

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BIOCHEMIE



Terezie Rohlenová

Úloha mitochondriálního metabolismu v iniciaci a adaptaci buněk  
na hypoxii

*The role of mitochondrial metabolism in initiation and adaptation to  
hypoxic conditions*

Diplomová práce

vedoucí práce: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

konzultant práce: RNDr. Lydie Plecítá, Ph.D.

Praha 2013

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Lydie Plecité, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně ocitovala.

V Praze dne:.....

Podpis:.....

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala své konzultantce práce RNDr. Lydii Plecité, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a trpělivost během mé diplomové práce a také vedoucímu práce RNDr. Petru Novákovi, Ph.D. za umožnění práce a ochotu. Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu skupiny RNDr. Petra Ježka, DrSc. za cenné rady a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým za podporu při studiu.

## Abstrakt:

S patologickou hypoxií se často setkáváme v případech infarktu, mozkové mrtvice, ale i při masivní invazi tumoru, z důvodu nedostatečné angiogeneze. Pro přežití buňky v hypoxii je klíčová aktivace faktoru HIF-1. Tento faktor modeluje energetický metabolismus ve prospěch rychle probíhající glykolýzy (s přispěním glutaminolýzy), která zajišťuje buňce dostatek ATP i „stavebních kamenů“, zároveň potlačuje Krebsův cyklus a respiraci, neboť buňka má nedostatek  $O_2$ . Tato práce se zabývá energetickým metabolismem nádorových buněk HepG2 (pocházejících z jaterního karcinomu) pěstovaných v médiích s energetickým substrátem glukosou nebo galaktosou (a také glutaminem a pyruvátem) za podmínek mírné hypoxie (5%  $O_2$ ). Buňky HepG2 za normoxických podmínek využívají pro výrobu ATP a „stavebních kamenů“ zejména oxidační metabolismus. Přestože jsme dokázali, že u všech buněk HepG2 v hypoxii dochází k aktivaci HIF-1, u buněk pěstovaných v médiu s obsahem galaktosy (a glutaminu) nedochází k přesmyku oxidačního metabolismu na aerobní glykolýzu s potlačenou respirací, tak jako u buněk kultivovaných s glukosou. Zjistili jsme, že se zachovanou respirací a oxidativní fosforylací buněk HepG2 v galaktose souvisí i zvýšená aktivita a integrita mitochondrií, zvýšená maximální kapacita a rezervní kapacita respiračního řetězce. Proces respirace a oxidativní fosforylace vyžaduje množství substrátu pocházejícího z Krebsova cyklu, což koreluje s malou produkcí laktátu, jako odpadního produktu. U buněk pěstovaných v glukose za hypoxie dochází vlivem HIF-1 k přesmyku metabolismu ve prospěch rychle probíhající aerobní glykolýzy, a to se i odráží na rychlé proliferaci a odolnosti buněk vůči nedostatku  $O_2$ . Ovšem galaktosové buňky se oproti buňkám pěstovaných v glukose až dvakrát pomaleji množí za normoxie i hypoxie, což naznačuje pomalé zpracování galaktosy.

Pokud víme, že tumory využívající oxidační metabolismus jsou méně odolné proti působení nízkého  $pO_2$  a množí se pomaleji, mohli bychom toho využít při léčbě rakoviny.

Klíčová slova: hypoxie, HepG2, HIF-1, energetický metabolismus, galaktosa, glukosa, mitochondrie, aerobní glykolýza.

## **Abstract:**

We can meet pathological hypoxia in the cases of heart attack, ischemic stroke, but also during tumor invasion, thanks to insufficient angiogenesis. The activation of HIF-1 factor during hypoxic conditions is crucial for the cell survival. This factor modulates energetic metabolism in favor of fast progressing glycolysis (with the contribution of glutaminolysis) which provides to cell enough ATP and “building blocks”, while suppressing Krebs cycle and respiration because of shortage of oxygen. The thesis studies energetic metabolism of HepG2 cells (derived from liver carcinoma) which are cultivated in the media with various energetic substrates, i. e. glucose or galactose (always together with glutamine and pyruvate) under the hypoxic conditions (5% O<sub>2</sub>). HepG2 cells use particularly oxidative metabolism for ATP and “building blocks” production under the normoxic conditions while hypoxic environment causes metabolic shift in glycolytic condition. Interestingly, cells cultured in galactose (glutamine) didn't switch the energy metabolism from oxidative to aerobic glycolysis such as cells cultivated in glucose, although HIF-1 factor was stabilized. We found that enhanced activity and integrity of mitochondria, enhanced maximal capacity and reserve capacity of respiration chain correlates with preserved respiration and oxidative phosphorylation of HepG2 cells cultured in galactose and hypoxia. The process of respiration and oxidative phosphorylation require enough substrate derived from Krebs cycle which correlates with low production of lactate. HIF-1 causing changes of energetic metabolism towards fast aerobic glycolysis in HepG2 cells cultured in glucose under hypoxic conditions is reflected in fast proliferation and resistance of these cells to oxygen shortage. However, the cells cultured in galactose proliferate two times slower than the cells cultured in glucose under hypoxic and normoxic conditions which reflects slow processing of galactose.

If we know that tumors which use oxidative metabolism are less resistant and proliferate slowly, such switch of energetic metabolism could be used in cancer therapy.

**Key words:** Hypoxia, HepG2, HIF-1, energetic metabolism, galactose, glucose, mitochondria, aerobic glycolysis.

# Obsah

Seznam zkratk	7
1. Úvod	8
2. Literární přehled	9
2.1. Hypoxie	9
2.1.1. Hypoxie a karcinogeneze	9
2.2. Hypoxií indukovaný faktor (HIF)	10
2.2.1. Degradace HIF-1	10
2.2.2. Stabilizace HIF-1	12
2.2.3. Úloha HIF-1	13
2.2.4. Ovlivnění metabolismu faktorem HIF-1 za hypoxie	14
2.3. Karcinogeneze	16
2.3.2. Warburgův efekt	17
2.3.3. Proliferace a růst nádorové buňky	17
2.4. Energetické substráty pro nádorovou buňku	21
2.4.2. Glutamin	22
2.4.3. Glukosa	22
2.4.4. Galaktosa	24
2.4.5. Pyruvát	25
2.5. Metabolismus nádorové buňky za normoxických podmínek	26
2.6. Metabolismus nádorové buňky za extrémních hypoxických podmínek	27
3. Cíl práce	29
4. Použitý materiál	30
4.1. Přístroje	30
4.2. Experimentální model	30
4.3. Chemikálie a nástroje	31
4.3.1. Tkáňové kultury	31
4.3.2. Média	31
4.3.3. SDS PAGE a Western blot	34
4.3.4. Test produkce laktátu	36
4.3.5. Vysokorezoluční respirometrie	36
5. Metody	37
5.1. Pěstování buněčné kultury za normoxických podmínek	37
5.2. Pěstování kultury za hypoxických podmínek	37
5.3. Generační doba buněk	38
5.4. Elektroforéza a Western blot	38
5.4.1. Příprava vzorků pro elektroforézu	38
5.4.2. Elektroforéza (SDS-PAGE)	39
5.4.3. Western blot (Imunocytochemie)	41
5.5. Stanovení laktátu	42
5.6. Vysokorezoluční respirometrie	43
5.6.1. Oxygraf-2K	43
5.6.2. Příprava vzorků	44
5.6.3. Respirace buněk	45
6. Výsledky	48
6.1. Generační doba buněk HepG2	48
6.1.1. Role glutaminu	48
6.1.2. Role hexosy	48

6.1.3.	Role pyruvátu.....	49
6.1.4.	Role hypoxického prostředí .....	50
6.2.	Rychlost stabilizace HIF-1 v buňkách HepG2.....	51
6.3.	Detekce fosforylované a nefosforylované formy pyruvátdehydrogenasového komplexu.....	53
6.3.1.	PDH ve všech médiích.....	54
6.3.2.	Fosforylovaná forma PDH (p-PDH) v kompletních médiích.....	54
6.3.3.	Fosforylovaná forma PDH v médiích bez pyruvátu .....	55
6.4.	Produkce laktátu.....	57
6.4.1.	Produkce laktátu v kompletních médiích.....	57
6.4.2.	Produkce laktátu v médiích bez pyruvátu za normoxie (NMX).....	58
6.4.3.	Produkce laktátu v médiích bez pyruvátu za hypoxie .....	59
6.5.	Endogenní respirace .....	60
6.5.1.	Endogenní respirace-kompletní média .....	60
6.5.2.	Endogenní respirace- média bez pyruvátu.....	61
6.6.	Semikvantifikace mitochondrií .....	61
6.6.1.	Semikvantifikace mitochondrií v kompletních médiích.....	62
6.6.2.	Kvantifikace mitochondrií v médiích bez pyruvátu .....	62
6.6.3.	Endogenní respirace buněk HepG2 vztažená na množství mitochondrií .....	64
6.7.	Index respirační kontroly .....	65
6.7.1.	IRK-kompletní média .....	65
6.7.2.	IRK-média bez pyruvátu.....	66
6.8.	Poměr FCCP/stav 4.....	68
6.8.1.	FCCP/stav 4-kompletní média.....	68
6.8.2.	FCCP/stav 4-média bez pyruvátu .....	69
6.9.	Rezervní kapacita respiračního řetězce.....	70
7.	Diskuse .....	72
8.	Závěr.....	78
	Seznam použité literatury: .....	79

## Seznam použitých zkratek:

ACL = ATP citrát lyasa  
AMPK = AMP-aktivované protein kinasy  
COX = cytochrom c oxidasa  
FCCP = karbonylkyanid-*p*-trifluoro-methoxyfenylhydrazon  
FIH = faktor inhibující HIF  
Gal = galaktosa  
Glc = glukosa  
Gln = glutamin  
HIF = hypoxií indukovaný faktor  
HPX = hypoxie (5% O<sub>2</sub>)  
IDH = isocitrátdehydrogenasa  
IRK = index respirační kontroly  
K = kompletní médium  
LDH = laktátdehydrogenasa  
NMX = normoxie (20,9 % O<sub>2</sub>)  
OAA = oxalacetát  
ODDD = O<sub>2</sub>-dependenční degradační doména  
OXPHOS = oxidativní fosforylace (z angl. „oxidative phosphorylation“)  
PBS = fosfátový pufr (z angl. „phosphate buffered saline“)  
PDH = komplex pyruvátdehydrogenasy  
PDK-1 = kinasa komplexu pyruvátdehydrogenasy (z angl. „pyruvate dehydrogenase kinase-1“)  
PEP = fosfoenolpyruvát  
PHD = prolyl hydroxylasa (z angl. „prolyl hydroxylase domain“)  
PKM 1 (2) = pyruvátkinasa isoforma M1 (2)  
p-PDH = fosforylovaná pyruvátdehydrogenasa  
pyr = pyruvát  
pVHL = von Hippel-Lindau protein  
ROS = reaktivní formy kyslíku (z angl. „reactive oxygen species“)  
TAD = transkripční aktivační doména faktoru HIF



# 1. Úvod

Udržení homeostázy kyslíku je nezbytné pro funkci orgánů a přežití organismu. Pojem hypoxie zahrnuje  $pO_2$ , který se pohybuje pod hranicí normoxické hladiny pro danou tkáň [5]. Hypoxie může být patologická- je způsobena onemocněním, např. srdečním infarktem, mozkovou mrtvicí, astmatem a také invazí tumoru. V těchto případech může nastat až extrémní hypoxie (nebo anoxie), a tím nekrosa buněk. Fyziologická (hypoxická) hypoxie oproti patologické je způsobena nejčastěji snížením  $pO_2$  v prostředí, ve kterém se organismus vyskytuje (např. snížený  $pO_2$  ve vyšší nadmořské výšce), není ale vyvolána patologickou příčinou. [117] Organismy jsou schopny se na nepříznivé podmínky nízkého  $pO_2$  adaptovat, zejména změnou energetického metabolismu ve směru co nejnižší spotřeby  $O_2$  [13], [41], dále podpořením angiogeneze a erytropoeze (potřebných k okysličení tkání) [42], podpořením růstu buňky [43] atd. Tuto adaptaci zajišťuje souhra různých enzymů, onkoproteinů, tumor-supresorových proteinů a faktorů, z nichž nejdůležitější roli hraje faktor HIF-1 (hypoxií indukovaný faktor).

