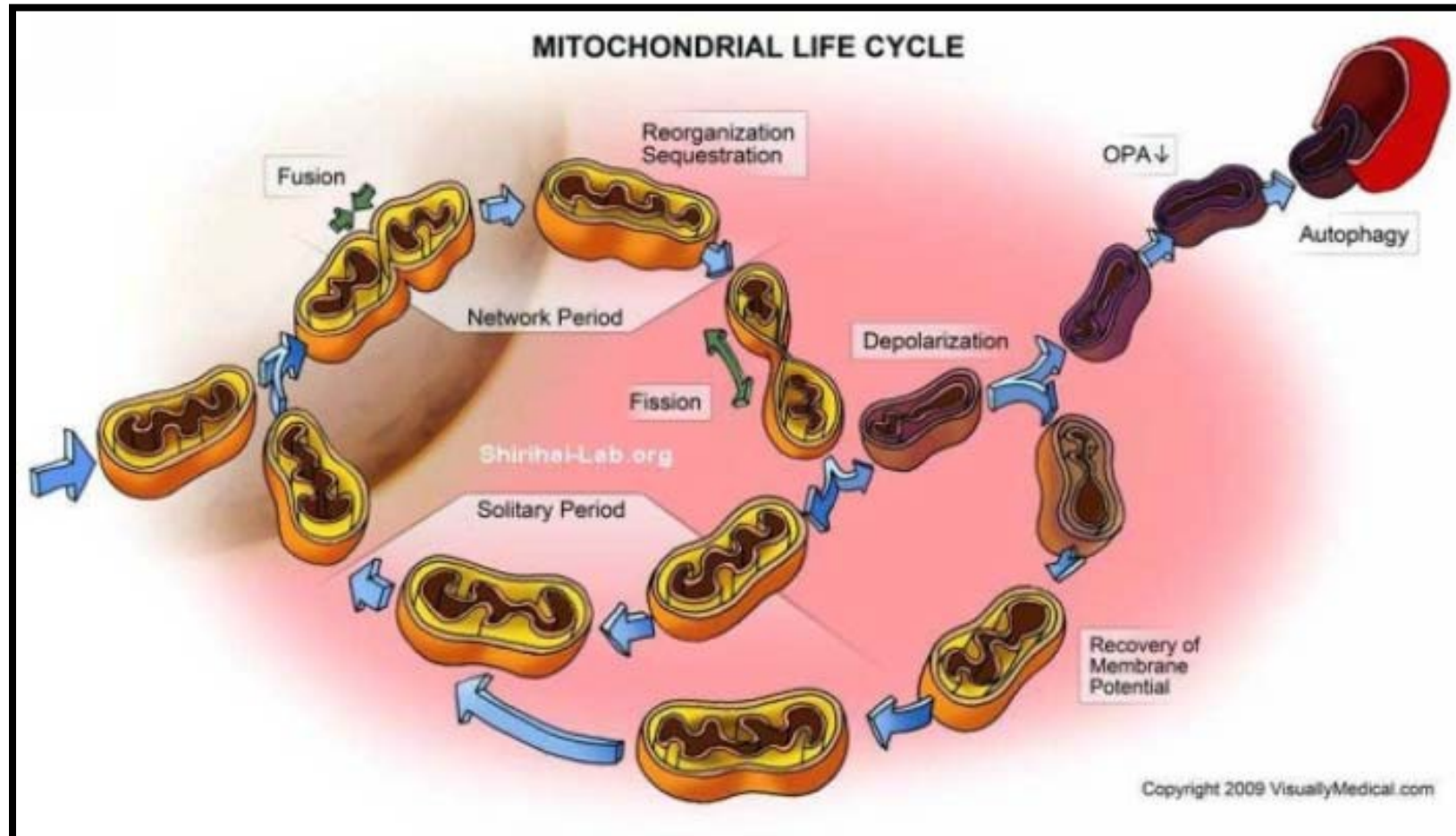


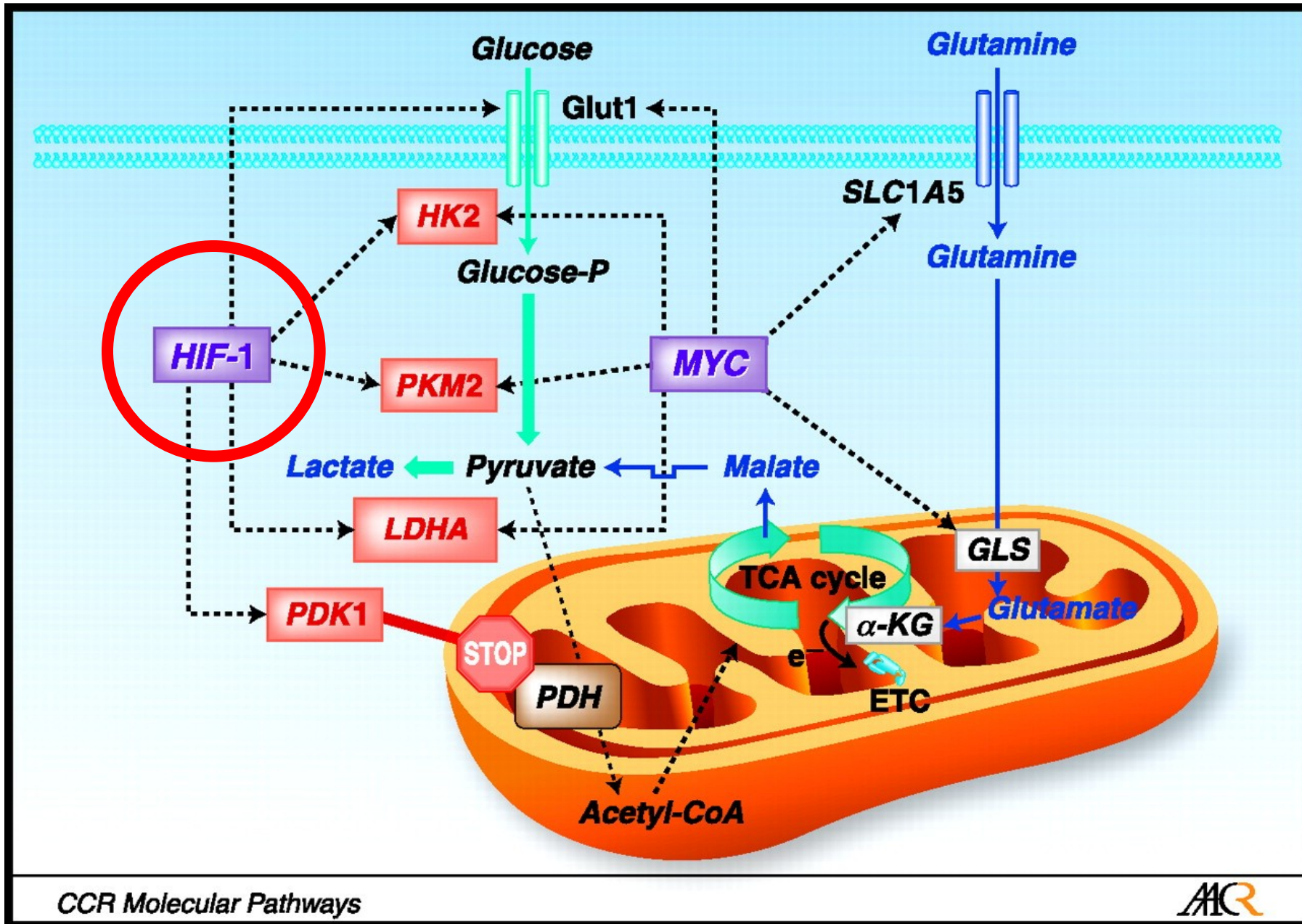
Na buněčné úrovni je množství a maturace mitochondrií regulována:

A) Aktuální dostupností kyslíku – PHD / HIF

- > částečně i ochrana před ROS
- > hospodárnost systému

B) Anabolické pochody / syntéza – AMPK, PHD / HIF





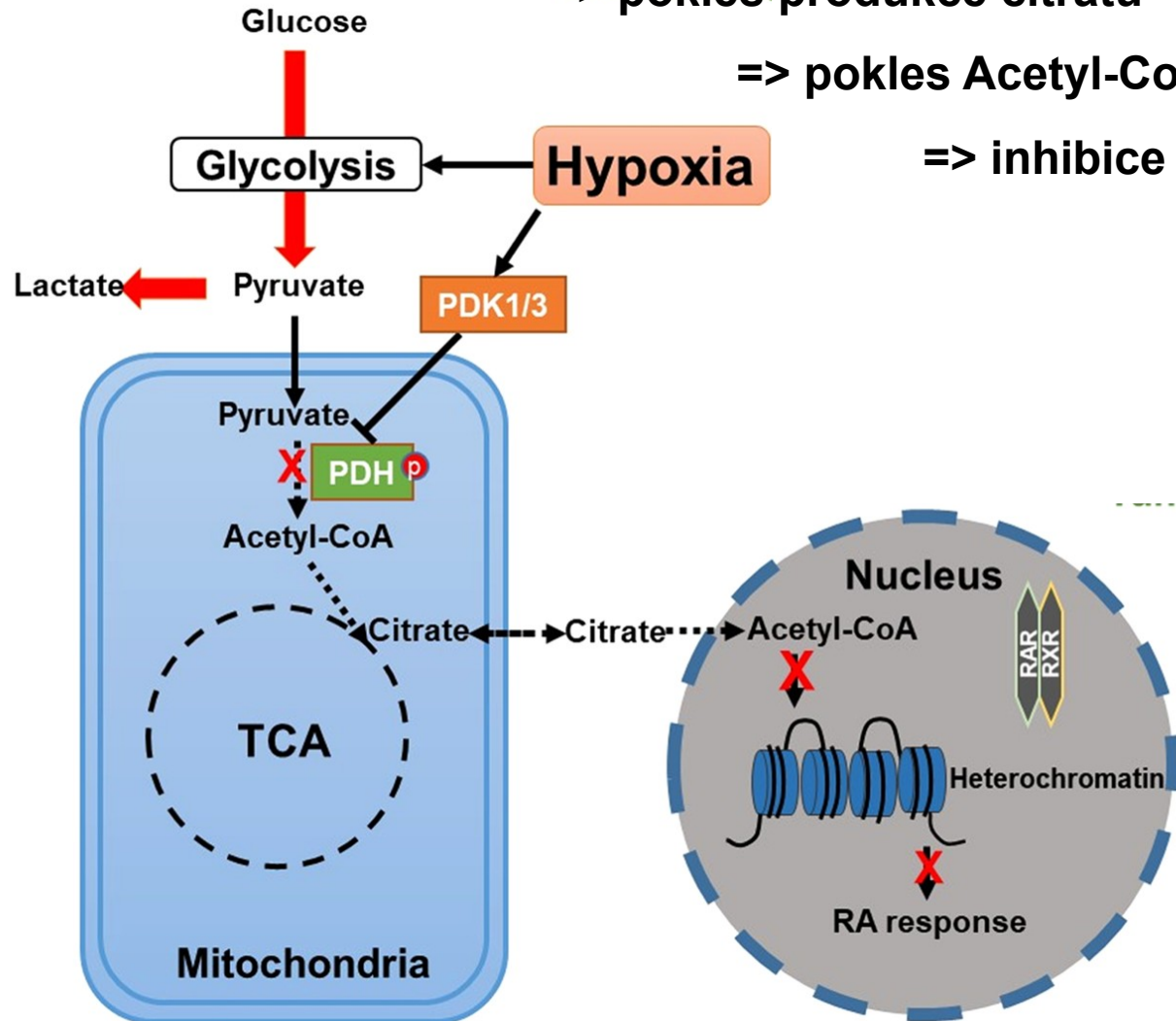
Hypoxie a na HIF nezávislá regulace genové exprese