## 2. Literární přehled

### 2.1. Hypoxie

Jednou z nejdůležitějších adaptací organismů na Zemi je využití atmosférického kyslíku pro efektivní produkci energie, zejména oxidativní fosforylací. Pozoruhodné však je, že mnohobuněčné organismy si stále uchovávají schopnost se adaptovat na hypoxické prostředí, které bylo přítomno pravděpodobně v raných počátcích vývoje Země [1].

Normoxické podmínky zahrnují atmosférický tlak kyslíku ( $pO_2$ ), při němž organismy jsou schopny udržet homeostázu v buňkách, tkáních a orgánech. Hodnoty normoxického  $pO_2$  pro buňky ve tkáních jsou ovšem nižší, záleží na typu tkáně, metabolické aktivitě a vzdálenosti tkáně od nejbližší tepny/kapiláry [2]. Důležitým parametrem je gradient kyslíku, který se v tkáních snižuje se zvyšující vzdáleností od tepny/kapiláry. V průměru se pohybují hodnoty pro fyziologickou normoxii tkání okolo 30mmHg (3,75%  $O_2$ ) [3]. Např. normoxický tlak kyslíku v periportální části lidských a prasečích jater dosahuje 80mmHg (10%  $O_2$ ) a v perivenózní části 35mmHg (4,37%  $O_2$ ) [4].

Pojem hypoxie zahrnuje  $pO_2$ , který se pohybuje pod hranicí normoxie pro danou tkáň [5].

Paradoxně buněčné kultury určené k výzkumu jsou pěstovány při atmosférickém tlaku 167mmHg (20,9%) [3], na který se adaptují jako na normoxické podmínky. V naší laboratoři byly pro experimentální model: buňky HepG2 (nádorové buňky pocházející z lidského jaterního karcinomu) stanoveny hypoxické podmínky zahrnující 5%  $O_2$  a 5%  $CO_2$ . Podmínky byly stanoveny na základě toho, že tyto jaterní buňky ve tkáni těla normálně přežívají za 5%  $O_2$  (toto je jejich normoxická fyziologická hladina) [4].

#### 2.1.1. Hypoxie a karcinogeneze

Během rychlé proliferace tumoru dochází k poruchám angiogeneze, a tím k poklesu zásob kyslíku a živin [6]. Některé mikroregiony tumoru se tak ocitají v akutní nebo chronické hypoxii až anoxii. Oblasti nádoru, vzdálené od nejbližší kapiláry  $\geq 100\mu m$ , se nacházejí v anoxickém prostředí, to někdy může vést až k nekróze buněk [7], [8]. Doba trvání akutní hypoxie kvůli nedostatečnému přítoku krve může trvat od několika minut až po hodiny [9]. Hypoxický stres vyvolává četné mutace genů a alterace na chromozomech, také způsobí rezistenci vůči apoptose a sníženou schopnost opravy DNA. Tyto změny se často objevují jako následek mutací tumor-supresorových genů nebo aktivací onkogenů

[10], [11]. V procesu karcinogeneze se často objevuje souhra mezi onkogeny, tumor-supresorovými geny a hypoxickou signalizační kaskádou. Např. s výjimkou fosfoglycerátmutasy jsou všechny glykolytické enzymy stimulovány faktorem HIF (hypoxií indukovaný faktor) společně s onkoproteinem MYC [12], [13].

Při reakci organismu na hypoxický stav hrají roli zejména AMPK (AMP-aktivované protein kinasy) a faktor HIF. Pokud se změní koncentrace  $O_2$  v buňce, změní se i poměr AMP/ATP. Při hypoxii se snižuje množství ATP a tak AMPK (reaguje přímo na změnu poměru AMP/ATP) spouští kaskádu procesů vedoucích ke stimulaci katabolických dějů a inhibici anabolických. Další úlohou AMPK je zvýšení regulace glykolýzy a dále podpoření transkripční aktivity faktoru HIF [12], [14].

## ***2.2. Hypoxií indukovaný faktor (HIF)***

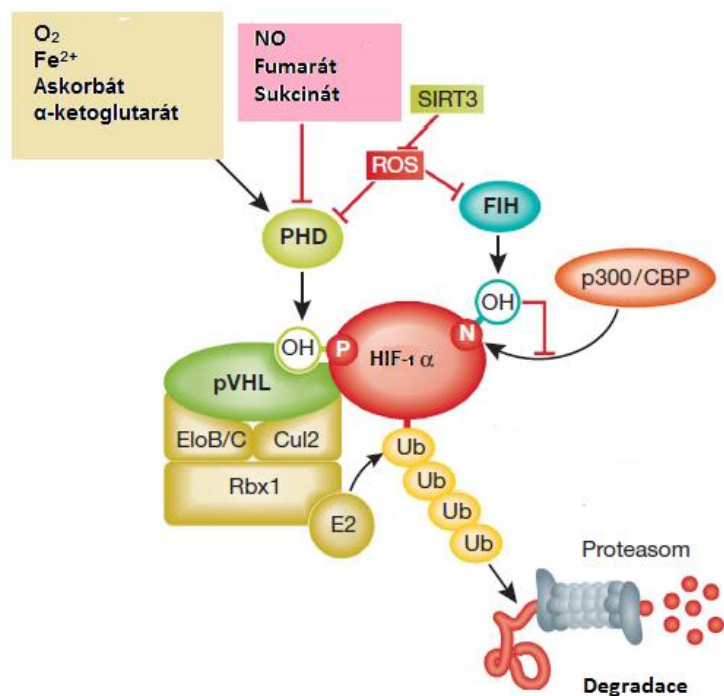
K aktivaci a stabilizaci faktoru HIF dochází za hypoxických podmínek (<5%  $O_2$ , 40mmHg v buněčné kultuře) [15]. HIF je heterodimerní molekula, která se váže na DNA, jako transkripční faktor. Molekula HIF se skládá z podjednotky HIF-1 $\alpha$  (nebo dalších isoform HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ ), která je indukovaná hypoxií, a podjednotky HIF-1 $\beta$ , která je permanentně exprimována. Podjednotka HIF-1 $\alpha$  se skládá z N-terminální transkripční aktivační domény (TAD), která je také nazývána  $O_2$ -dependentní degradační doména (ODDD). HIF-1 $\alpha$  a HIF-2 $\alpha$  obsahuje ještě C-terminální TAD, která interaguje s faktorem inhibujícím HIF-1 (FIH) [16], [17].

HIF-1 $\alpha$  je nejprozkoumanější ze všech isoform, vyskytuje se téměř ve všech tkáních. HIF-2 $\alpha$  je více tkáňově specifická, vyskytuje se zejména v játrech, ledvinách, mozku, srdci a plicích [18]. Faktor HIF-2 reguluje zejména tvorbu červených krvinek a metabolismus železa [19]. HIF-3 $\alpha$  je nejméně prozkoumána. Tato práce se zabývá pouze faktorem HIF-1.

### **2.2.1. Degradace HIF-1**

Za normoxických podmínek je podjednotka HIF-1 $\alpha$  degradována v proteasomu. PHD (=prolyl hydroxylasa, z angl. „prolyl hydroxylase domain“) hydroxyluje na N-terminální doméně TAD faktoru HIF-1 $\alpha$  proliny v pozici 402 a/nebo 564 (Pro-402, Pro-564), zároveň využívá jako substráty  $O_2$  a  $\alpha$ -ketoglutarát. Důležitými kosubstráty jsou  $Fe^{2+}$  a kyselina askorbová [20]. Touto reakcí je generován sukcinát a  $CO_2$ . Zároveň probíhá hydroxylace asparaginů (v poloze 803) na C-terminální doméně enzymem dioxygenasou,

fungující jako asparaginylní hydroxylasa (také nazývána FIH=faktor inhibující HIF-1). FIH touto hydroxylací blokuje vazbu HIF-1 $\alpha$  na transkripční koaktivační faktory CREB (z angl. „cAMP response element-binding protein“) a p300, figurujících při stabilizaci komplexu HIF-1 [20], [21], [22]. Po následné polyubiquitinaci hydroxylovaného HIF-1 $\alpha$  se molekula naváže na komplex E3 ubiquitin ligasy, který je složen z proteinu VHL (von Hippel-Lindau tumor supresorový protein), elonginů B a C (eloB/C), cullinu-2 (Cul2) a Ring-box proteinu 1 (Rbx) [23]. Následně je HIF-1 $\alpha$  degradován v proteasomu [24] (obr. 1).