Zástava Krebsova cyklu

=> pokles produkce citrátu

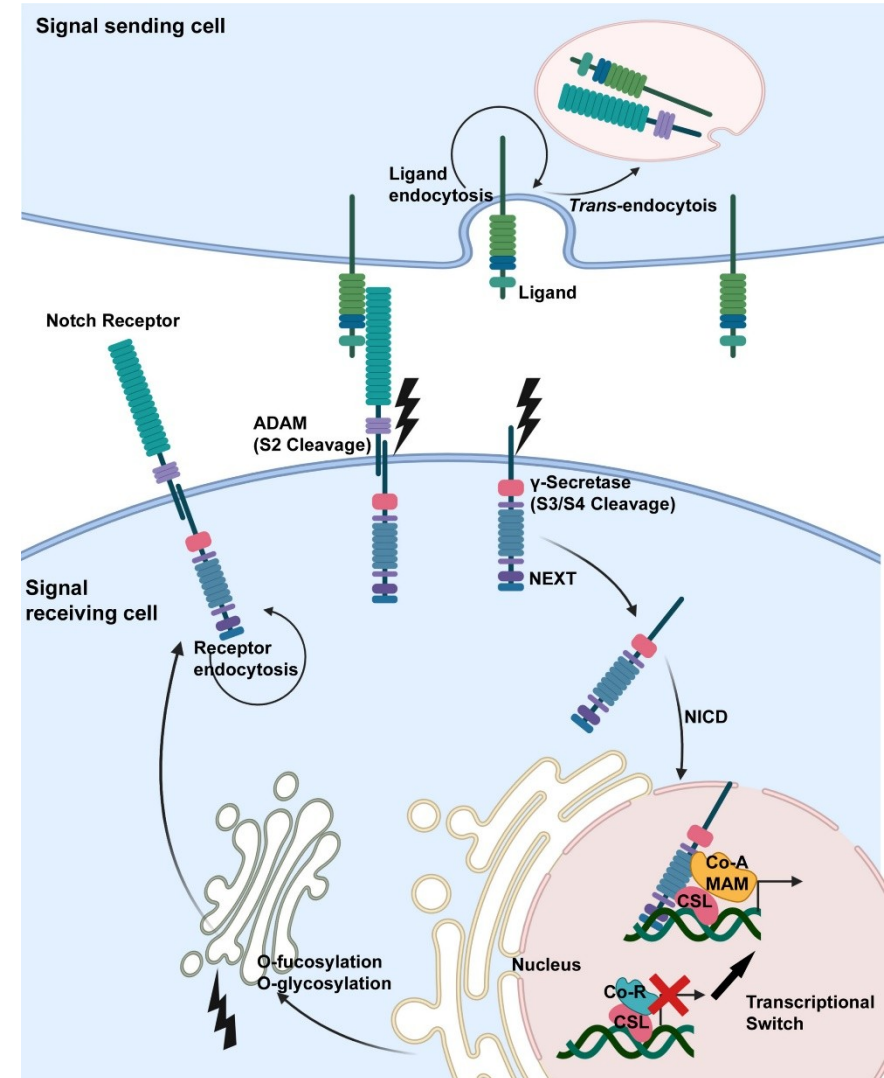
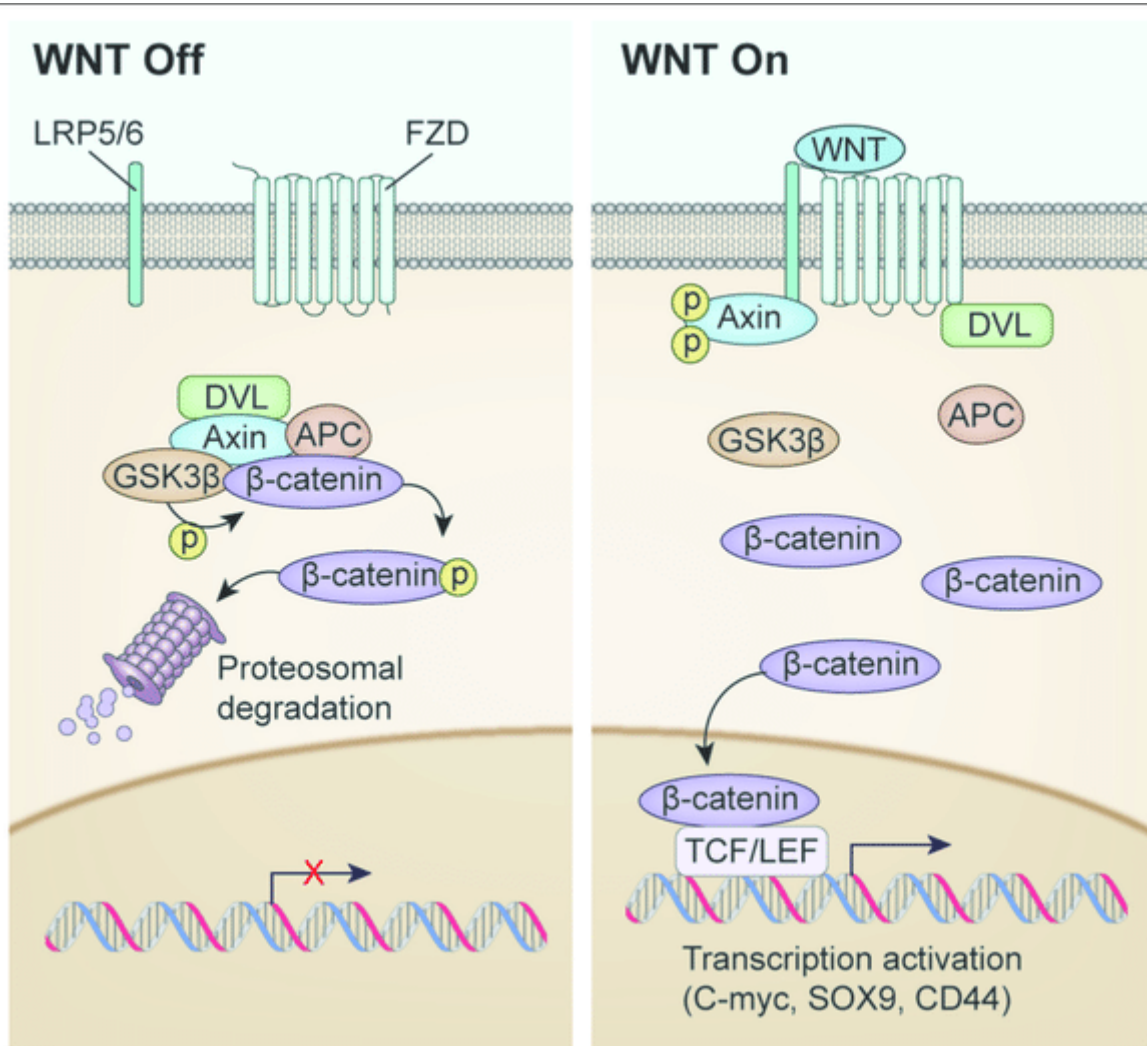
=> pokles Acetyl-CoA pro acetylasy histonů

=> inhibice epigenetické regulace genové exprese



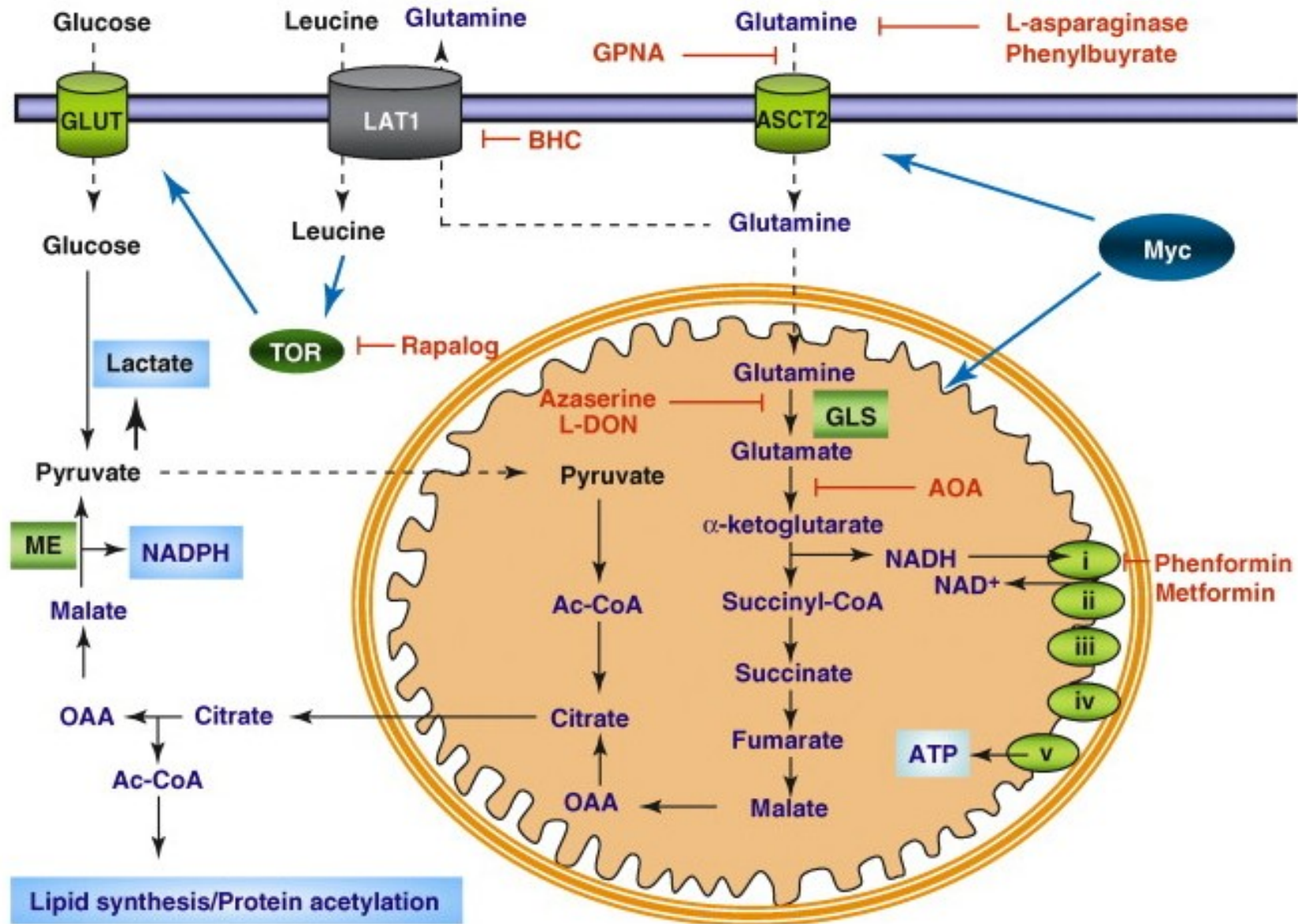
Signální dráhy podporující glykolýzu - Wnt a Notch

- Indukce exprese c-myc + enzymů glykolýzy + příjmu a metabolismu glutaminu
- Stabilizace HIF1 α s β -cateninem (Wnt) a nebo s NICD (Notch)