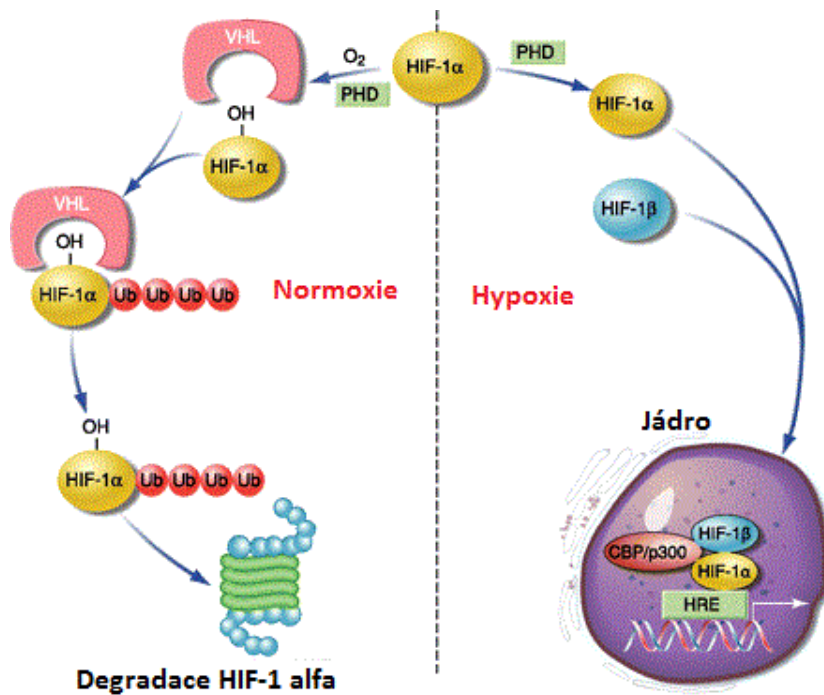


Obr. 1: Degradace HIF-1 $\alpha$ . O<sub>2</sub> a  $\alpha$ -ketoglutarát jsou substráty a Fe<sup>2+</sup> a askorbát působí jako kosubstráty PHD. NO, fumarát a sukcinát jsou kompetitivními inhibitory PHD. ROS také působí proti degradaci HIF-1 $\alpha$  inhibicí PHD a FIH. Degradace HIF $\alpha$  je založena na hydroxylaci určitých aminokyselin hydroxylasami PHD a FIH. Hydroxylované skupiny jsou klíčové k rozpoznání komplexem ubiquitin ligasy (složené z pVHL, EloB/C, Cul2 a Rbx1) a následné degradaci v proteasomu. Hydroxylace aminokyselin dále blokuje navázání transkripčních faktorů p300 a CBP. HIF-1 $\alpha$ = Hypoxií indukovaný faktor HIF-1 podjednotka  $\alpha$ , PHD=prolyl hydroxylasa, FIH= faktor inhibující HIF, ROS=reaktivní formy kyslíku, pVHL=von Hippel-Lindau protein, EloB/C=elonginy B/C, Cul2=cullin-2, Rbx1=RING box protein 1, Ub=ubiquitin, p300/CBP= transkripční faktory p300 a CREB protein. SIRT3=sirtuin 3.

Převzato z [25].

### 2.2.2. Stabilizace HIF-1

Důležitým kosubstrátem PHD jsou železnaté kationty ( $\text{Fe}^{2+}$ ), které hrají klíčovou roli při stabilizaci a aktivaci podjednotky HIF-1 $\alpha$ . Při hypoxii (v rozmezí 1-5%  $\text{O}_2$ ) se v dýchacím řetězci (zejména v komplexu III) generuje velké množství superoxidového iontu  $\text{O}_2^-$  [26], [27], který je superoxidodismutasami přeměněn na  $\text{H}_2\text{O}_2$ , čím se značně zvýší koncentrace  $\text{H}_2\text{O}_2$  v cytosolu.  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxiduje  $\text{Fe}^{2+}$  na  $\text{Fe}^{3+}$  (Fentonova reakce), čím PHD nemá dostatek kosubstrátu pro svou funkci. Tedy ROS značně inhibují hydroxylaci prolinů na N-terminální doméně TAD HIF-1 $\alpha$  [28]. Při hypoxii, z důvodu nedostatku  $\text{O}_2$  jako substrátu a nedostatku  $\text{Fe}^{2+}$  jako kosubstrátu, je PHD a FIH inhibována [27], tím se HIF-1 $\alpha$  stabilizuje, a v jádře tvoří komplex s podjednotkou HIF-1 $\beta$ . Heterodimer HIF-1 $\alpha\beta$  se následně váže na specifické sekvence (nazývány hypoxické responsivní elementy, HRE) na promotorech cílových genů [29] (obr. 2).



Obr. 2.: Degradace (vlevo) a stabilizace (vpravo) podjednotky HIF-1 $\alpha$ . PHD=prolyl hydroxylasa, VHL=von Hippel-Lindau protein, Ub=ubiquitin, HRE=hypoxické responsivní elementy, CBP=CREB protein, p300 (transaktivační protein p300)

převzato z: <http://ajrcm.atsjournals.org/content/183/2/152/F1.expansion>

HIF-1 $\alpha$  může být také stabilizován i za normoxických podmínek pomocí kompetitivních inhibitorů prolyl hydroxylasy (PHD). Mezi tyto inhibitory patří intermediáty Krebsova cyklu: sukcinát, fumarát a oxalacetát, ale také pyruvát. Akumulace

těchto sloučenin způsobí kompetici s  $\alpha$ -ketoglutarátem (substrát PHD). Stav, kdy je HIF-1 stabilizován, i za normoxických podmínek, se nazývá „**pseudohypoxie**“ [30]. Akumulace těchto metabolitů je zapříčiněna mutacemi, nebo absencí genů kódující enzymy Krebsova cyklu. Výzkumy lidských tumorů prokázaly časté mutace genů kódující sukcinátdehydrogenasu (SDH) a fumaráthydratasu (FH) [31]. Dochází tak nejen k akumulaci sukcinátu a fumarátu, ale i zvýšení koncentrace ROS [32].

Další častou mutací, která byla nalezena u více než 12% glioblastomů, je mutace genu pro cytosolickou **IDH-1** (isocitrátdehydrogenasu 1), často se jedná o spontánní bodovou mutaci [33]. Stejně tak byly nalezeny u případů akutní myeloidní leukémie bodové mutace genu pro mitochondriální **IDH-2** (isocitrátdehydrogenasu 2) [34]. Tyto mutace znemožní IDH-1 a IDH-2 katalyzovat konverzi citrátu v  $\alpha$ -ketoglutarát, za produkce NADH [35], ale vytváří nový produkt: 2-hydroxyglutarát (2-HD). Tento nový metabolit také kompetuje s  $\alpha$ -ketoglutarátem a tím inhibuje funkci PHD. Tedy mutace genu pro IDH mohou značně přispívat ke stabilizaci HIF-1 [36].

Dalším iniciátorem stabilizace HIF-1 $\alpha$  je oxid dusnatý (**NO**). Pokud se vyskytuje v tkáni ve vysoké koncentraci, může vystupovat jako analog molekulárního kyslíku, a tím také stabilizovat HIF-1 $\alpha$  [37].

Zvláštní případ stabilizace HIF-1 $\alpha$  za normoxických podmínek byl popsán u karcinomu ledvin, při kterém byla zjištěna dysfunkce proteinu VHL (mutace *VHL* genu), který figuruje při degradaci HIF-1 $\alpha$  [38].

Na stabilizaci HIF-1 $\alpha$  se může podílet i SIRT3 (sirtuin3), mitochondriální NAD-dependentní deacetylase. Při mutaci genu *SIRT3* (při ztrátě aktivity) dochází ke zvýšení ROS v mitochondriích a tím ke stabilizaci HIF-1 $\alpha$  [39], [40].

### 2.2.3. Úloha HIF-1

Obecně HIF-1 aktivuje expresi genů, jejichž proteiny zajišťují adaptaci buňky na hypoxické podmínky a její přežití. U většiny nádorových buněk HIF-1 zajišťuje „přepnutí“ energetického metabolismu z oxidativní fosforylace na rychle probíhající glykolýzu. Glykolýza se stává ústřední dráhou zajišťující dostatek ATP a „stavebních kamenů“ (=lipidy, nukleové kyseliny a aminokyseliny) pro proliferaci buňky [13], [41]. Dále HIF-1 ovlivňuje expresi genů pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a erythropoetin, a

tím zajistí podporu angiogeneze, tvorbu červených krvinek a vazodilatace, potřebné k okysličení tkání [42]. Mezi další účinky HIF-1 na nádorovou buňku patří podpoření proliferace zvýšením exprese genu kódující „inzulinu podobný růstový faktor“ (z angl. „Insulin-like growth factor“) [43] a dále zajišťuje celkové přežití buňky (vliv na apoptosu, buněčný cyklus, opravný systém DNA), adhezi a motilitu buňky [44].

#### **2.2.4. Ovlivnění metabolismu faktorem HIF-1 za hypoxie**

Obecně úlohou HIF-1 při hypoxii je úprava metabolismu ve směru minimální spotřeby kyslíku, který se stává limitním substrátem. Mimo oxidativní fosforylace, pro kterou se stává kyslík limitním substrátem až při  $pO_2 < 4\text{mmHg}$  (0,5%  $O_2$ ) [45], je potřeba  $O_2$  ještě pro funkci dalších nemitochondriálních enzymů, např. oxidas, hydroxylas [46] atd. Dále je kyslík potřebný pro syntézu sterolů a vytváření terciární struktury proteinů (angl. „folding“). Tyto procesy mohou zkonsumovat 10-30% celkové buněčné spotřeby  $O_2$  (v závislosti na tkáni) [47].

Jak již bylo zmíněno, stabilizovaný HIF-1 v nádorových buňkách stimuluje glykolytický metabolismus a inhibuje mitochondriální metabolismus (tím spotřebu  $O_2$ ). Konkrétně:

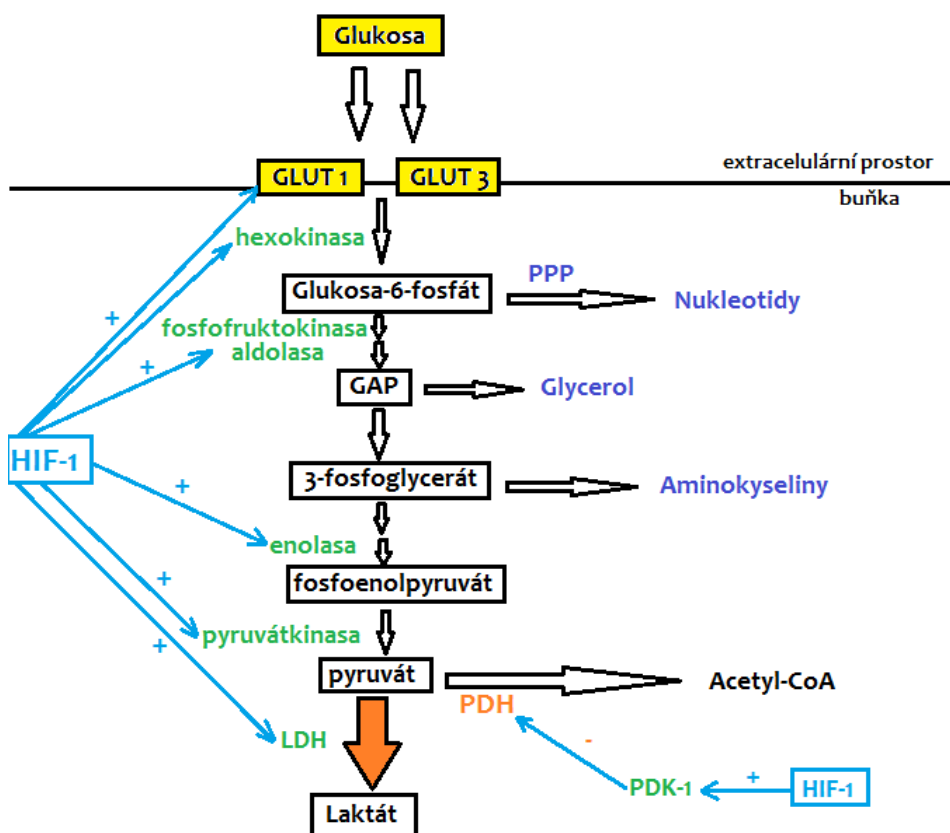
1.) HIF-1 zvyšuje příjem extracelulární glukosy stimulací exprese genů *SLC2A1* a *SLC2A3*, které kódují přenašeče glukosy (do buňky) GLUT 1 a GLUT 3 [48].