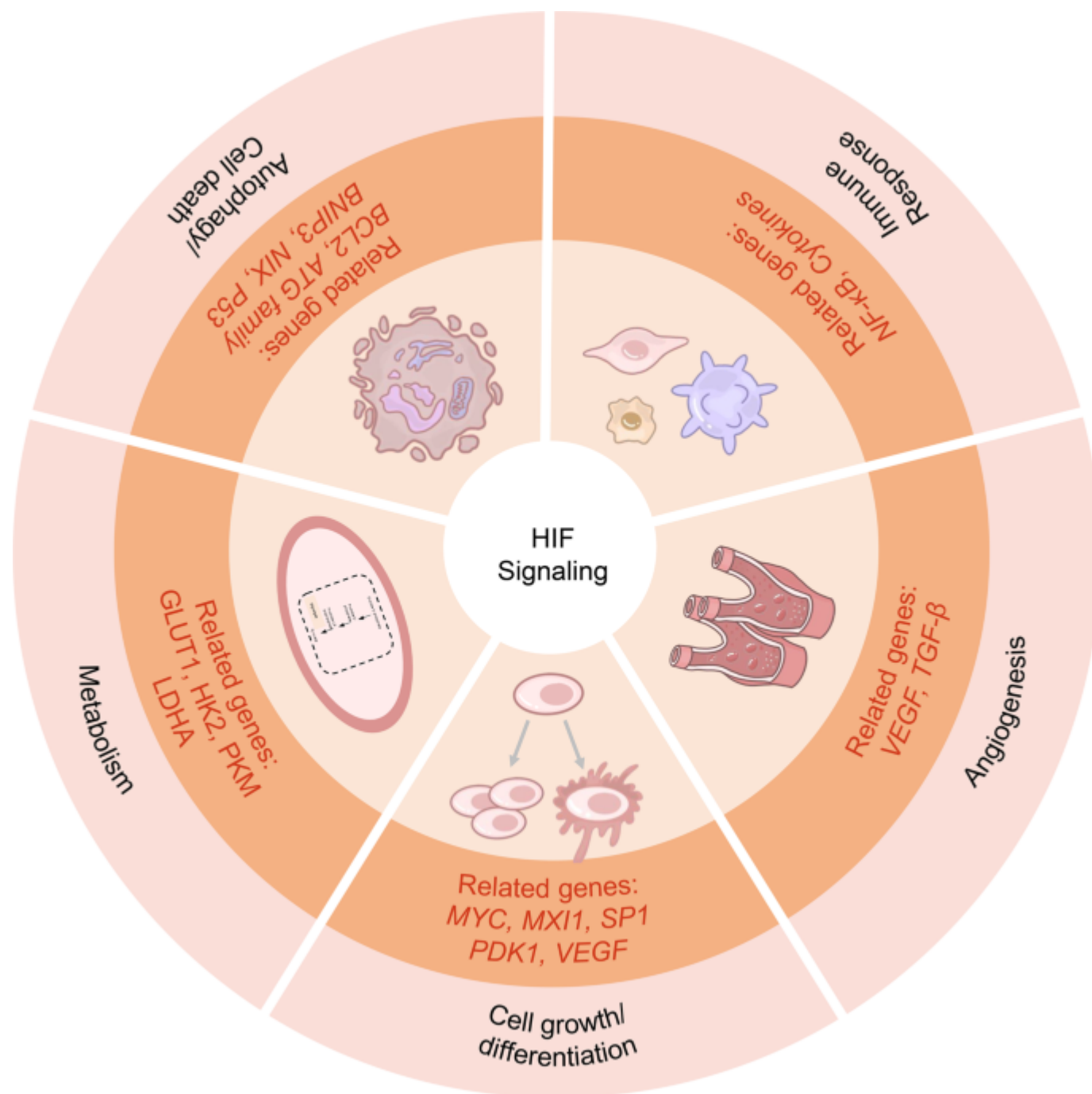
Úloha c-myc ve využití glutaminu v buněčném metabolismu

(transkripční faktor, pro-onkogen, regulátor proliferace buněk)

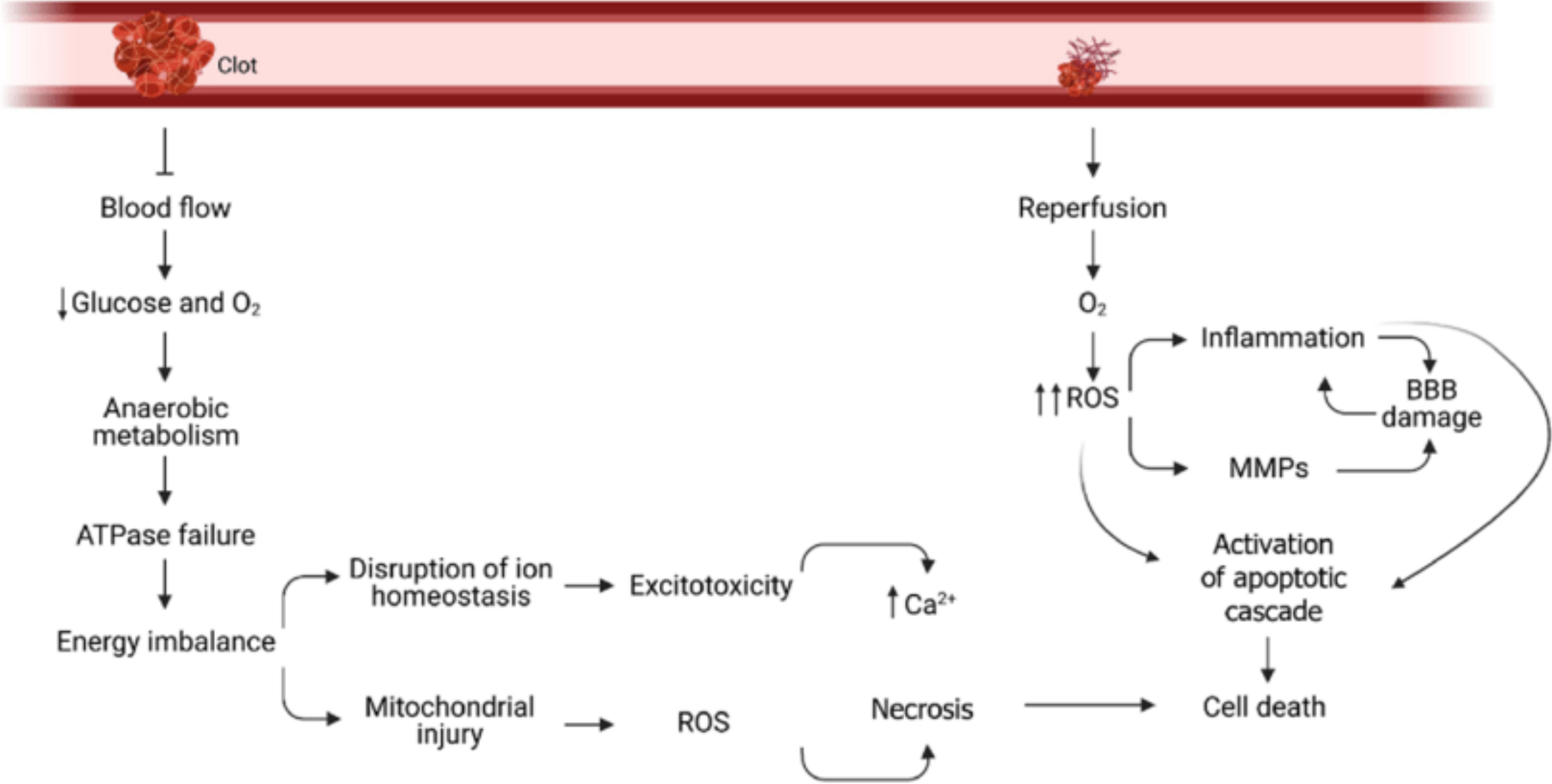


Patologie v souvislosti s hypoxií a HIFs

- Ischemie /reperfúze
- Tumorigeneze (glykolýza,..)
- Choroby krve (EPO, anemie,...)
- Metabolické choroby
- Vaskulogeneze (VEGF, PDGF)
- ...



Ischemie / reperfuse



Summary of the effects of HIF1 α , HIF2 α and HIF1 β on metabolic disease

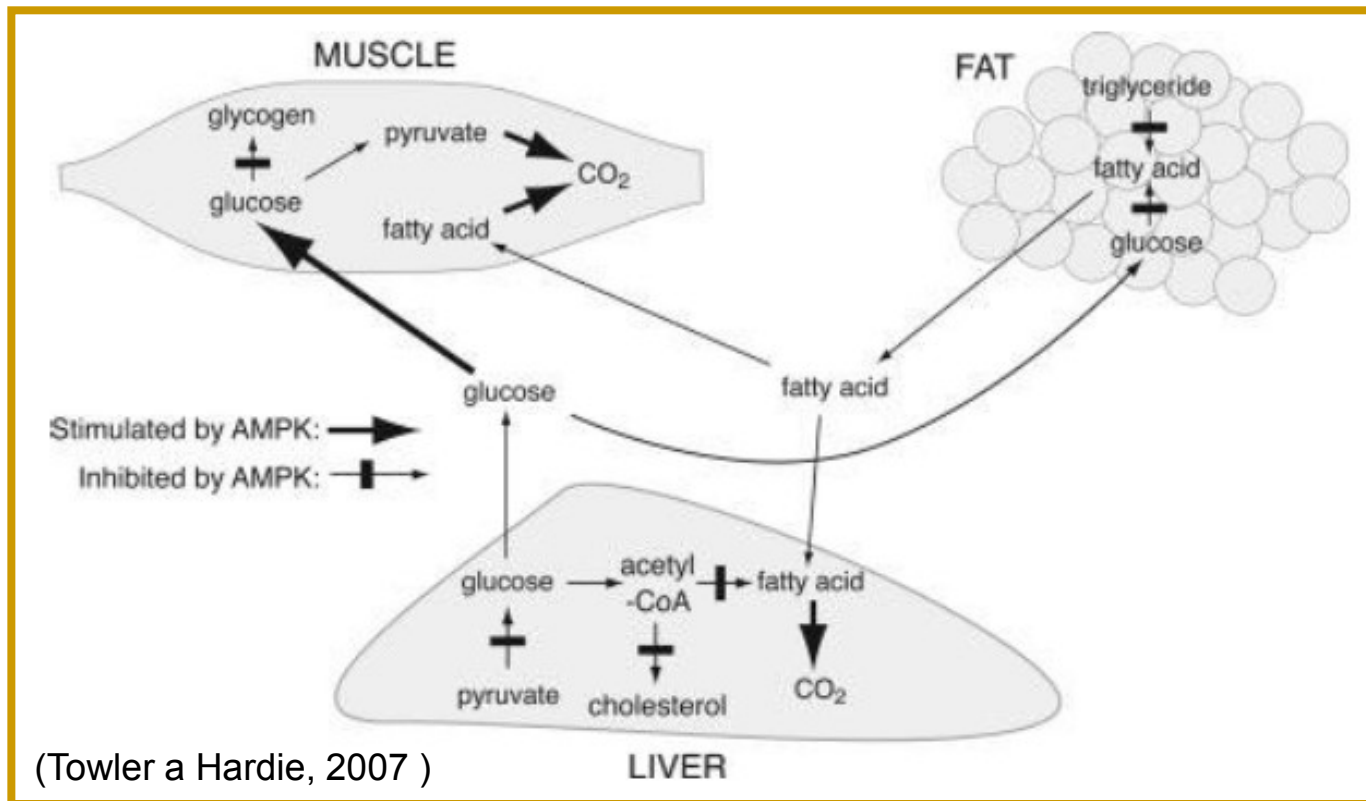
HIF	Tissue	HIF signalling	Phenotype
HIF1 α	Adipose	Activation	Increased obesity and insulin resistance
HIF1 α	Adipose	Inhibition with dominant negative HIF1 α	Increased obesity and insulin resistance
HIF1 α	Adipose	Inhibition	Decreased obesity and insulin resistance
HIF1 α	Adipose	Inhibition	Decreased insulin resistance and unchanged obesity
HIF1 α	Macrophage	Inhibition	No phenotype
HIF1 α	Pancreatic β -cell	Inhibition	Increased β -cell dysfunction and glucose intolerance
HIF1 α	Pancreatic β -cell	Activation	Increased β -cell dysfunction and glucose intolerance
HIF2 α	Liver	Activation	Increased hepatic steatosis and fibrosis
HIF2 α	Liver	Activation	Decreased glucose intolerance, gluconeogenesis and glucagon response
HIF2 α	Liver	Inhibition	Decreased non-alcoholic steatohepatitis
HIF2 α	Intestine	Inhibition	Decreased obesity, insulin resistance and hepatic steatosis
HIF2 α	Adipose	Inhibition	Slightly increased insulin resistance
HIF1 β	Pancreatic β -cell	Inhibition	Increased β -cell dysfunction and glucose intolerance
HIF1 β	Liver	Inhibition	Increased glucose intolerance