2.) HIF-1 dále stimuluje expresi glykolytických enzymů, zejména hexokinasy 1 a hexokinasy 2 (ta figuruje hlavně při hypoxii) [49], fosfofruktokinasy, aldolasy, enolasy 1 a glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy. Uvádí se, že všech dvanáct glykolytických enzymů je regulováno faktorem HIF-1 [50] (obr. 3, str. 15).

3.) Pyruvát, který vzniká glykolýzou, může být buď přeměněn na Acetyl-CoA pomocí PDH (komplex pyruvátdehydrogenasy) nebo redukován na laktát, pomocí laktátdehydrogenasy (LDH). HIF-1 přímo aktivuje gen *pdk 1* pro kinasu pyruvátdehydrogenasy 1 (PDK-1), která fosforyluje podjednotku E1 komplexu PDH a tím jí inaktivuje. PDH katalyzuje přeměnu pyruvátu v Acetyl-CoA, který je nezbytný pro

průběh Krebsova cyklu, a tím produkci NADH (donor elektronu v komplexu I dýchacího řetězce) a dále respiračního řetězce [51] (obr. 3).

4.) Činností PDK-1 dochází v buňce k akumulaci pyruvátu. HIF-1 stimuluje expresi laktátdehydrogenasy 1 (LDH) a tak je nadbytečný pyruvát redukován na laktát, který je odváděn do extracelulárního prostoru. Zároveň touto reakcí dochází k regeneraci  $\text{NAD}^+$  [12], [13], [52]. Exprese genu pro přenašeč laktátu MCT4 (SLC16A4) je také stimulován HIF-1 [53] (Obr. 3).



Obr. 3: Schéma stimulace (+) a inhibice (-) enzymů a proteinů metabolismu buňky faktorem HIF-1. GAP=glyceraldehyd-3-fosfát, LDH=laktátdehydrogenasa, PDH=komplex pyruvátdehydrogenasy, PDK-1= kinasa komplexu pyruvátdehydrogenasy, PPP=pentosofosfátový cyklus, GLUT 1 a GLUT 3= přenašeče glukosy do buňky.

5.) Další významnou úlohou HIF za hypoxie je regulace ROS (reaktivní formy kyslíku). Ve zdravé buňce ROS hrají roli při buněčné signalizaci, např. apoptosy nebo



programované buněčné smrti, která patří mezi běžné procesy [54]. Regulace koncentrace ROS v buňce je zajištěna působením antioxidantů ( $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoteny, flavonoidy, askorbát atd.) a pufrovacích systémů v buňce (dva systémy založené na oxidoredukčních reakcích Glutathionu a Thioredoxinu) [55].

Hypoxické podmínky mnohonásobně zvyšují množství ROS v buňce. Ve tkáních bohatých na mitochondrie (mozek, srdce), jsou mitochondrie hlavním producentem ROS [54]. ROS (zejména superoxidový anionradikál  $O_2^{\cdot-}$ ) vzniká nevyváženým elektronovým transportem na komplexu III. (v menší míře i na komplexu I.) dýchacího řetězce [56]. ROS jsou ve vysokých koncentracích toxické (zejména radikálové formy) pro biomolekuly (způsobují lipoperoxidaci, mutace DNA, oxidaci proteinů atd.) [57].

Elektronový transport přes komplexy dýchacího řetězce je při hypoxických podmínkách zpomalen, v mezimembránovém prostoru se hromadí množství  $H^+$  a tím se zvýší membránový potenciál. Dochází k nevyvážené rychlosti přenosu elektronů přes komplexy dýchacího řetězce a syntézy ATP, a tím ke zvýšené produkci ROS (oxidace ubiquinolů na ubiquinon na komplexu III. probíhá přes semichinoidní formu, která se při nevyváženém toku elektronů ihned nepřemění na ubiquinon, ale reaguje s molekulami kyslíku v membráně) [58].

Při hypoxii koncentrace ROS v buňce nejdříve (v iniciační fázi) prudce stoupne, zvýší se produkce ROS zejména mitochondriálními zdroji (komplexy dýchacího řetězce), což podporuje stabilizaci faktoru HIF-1. V další fázi adaptace se snižuje mitochondriální produkce ROS. Neklesne ale úplně [data laboratoře], bylo zjištěno, že HIF-1 stimuluje cytosolické zdroje ROS-zejména činnost NAD(P)H oxidasy podjednotky 4 (NOX-4) [54]. HIF-1 snižuje mitochondriální produkci ROS zejména záměnou isoformy COX4-1 (cytochrom c oxidasa) za COX4-2 [37], [51]. COX4-1 je degradována mitochondriální proteasou LON. COX4-2 zoptimalizuje tok elektronů z komplexu III na cytochrom c a tím sníží produkci ROS komplexem III [37].

### **2.3. Karcinogeneze**

Dle D. Hanahana a R. A. Weinberga existuje 6 majoritních znaků vývoje zdravé buňky v nádorovou: nedostatečná signalizace růstu buňky, necitlivost k signálům potlačující růst, potlačení apoptosy, neomezená replikace, trvalá angiogeneze a nakonec invaze tkáně a metastáze [59]. V poslední době se v publikacích objevuje 7. znak: alterace

v metabolismu buňky, směřovaná k velké produkci ATP a zároveň k syntéze nukleotidů, lipidů a proteinů („stavební kameny buňky“) [60].

### 2.3.2. Warburgův efekt

Mitochondriální oxidativní fosforylace (OXPHOS) produkuje energii ve formě ATP menší rychlostí ve srovnání s glykolýzou [61], ale přesto je OXPHOS v normálně fungující buňce hlavním producentem ATP, protože efektivnost výroby je 16 krát vyšší než glykolýzou (38 molekul ATP oxidativní fosforylací oproti 2 molekulám ATP glykolýzou na 1 molekulu glukosy) [62].

Už před více než 80 lety upozoroval O. Warburg u maligní nádorové buňky zvýšený příjem glukosy za normoxických podmínek oproti zdravé buňce. Tento jev je nazýván Warburgův efekt [63]. Glukosa je zpracována nádorovou buňkou procesem aerobní glykolýzy, která probíhá vyšší rychlostí než u zdravé buňky. Nádorová buňka produkuje velké množství laktátu, i přes to, že v okolí buňky je dostatečná koncentrace kyslíku na výrobu energie mitochondriální respirací [64]. O. Warburg se však domníval, že v nádorové buňce dojde k defektu mitochondriální oxidativní fosforylace a tím ke zvýšení aktivity aerobní glykolýzy, jako náhradního zdroje ATP [63]. Ale v mnoha pozdějších studiích se prokázalo, že mitochondrie nádorových buněk jsou plně funkční [65].

### 2.3.3. Proliferace a růst nádorové buňky

V nádorové buňce opravdu dochází ke zvýšení rychlosti glykolýzy (zvýšený příjem glukosy, zvýšená exprese některých glykolytických enzymů) a tím i zefektivnění produkce ATP. Zároveň buňka využívá metabolity glykolýzy, díky kterým vznikají důležité „stavební kameny“ (aminokyseliny, nukleové kyseliny a lipidy) potřebné pro proliferaci a růst [61] (obr. 4, str. 20). Zásadní pro produkci „stavebních kamenů“ je výměna isoformy glykolytického enzymu pyruvátkinasy isoformy M1 (PKM1) za isoformu M2 (PKM2) (viz kap. 2.3.3.4).

Výzkumy tumorů na molekulární úrovni odhalily značné množství kombinací mechanismů malignace, souvisejících s mutacemi na nejrůznějších genech regulujících buněčný růst [66]. Tyto geny jsou nazývány **onkogeny a tumor-supresorové geny**.

### **2.3.3.1. Mutace p-53**

Jednou z nejčastěji nalezených mutací tumor-supresorového genu v nádorové buňce je gen pro transkripční faktor **p53**. Tento faktor se podílí na regulaci buněčného cyklu a také navozuje apoptosu buňky, pokud dojde k „zafixování“ zhoubné mutace na DNA [67]. Dále se p53 podílí na regulaci aerobního metabolismu, indukuje expresi COX-2 (cytochrom c oxidasy-2) a tím dochází ke zvýšení rychlosti mitochondriální respirace. Ztráta funkce p53 v nádorové buňce vede k nekontrolovanému růstu, inhibici apoptosu a zpomalení respirace [68].

### **2.3.3.2. Mutace c-Myc**

Mezi onkogeny, u kterých byla nejčastěji popsána mutace spojená se vznikem nádorového bujení u člověka, patří **c-Myc** (onkogen kodující onkoprotein MYC) [69]. MYC reguluje ve zdravé buňce velké množství genů figurujících v buněčném cyklu, metabolismu, mitochondriálních funkcích a apoptose [70]. Narušená regulace genu *c-Myc* nebo jeho zvýšená exprese za normoxických podmínek přispívá k rychlé proliferaci buňky. K Warburgovu efektu přispívá zejména stimulací exprese přenašečů glukosy GLUT a glykolytických enzymů [71]. Onkoprotein MYC také aktivuje transkripci laktátdehydrogenasy (LDH), která katalyzuje redukci pyruvátu na laktát. Tím dochází ke zvýšení produkce laktátu [72]. MYC dále stimuluje metabolismus glutaminu (kap. 2.4.2.), zejména jeho příjem a rychlé zpracování. MYC zvyšuje expresi glutaminových přenašečů do buňky (zejména Slc1a5) [73].

Ovšem za hypoxických podmínek HIF-1 negativně reguluje *c-Myc*, pokles aktivity MYC vyvolá sníženou aktivitu PGC1- $\beta$  (z angl. „peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) co-activator 1- $\beta$ “), faktoru pro mitochondriální biogenezi, a tím dojde k potlačení mitochondriálního vývoje [74].

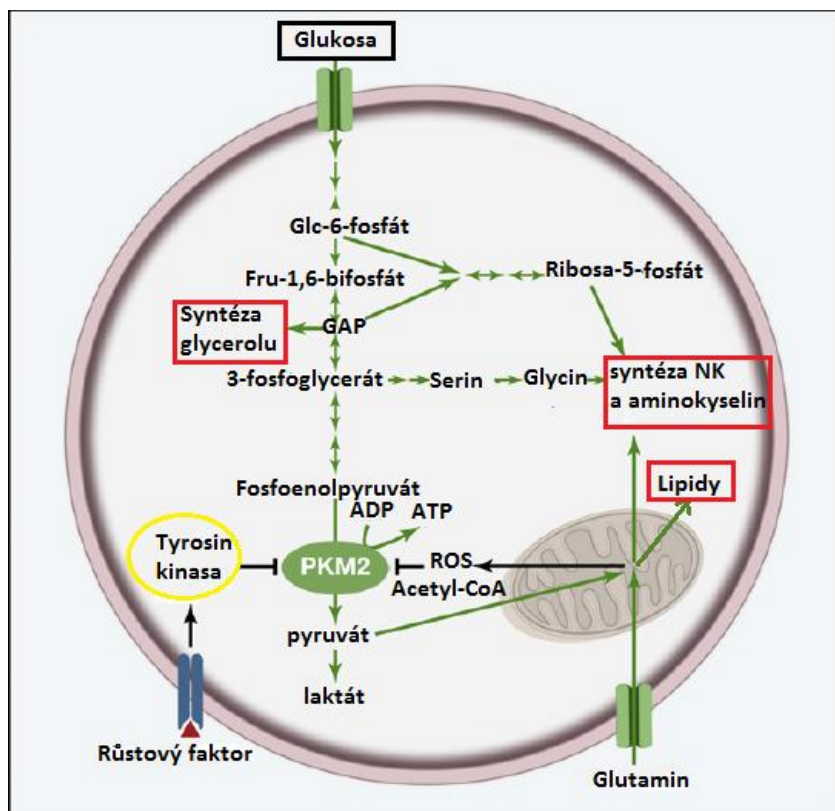
### **2.3.3.3. Aktivace PI3K**

Další častou pozorovanou alterací v buňkách tumoru je aktivace fosfatidyl-inositol-3 kinasy (**PI3K**), která figuruje jako hlavní stimulant aerobní glykolýzy v nádorové buňce. Aktivovaná PI3K generuje protein kinasu B (známá pod zkratkou **Akt**) a Akt působí zejména na zvýšení exprese glukosového transportéru do buňky GLUT 1 a také stimuluje glykolýzu (zejména aktivací hexokinasy) [75]. Akt také ovlivňuje biosyntézu mastných kyselin stimulací aktivity ACL (ATP-citrát lyasa) [76].

#### **2.3.3.4. Záměna isoform pyruvátkinasy**

Zvláštní alterací pozorovanou zejména při aktivaci onkogenu **Ras**, je záměna isoformy enzymu pyruvátkinasy M1 (PKM1) za isoformu M2 (PKM2). Pyruvátkinasa M1 je glykolytický enzym katalyzující přeměnu fosfoenolpyruvátu (PEP) na pyruvát, který se vyskytuje ve většině diferenciováných buněk. Isoforma M2 je přítomna jak buňkách embryonální tkáně, ale i ve většině nádorových buněk [77]. Ačkoliv PKM2 vykazuje nižší enzymatickou aktivitu pro přeměnu PEP na pyruvát než PKM1, přesto proliferující buňky exprimují PKM2 rychleji [78]. Existuje více vysvětlení pro tento paradox, ale pravděpodobně k tomu dochází z důvodu potřeby některých intermediátů glykolýzy k anabolickým procesům [79]. Pomalejší přeměna PEP na pyruvát umožňuje akumulaci např.: 3-fosfoglycerátu, ze kterého je syntetizován serin (a dále glycin), a dalších intermediátů, ze kterých jsou syntetizovány lipidy nebo nukleotidy (Obr. 4, str. 20).

Regulace PKM2 je založena na oscilaci mezi dimerní, méně aktivní formou, a tetramerní, více aktivní formou. Některé studie uvádí, že na regulaci těchto forem se podílí ROS: jejich zvýšená koncentrace uvádí PKM2 do dimerní formy, tím dochází k posílení anabolických procesů. Do neaktivní dimerní formy PKM2 uvádějí i tyrosin kinasy [80]. Naopak navázání fruktosa-1,6-bifosfátu (intermediát glykolýzy) do struktury PKM2 podpoří formaci tetramerů, a tím dojde k obnovení reakce přeměny PEP na pyruvát a zvýšení rychlosti glykolýzy [81].



obr. 4: Metabolismus v nádorové buňce. Výměnou isoformy PKM1 (pyruvátkinasa M1 katalyzující konverzi fosfoenolpyruvátu na pyruvát) za PKM2 (často v rakovinných buňkách) dochází k akumulaci intermediátů glykolýzy (Glc-6-fosfát, GAP, 3-fosfoglycerát) a tím syntéze nukleových kyselin (NK), aminokyselin a lipidů. ROS, tyrosin kinasy a Fru-1,6-bifosfát regulují enzymatickou aktivitu PKM2.

Glc=glukosa, Fru=fruktosa, GAP=glyceraldehyd-3-fosfát, ROS= reaktivní formy kyslíku, NK=nukleové kyseliny.

Převzato z [82].

Aktivita onkogenů nejen reguluje proliferaci buňky, ale také vede ke změně metabolických drah (využití glutaminolýzy, zvýšený příjem glukosy a zintenzivnění glykolýzy a potlačení mitochondriální respirace), které hrají důležitou roli při tumorigenezi [83]. Posílení glykolýzy s potlačenou mitochondriální funkcí totiž buňce poskytuje určité výhody. Intermediáty glykolýzy jsou klíčové pro biosyntézu důležitých sloučenin (např. serinu z 3-fosfoglycerátu, nukleotidů z glukosa-6-fosfátu, lipidů z glyceraldehyd-3-fosfátu) [84]. Dále aktivací PDK-1 dojde k zamezení vstupu pyruvátu do Krebsova cyklu, a tak

vzniká velké množství laktátu, které je odváděno do extracelulárního prostoru. Okyselení prostoru kolem buněk přispívá k proliferaci nádorů zdravou tkání [85].

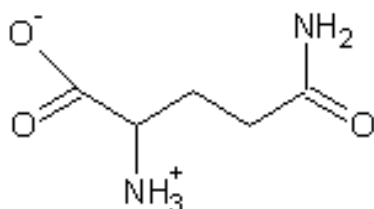
## ***2.4. Energetické substráty pro nádorovou buňku***

Nádorové buňky jsou schopny rychle reagovat a zpracovat exogenní živiny. Existuje ovšem více typů nádorových buněk, které zpracovávají živiny rozdílnými způsoby. Bylo zjištěno, že Warburgův efekt neplatí pro všechny nádorové buňky. L. Reitzer et al. zjistili při výzkumu na HeLa buňkách (z karcinomu děložního čípku), že tyto buňky vyrábí ATP spíše oxidativní fosforylací než glykolýzou [86]. HeLa buňky produkují až 79% ATP oxidativní fosforylací za normoxických podmínek, za hypoxie činí mitochondriální ATP kolem 30% [87]. Některé buňky tumorů (např. karcinomu děložního čípku, prsního a jaterního karcinomu, karcinomu pankreatu) při limitním nedostatku glukosy začaly opět využívat oxidativní fosforylací [88], [89], [90]. U mnoha buněk preferujících oxidativní fosforylací se vyskytuje efektivní zpracování aminokyseliny glutaminu. U HeLa buněk jen 5% glukosy vstupuje do Krebsova cyklu, hlavní roli v oxidačním metabolismu hraje glutamin [86]. Jakým způsobem využívají nádorové buňky živiny pro přežití, závisí zejména na typu buněk, na mutacích onkogenů, a také na množství exogenních substrátů.

U nádorových buněk, které potlačují oxidativní fosforylací, bylo zjištěno, že na inhibici se částečně podílí exogenní hexosy, tento jev se nazývá „Crabtree efekt“ [91], který byl pozorován u všech proliferujících buněk, s výjimkou embryonálních buněk a proliferujících thymocytů [92]. Pokud byla přidána k buněčné kultuře glukosa, fruktosa, glukosa-6-fosfát, fruktosa-6-fosfát, glyceraldehyd-3-fosfát nebo PEP (ale neplatí pro galaktosu) [93], byl pozorován okamžitý přesmyk z OXPHOS na aerobní glykolýzu za současné produkce laktátu a inhibice respirace [93], [94]. Molekulární mechanismus „Crabtree efektu“ je nejasný, ale bylo zjištěno, že při přidání jedné z hexos uvedených výše, dochází ke snížení poměru ATP/ADP, akumulaci některých glykolytických intermediátů (glukosa-6-fosfátu, fruktosa-6-fosfátu a fruktosa-1,6-bifosfátu) a zvýšené koncentraci laktátu [93]. Jedno z možných vysvětlení našli Diaz-Ruiz et al. při experimentu na kvasinkách, kde fruktosa-1,6-bifosfát inhibovala komplexy respiračního řetězce [95].

Při pěstování nádorových buněčných linií se nejčastěji užívají jako exogenní substráty pro proliferaci a přežití buněk glukosa (nebo další hexosy), pyruvát a glutamin (dále běžné složky médií, např.: vitamíny, aminokyseliny, minerály, pufovací složky atd.)

### 2.4.2. Glutamin

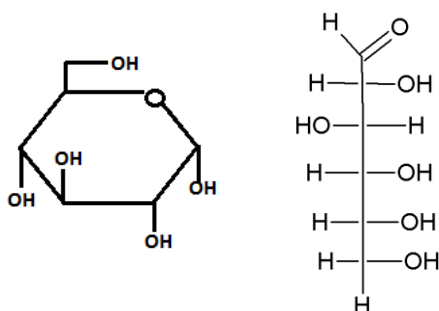


Obr. 5: Strukturální vzorec glutaminu.

Glutamin (obr. 5), neesenciální aminokyselina, hraje v metabolismu nádorové buňky významnou úlohu. Bylo zjištěno, že glutamin v mnoha tumorech je přijímán a zpracováván mnohokrát rychleji ve srovnání s ostatními aminokyselinami [96]. Tato aminokyselina se podílí na zvýšení proliferace a růstu buňky, slouží jako zdroj uhlíku a dusíku pro biosyntetické reakce v procesu glutaminolýzy.

Glutamin vstupuje do buňky díky transportérům ASCT2 a SN2, poté je mitochondriální glutaminasou přeměněn na glutamát a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a nakonec je transaminován glutamátdehydrogenasou (GDH) na  $\alpha$ -ketoglutarát [86], [97]. Takto plní glutamin úlohu substrátu pro Krebsův cyklus, který by kvůli únikům citrátu nemohl probíhat (viz kap. 2.5.). Dále glutamin figuruje jako donor dusíku potřebného pro biosyntézu některých aminokyselin (threonin, glycin, serin, cystein, prolin) a také purinů a pyrimidinů [98]. Regulace glutaminolýzy je v mnoha tumorech spojena s deregulací *c-MYC* genu [73].

### 2.4.3. Glukosa



Obr. 6: Cyklická (vlevo) a necyklická (vpravo) struktura glukosy.

Glukosa (obr. 6, str. 22) vstupuje nejčastěji do buňky pomocí integrálních membránových transportérů GLUT (nebo také SLC2A), kterých existuje celkem 14 typů, dle specifity a lokalizace. Nejzásadnější roli pro transport glukosy hrají GLUT-1 až GLUT-4.

GLUT-1 (SLC2A1) se vyskytuje v mnoha tkáních [99], avšak nejvyšší exprese GLUT-1 byla zaznamenána v erytrocytech, neuronech a v buňkách placenty [100]. GLUT-1 má vyšší afinitu ke glukose ( $K_m=1-2$  mmol/L) než k ostatním hexosam, avšak je schopen transportovat do buňky i mannosu a galaktosu. Zvýšená exprese GLUT-1 byla pozorována v mnoha tumorech [101].