Buněčná úroveň – jednotlivé molekulární mechanismy citlivé ke změnám koncentrace O₂; Intenzita a význam reakcí je buněčně specifická

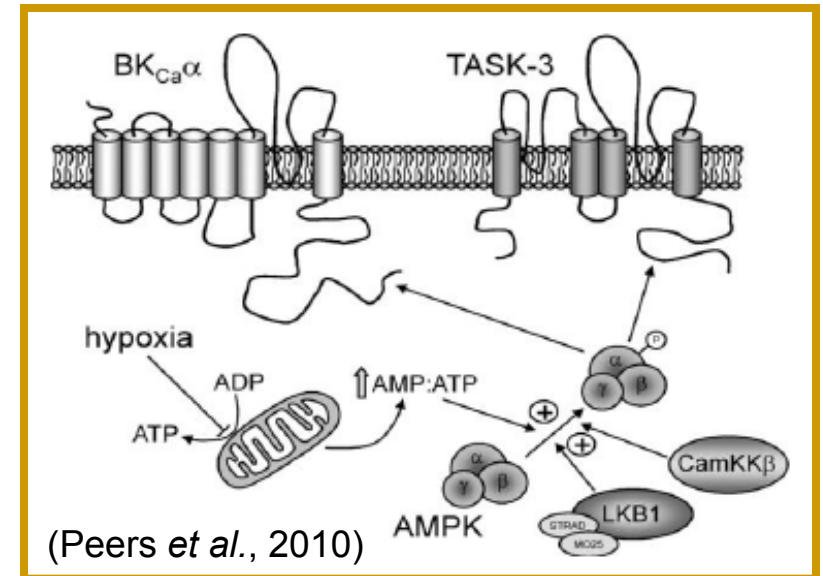
Akutní hypoxie

Bioenergetické sensory – klíčová úloha mitochondrií

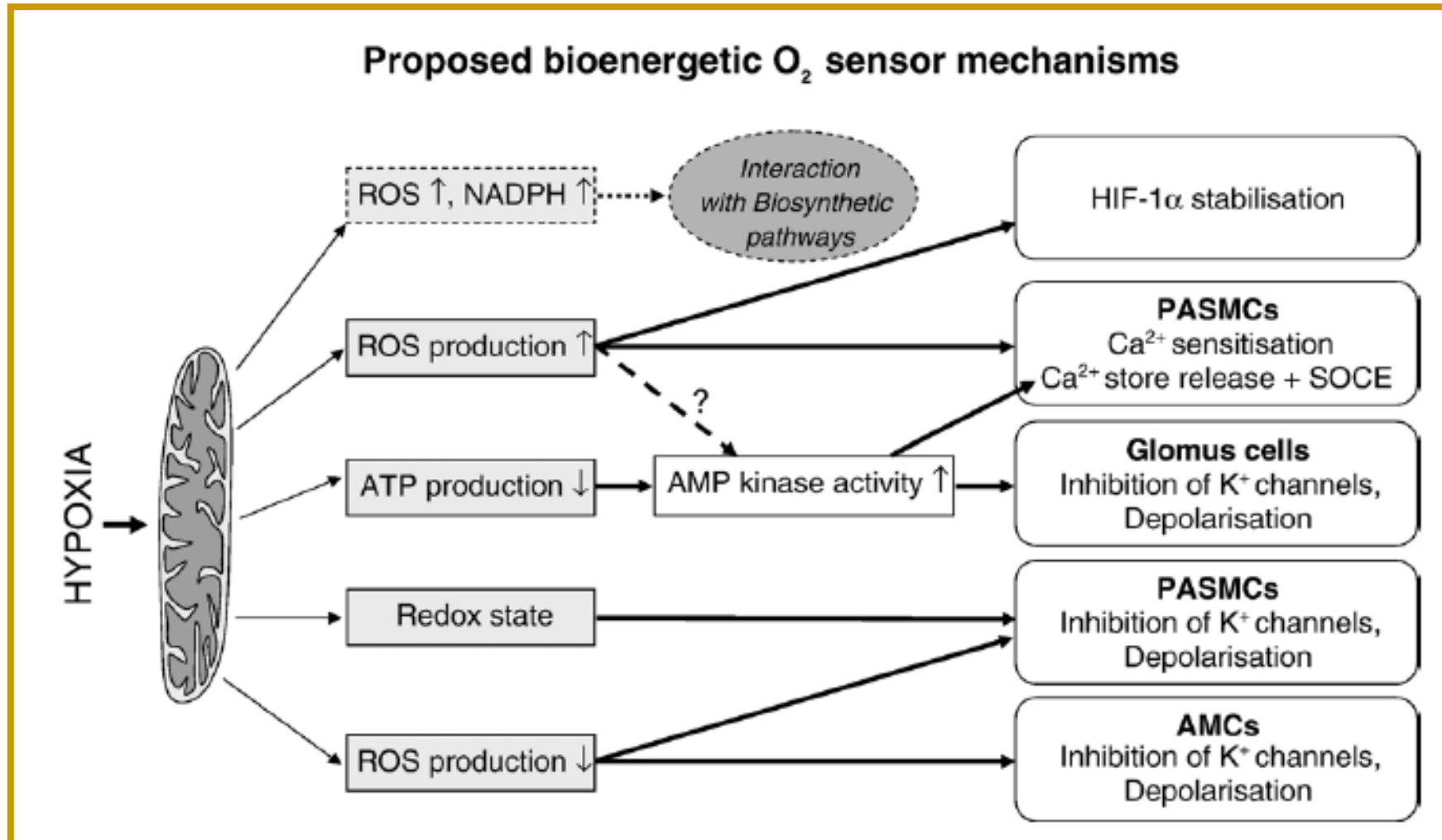
- AMP (adenosin monofosfát) kinázy, energetický stav buňky (citlivost na poměr AMP:ATP)