GLUT-2 (SLC2A2) byl nalezen převážně v játrech, pankreatických  $\beta$ -buňkách a epitelu tenkého střeva [102]. Zvláštností GLUT-2 je obousměrný transport hexos (převážně glukosy, galaktosy, mannosy, fruktosy ale i glukosaminu) [103] a dále regulace GLUT-2 hormony a koncentrací hexos [104]. Defekt exprese transportéru GLUT-2 je spojena s cukrovkou typu I.

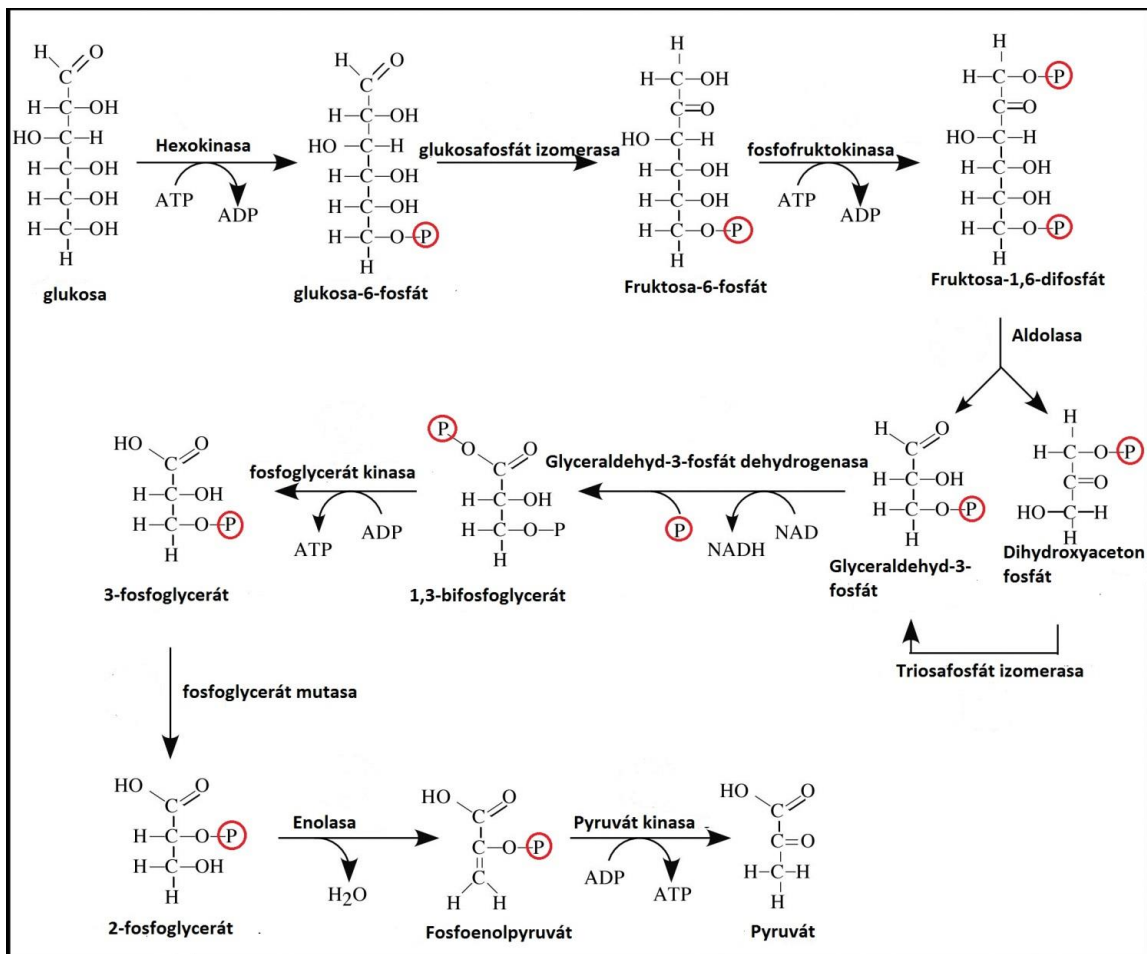
GLUT-3 (SLC2A3) je exprimován zejména v neuronech [103], v menší míře pak v tukové tkáni, ledvinách, srdci, placentě, játrech a bílých krvinkách [105]. Mimo glukosy, pro kterou má GLUT-3 vyšší afinitu ( $K_m=1,8$  mmol/L), přenáší i xylosu, maltosu, dehydroaskorbát, mannosu a galaktosu [106].

GLUT-4 (SLC2A4) transportuje do buněk až 50% celkové glukosy v těle díky vysoké afinitě ke glukose ( $K_m=5-6$  mmol/L). Vysoká exprese GLUT-4 byla zaznamenána ve tkáních senzitivních na hormon insulin: kosterní svalstvo, srdce a tuková tkáň [103]. Mutace genu pro GLUT-4 je spojována se vznikem cukrovky.

GLUT-1 a 3 jsou stimulovány onkoproteiny jako MYC a Ras, dále PI3K/Akt signalizací a také faktorem HIF [71].

V cytosolu buňky je glukosa zpracována procesem glykolýzy (obr. 7, str. 24), na kterém se podílí velké množství enzymů, které jsou v procesu karcinogeneze regulovány onkogeny (kap. 2.3.3.).

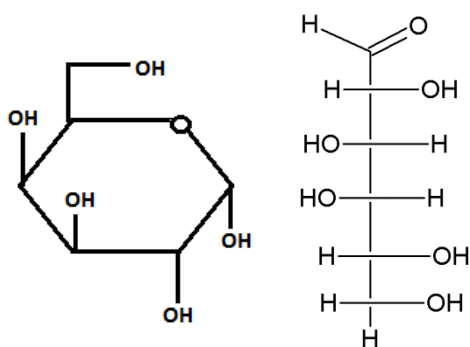




Obr. 7: Schéma glykolýzy.

Převzato z: <http://courses.bio.indiana.edu/L104-Bonner/F11/imagesF11/L17/MPs.html>

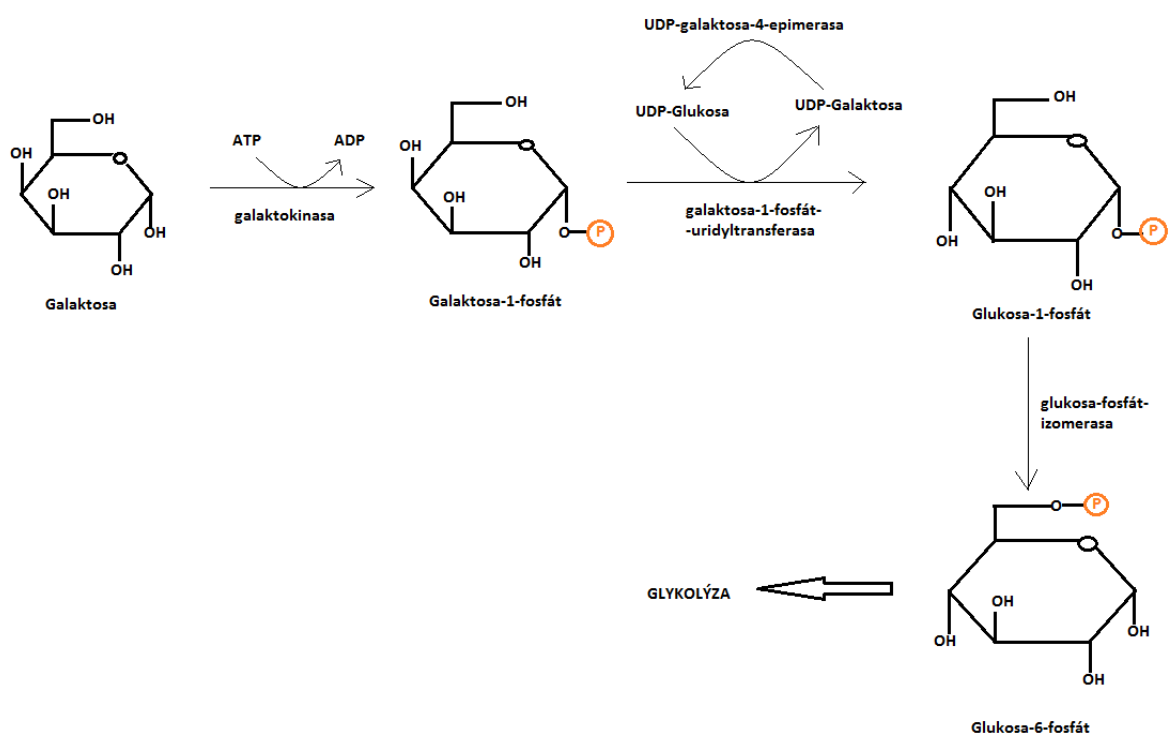
#### 2.4.4. Galaktosa



Obr. 8: Cyklická (vlevo) a necyklická (vpravo) struktura galaktosy.

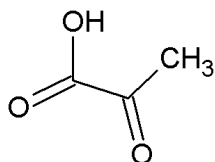
Galaktosa (obr. 8) vstupuje do buňky integrálními membránovými transportéry zejména skupiny GLUT, konkrétně GLUT-1, GLUT-2 GLUT-3 a GLUT-10 [103], [106]. Po vstupu do buňky je molekula galaktosy fosforylovaná galaktokinásou a poté je

přeměněna na glukosa-1-fosfát za účasti UDP-Glukosy. Glukosa vstupuje do glykolýzy až po izomerizaci na glukosa-6-fosfát (obr 9). Kvůli těmto krokům je galaktosa zpracována buňkou mnohem menší rychlostí ve srovnání s glukosou. Nádorová buňka, která má k dispozici galaktosu (a ne glukosu), využívá jako majoritní energetický zdroj glutamin k růstu a přežití [86], [107]. Např.: buňky HeLa rostoucí v médiu s obsahem galaktosy (=médiu s dialyzovaným sérem, tím je zbaven glukosy, a dalším energetickým substrátem je glutamin) produkují až 98% ATP oxidačním metabolismem glutaminu, pouhé 2% ATP pocházejí z glykolýzy [86]. Intermediáty glykolýzy, která probíhá pomalu, využívá buňka spíše k biosyntéze nukleotidů (pentosa fosfátový cyklus).



Obr. 9: Metabolismus galaktosy.

### 2.4.5. Pyruvát



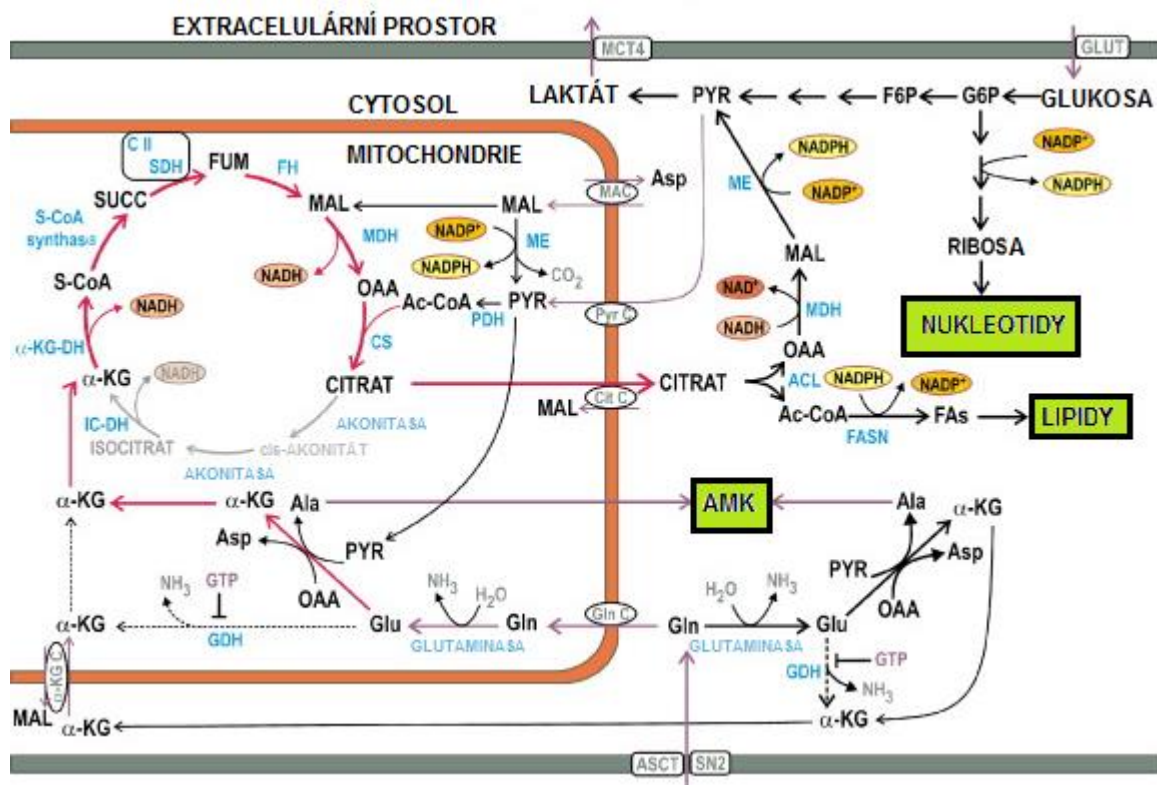
Obr. 10: Strukturní vzorec pyruvátu.

Pyruvát (obr. 10) hraje v metabolismu buňky roli ústřední sloučeniny, která vzniká jako poslední produkt glykolýzy a dále může být redukována na laktát (časté u nádorových buněk) [86]. Další možností je oxidativní dekarboxylace (enzymový komplex PDH), kterou je přeměněn na Acetyl-CoA (a dále pokračuje do Krebsova cyklu, který u nádorových buněk slouží i k produkci citrátu, ze kterého jsou syntetizovány lipidy) [108].

## ***2.5. Metabolismus nádorové buňky za normoxických podmínek***

Nádorová buňka využívá glukosu (aerobní glykolýzou) většinou k produkci energie i k biosyntetickým procesům [60]. K biosyntéze aminokyselin (AMK) je využit především pyruvát a glutamát transaminačními reakcemi. K biosyntéze lipidů je využit citrát, intermediát Krebsova cyklu, který je exportován z mitochondrie do cytosolu, kde probíhá syntéza lipidů. Pomocí ACL (ATP-citrát lyasa) je citrát přeměněn na oxalacetát (OAA) a Acetyl-CoA, který je prekursorem syntézy lipidů [108]. Dochází tak neustálému úniku citrátu z Krebsova cyklu, který je v metabolismu buňky klíčový. Bylo zjištěno, že pro mnohé proliferující buňky glutamin slouží jako anaplerotický substrát [110]. Citrát vzniká v Krebsově cyklu reakcí Acetyl-CoA a OAA katalyzovanou citrátsynthasou. Při podání značeného glutaminu a glukosy do média buněk pocházejících z glioblastomu, bylo zjištěno, že hlavním zdrojem OAA je glutamin, zatímco Acetyl-CoA vzniká glykolýzou [110]. Takto probíhající utilizace glutaminu je možná jen za neúplné inhibice PDH (tedy ne za hypoxie). OAA vzniklý rozštěpením citrátu enzymem ACL, je konvertován na malát (MAL) pomocí malátdehydrogenasy (MDH) a ten je přeměněn malickým enzymem (ME) na pyruvát. ME generuje reakcí NADPH, který je hojně využíván při syntéze lipidů. MDH ke své reakci potřebuje NADH, který je v cytosolu přítomen díky glykolýze. Přebytečný pyruvát je u většiny nádorových buněk redukována na laktát [86].

Glukosa, jako další zdroj energie, je glykolýzou přeměněna na pyruvát, který bývá buď redukována LDH na laktát, nebo oxidační dekarboxylací PDH přeměněn na pyruvát. Ovšem záleží na druhu tumoru, vysoce glykemické buňky většinu pyruvátu konvertují na laktát, který vyloučí do extracelulárního prostoru. Např.: HeLa buňky nebo buňky osteosarkomu, pěstovány se zdrojem energie glukosou, vyloučí až 40 krát více laktátu než zdravé buňky [111]. Intermediát glykolýzy glukosa-6-fosfát je využit pro tvorbu nukleotidů, pentosa fosfátovým cyklem, který je významným zdrojem NADPH. ATP pro buňku zajišťuje v tomto modu OXPHOS. Celé schéma je vyobrazeno na obr. 11, str. 27.



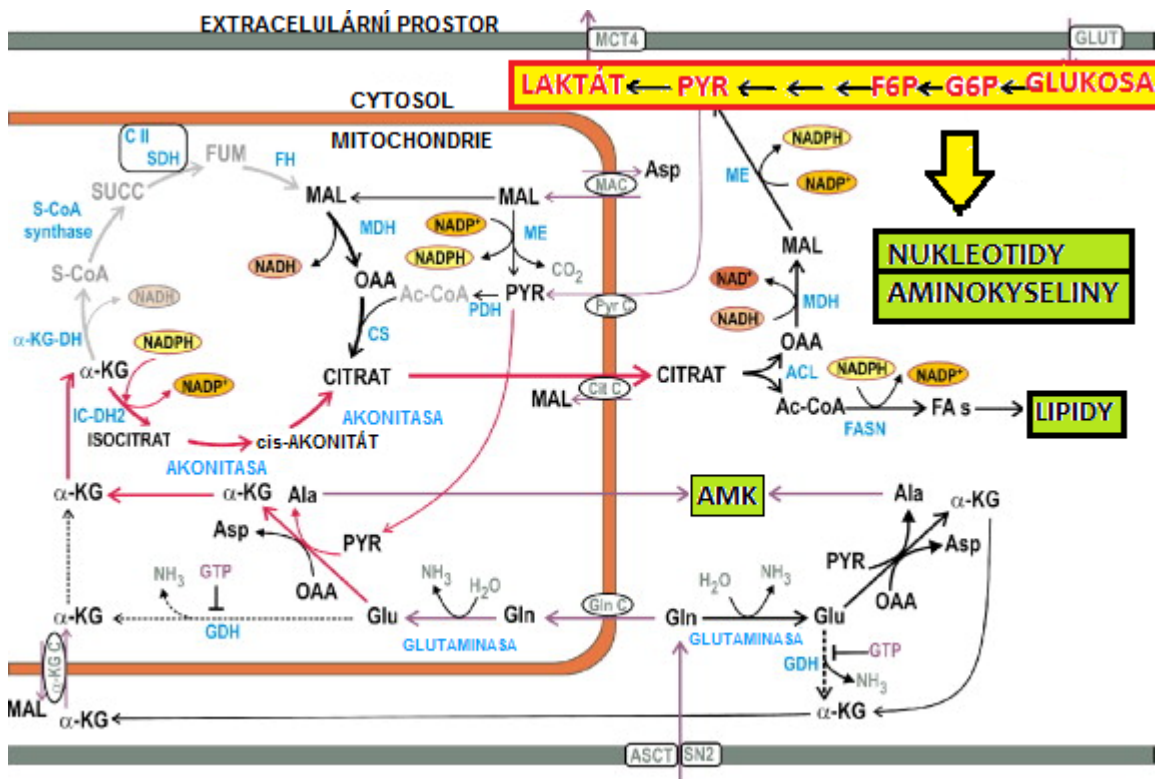
Obr. 11: Metabolismus nádorové buňky za normoxických podmínek.

Převzato z [112].

## 2.6. Metabolismus nádorové buňky za extrémních hypoxických podmínek

Aby buňka přežila v podmínkách extrémní hypoxie nebo anoxie, musí „přepnout“ energetický metabolismus, který bude nezávislý na OXPHOS a respiraci, nejen z důvodu nízkého  $pO_2$ , ale i z důvodu inhibice pyruvátdehydrogenasového komplexu (PDH). Tento mód využívá pouze dva enzymy Krebsova cyklu, který probíhá v opačném směru od  $\alpha$ -ketoglutarátu reduktivní karboxylací po citrát [113]. Exogenní glutamin je přeměněn glutaminasou na glutamát a dále GDH na  $\alpha$ -ketoglutarát, který vstupuje do reversního Krebsova cyklu. Mitochondriální IDH-2 (NADPH-dependentní isocitrátdehydrogenasa) přeměňuje  $\alpha$ -ketoglutarát na isocitrát, a dále reversní akonitasa produkuje z isocitrátu citrát, který je nezbytný při biosyntéze mastných kyselin (FASN) a lipidů. NADPH potřebný pro syntézu lipidů je čerpán z reakce zprostředkované malickým enzymem (ME), který přeměňuje malát (MAL) na pyruvát a dále také NADPH vzniká pentosa fosfátovým cyklem. Aminokyseliny (AMK) jsou syntetizovány z intermediátů glykolýzy nebo

z pyruvátu a glutamátu transaminačními reakcemi. Glykolýza zajišťuje v tomto módu hlavní zdroj ATP a „stavebních kamenů“ [112] (Obr. 12).



Obr. 12: Schéma metabolismu za extrémních hypoxických podmínek. Ve žlutém poli je majoritní dráha produkce ATP a nukleotidů a aminokyselin.

Převzato z [112].

Koexistence obou módů popsaných výše (obr. 11, str. 27 a obr. 12) je možná, zejména tato kombinace bývá využívána buňkami přežívajícími za **mírné hypoxie**. Obecně však platí, že buňky s dostatečným přísunem kyslíku většinou používají dráhy popsané při normoxických podmínkách (obr. 11) a buňky vyskytující se v extrémní hypoxii nebo anoxii využívají 2. typ metabolismu (obr. 12) směřovaný k minimální spotřebě kyslíku [112].

### **3. Cíl práce**

- Provéřit energetický metabolismus buňky v závislosti na energetickém zdroji v hypoxii a normoxii.