AMPK reguluje metabolismus i aktivitu iontových kanálů



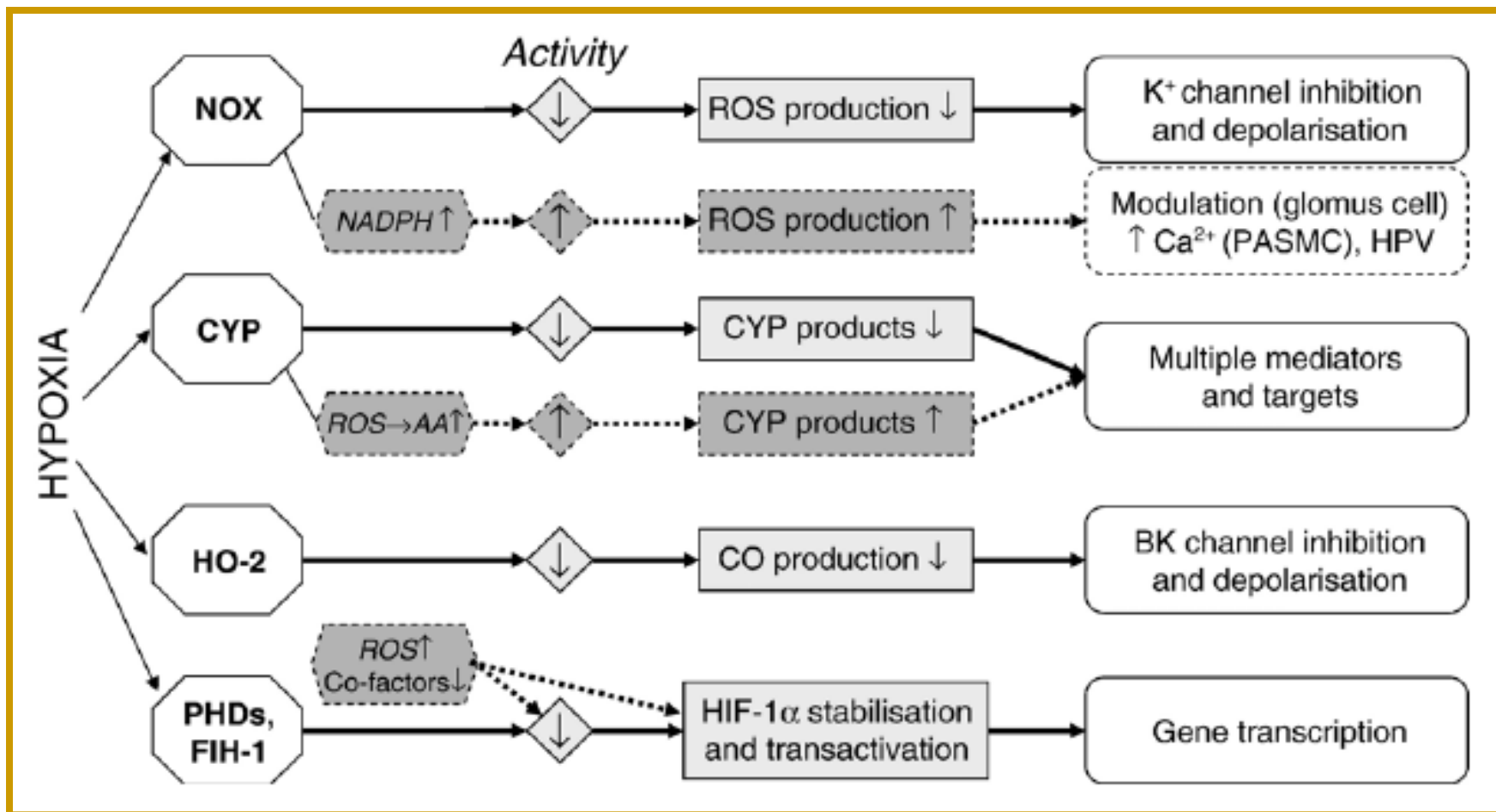
- ROS (reactive oxygen species), redoxní teorie



(Ward, 2008)

Biosyntetické sensory

- NADPH oxidázy
- Hem oxygenáza-2
- Cytochrom p-450 monooxygenázy



Chronická hypoxie

Sensorem jsme zejména prolyl-hydroxylázy => stabilizace / degradace hypoxií indukovaného faktoru (HIF)

Příklady otázek

Co je hypoxie a jaký je její dopad na buňku a tkáň.

Jak buňka reaguje na hypoxii a jak se na ni adaptuje?

Na jakých principech je buňkou zaznamenán pokles hladiny dostupného kyslíku?

Co se vše podílí na regulaci HIF?

Co jsou prolylhydroxylázy a co se podílí na regulaci jejich aktivity?