## **4. Použitý materiál**

### ***4.1. Přístroje***

Box s laminárním prouděním vzduchu Hera Safe (Thermo Scientific)  
CO<sub>2</sub> inkubátor (Innova CO-170 New Brunswick Scientific)  
Plynový kahan (Gasprofi)  
Lázeň s termostatem (Julabo)  
Centrifuga (Hermle Z323K)  
Mikroskop (Leica)  
Automatická počítáčka buněk (Invitrogen)  
Hypoxický box pro kultivaci i „pasážování“ (Ruskin Technology)  
Oxygraf-2K (Oroboros Instruments s operačním systémem DatLab)  
Centrifuga (Hermle Z323K)  
Elektroforetická aparatura (Bio Rad)  
Aparatura pro Western blot (Hoefer Scientific)  
Zdroj napětí (Enduro)  
Vortex (Biosan)  
Laboratorní váha (Mettler Toledo)  
Stolní spektrofotometr (Eppendorf)  
Termoblok (Bioer MB-102)  
Válcový rotátor (Stuart)  
Image Reader LAS-1000 (Fujifilm)  
Fluorescenční/absorpční čtečka destiček (BioTek) s operačním systémem Gent 5  
Centrifuga (Eppendorf 5417 R)

### ***4.2. Experimentální model***

Jako experimentální model sloužila buněčná linie HepG2 (lidská buněčná linie karcinomu jater). (zdroj: Fyziologický ústav AV ČR).

### **4.3. Chemikálie a nástroje**

#### **4.3.1. Tkáňové kultury:**

Plastové kultivační misky a lahve 25, 70, 150 cm<sup>2</sup> (Orange Scientific)

Pipetovací nástavec (Hirschmann Laborgerate)

Sterilní jednorázové plastové pipety (Orange Scientific)

Automatické pipety s plastovými špičky 2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl (Orange scientific)

Trypanová modř (Invitrogen)

Počítací komůrky (Invitrogen)

Mikrozkumavky (Orange Scientific)

Plastové zkumavky 15, 50 ml (Orange Scientific)

Trypsin (Zdroj Ústav molekulární genetiky AV ČR =UMG)

PBS (UMG)

Pyruvát (pyruvát sodný) (UMG)

Glukosa (UMG)

HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina) (UMG)

Antibiotika-streptomycin + penicilin (Sigma Aldrich)

Glutamin (UMG)

Galaktosa (UMG)

Fetální hovězí sérum (Gibco, Invitrogen)

Fetální hovězí sérum dialyzované (Biochrom)

DMEM (zkr. z angl. „Dulbecco’s Modified Eagle’s medium“) (UMG)

Hydrogenuhlíčan sodný NaHCO<sub>3</sub> (UMG)

#### **4.3.2. Média**

Pro pěstování buněčných kultur byla používána média, která obsahovala vždy DMEM, 10mM HEPES, NaHCO<sub>3</sub>, pyruvát (pyruvát sodný), glutamin, esenciální a neesenciální aminokyseliny, fetální hovězí sérum, antibiotikum (kombinace penicilinu a streptomycinu), destilovanou vodu. Dále byly přidávány dvě různé hexosy (glukosa a galaktosa). Do médií s přidanou galaktosou bylo užito 10% fetální hovězí sérum dialyzované, zbavené glukosy. (Buňky byly nejprve všechny dodány v médiu obsahující 5mM glukosu, a až při první „pasáži“ byly vloženy do média obsahující 10mM galaktosu a















dialyzované sérum. Buňky po třetí „pasáži“ byly zamraženy a až poté se s nimi pracovalo.) Dle tabulky 1 a obr. 13, str. 33 byly využívány i média bez obsahu pyruvátu, anebo pyruvátu a glutaminu zároveň. Celkově byly buňky pěstovány v devíti různých médiích v normoxii a též v hypoxii.

Hexosa v médiu	Chybějící složka v médiu	užívaná zkratka pro médium
5mM glukosa („glykemická média“ a „buňky glykemické“)	kompletní médium	"5mM Glc K."
	pyruvát	"5mM Glc -pyr"
	pyruvát a glutamin	"5mM Glc -pyr -gln"
25mM glukosa („hyperglykemická média“ a „buňky hyperglykemické“)	kompletní médium	"25mM Glc K."
	pyruvát	"25mM Glc -pyr"
	pyruvát a glutamin	"25mM Glc -pyr -gln"
10mM galaktosa („galaktosová média“ a „buňky galaktosové“)	kompletní médium	"Gal K."
	pyruvát	"Gal -pyr"
	galaktosa	"Galaktosové bez Gal"

Tabulka 1: Přehled médií, která byla užívaná pro kultivaci buněk HepG2. Druhy médií jsou rozděleny dle hexosy v médiu (5mM Glc, 25mM Glc a 10mM Gal) a dle chybějící složky v médiu. Dále je uvedena u každého média zkratka, která je užívána v celé diplomové práci.

Užívaná značení v grafech pro jednotlivá kultivační média:

NORMOXIE=NMX		HYPOXIE=HPX	
5mM Glc K/NMX		5mM Glc K/HPX	
5mM Glc -pyr/NMX		5mM Glc -pyr/HPX	
5mM Glc -pyr -gln/NMX	-	5mM Glc -pyr -gln/HPX	-
25mM Glc K/NMX		25mM Glc K/HPX	
25mM Glc -pyr/NMX		25mM Glc -pyr/HPX	
25mM Glc -pyr -gln/NMX	-	25mM Glc -pyr -gln/HPX	-
Gal K/NMX		Gal K/HPX	
Gal -pyr/NMX		Gal -pyr/HPX	
Galaktosové -Gal/NMX	-	Galaktosové -Gal/HPX	-

Obr. 13: Užívaná značení v grafech (ve výsledkové části práce) pro jednotlivá média. Modrá barva vždy značí 5mM Glc média, zelená barva 25mM Glc média a červená barva média s obsahem galaktosy. Plně barevné sloupce v grafech patří vždy kompletním médiím v normoxii. Kompletní média v hypoxii značí výplň grafu tečkami. Vodorovné pruhy patří médiím bez pyruvátu v normoxii a kostkovaná výplň médiím bez pyruvátu v hypoxii. Média glykemická a hyperglykemická bez pyruvátu a glutaminu jsme nevyznačovali (taktéž galaktosové bez galaktosy), protože jsme s těmito médii nepracovali, buňky nebyly schopny proliferace v těchto médiích. (viz. kapitola 6.1.)

#### 4.3.2.1. Složení médií:

##### Glykemická média (5mM glukosa)

- 1.) *Kompletní médium (dále jen „5mM Glc K.“)* : DMEM, 10% fetální hovězí sérum, 10mM HEPES, NaHCO<sub>3</sub>, 5mM glukosa, 1mM pyruvát, 3mM glutamin, antibiotikum (penicilin + streptomycin).
- 2.) *Médium bez pyruvátu (dále jen „5mM Glc -pyr“)*: DMEM, 10% fetální hovězí sérum, 10mM HEPES, NaHCO<sub>3</sub>, 5mM glukosa, 3mM glutamin, antibiotikum (penicilin + streptomycin).

- 3.) *Médium bez pyruvátu a glutaminu (dále jen „5mM Glc -pyr -gln“)*: DMEM, 10% fetální hovězí sérum, 10mM HEPES, NaHCO<sub>3</sub>, 5mM glukosa, antibiotikum (penicilin + streptomycin).

#### *Hyperglykemická média (25mM glukosa)*

- 1.) *Kompletní médium (dále jen „25mM Glc K.“)*: DMEM, 10% fetální hovězí sérum, 10mM HEPES, NaHCO<sub>3</sub>, 25mM glukosa, 1mM pyruvát, 3mM glutamin, antibiotikum (penicilin + streptomycin).
- 2.) *Médium bez pyruvátu (dále jen „25mM Glc -pyr“)*: DMEM, 10% fetální hovězí sérum, 10mM HEPES, NaHCO<sub>3</sub>, 25mM glukosa, 3mM glutamin, antibiotikum (penicilin + streptomycin).
- 3.) *Médium bez pyruvátu a glutaminu (dále jen „25mM Glc - pyr - gln“)*: DMEM, 10% fetální hovězí sérum, 10mM HEPES, NaHCO<sub>3</sub>, 25mM glukosa, antibiotikum (penicilin + streptomycin).

#### *Galaktosová média (s 10mM galaktosou)*

- 1.) *Kompletní médium (dále jen „Gal K“)*: DMEM, 10% fetální hovězí sérum dialyzované, 10mM HEPES, NaHCO<sub>3</sub>, 10mM galaktosa, 1mM pyruvát, 3mM glutamin, antibiotikum (penicilin + streptomycin).
- 2.) *Médium bez pyruvátu (dále jen „10mM Gal - pyr“)*: DMEM, 10% fetální hovězí sérum dialyzované, 10mM HEPES, NaHCO<sub>3</sub>, 10mM galaktosa, 3mM glutamin, antibiotikum (penicilin + streptomycin).
- 3.) *Médium bez galaktosy (dále jen „Galaktosové - Gal“)*: DMEM, 10% fetální hovězí sérum dialyzované, 10mM HEPES, NaHCO<sub>3</sub>, 1mM pyruvát, 3mM glutamin, antibiotikum (penicilin + streptomycin).

### **4.3.3. SDS PAGE a Western blot**

Automatické pipety 2μl, 10μl, 100μl, 200μl, 1000μl, 5ml a 10ml (Eppendorf Research)

Jednorázové plastové špičky (Orange Scientific)

Plastové stěrky (Orange Scientific)

Plastové zkumavky (Orange Scientific)

Mikrozkumavky (Orange Scientific)

Fenylmethansulfonylfluorid PMSF (Sigma Aldrich)  
Hovězí sérový albumin BSA (Sigma Aldrich)  
BCA (Sigma Aldrich)  
Síran měďnatý CuSO<sub>4</sub> (ÚMG)  
Glycerol (Lach-Ner)  
Dodecyl síran sodný SDS (Sigma-Aldrich)  
Chlorid sodný NaCl (Sigma-Aldrich)  
Kyselina ethylendiamintetraoctová EDTA (Sigma-Aldrich)  
Triton TX-100 (Sigma-Aldrich)  
Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan) (Sigma-Aldrich)  
Kyselina chlorovodíková HCl (Penta)  
Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich)  
2-Merkaptoetanol (Sigma-Aldrich)  
Akrylamid (Sigma-Aldrich)  
Bis-akrylamid (Sigma-Aldrich)  
persulfát amonný APS (Sigma-Aldrich)  
*N,N,N,N*-tetramethylethylendiamin TEMED (Sigma-Aldrich)  
Isopropanol (Penta)  
Glycin (Sigma-Aldrich)  
Polyvinyliden difluoridové (PVDF) membrány (Bio-Rad)  
Metanol (Penta)  
Tween-20 (polysorbát 20) (Sigma-Aldrich)  
Nízkotučné mléko v prášku (Promil)  
Standard molekulové hmotnosti proteinů (Amersham)  
Primární protilátky: Anti-phospho-PDHE1-A type I polyklonální (Millipore)  
Anti-PDH subunit E1 alfa monoklonální (Invitrogen)  
Anti-Tim23 monoklonální (BD Biosciences)  
Anti-HIF- $\alpha$  monoklonální (BD Bioscience)  
Anti- $\beta$  actin monoklonální (Abcam)  
Sekundární protilátky: Anti-rabbit IgG (Sigma-Aldrich)  
Anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich)  
Luminol (Amersham)  
Coomasie blue (Serva)

Kyselina octová (Penta)

Etanol (Penta)

#### **4.3.4. Test produkce laktátu**

Lactate Assay Kit K607-100 (bioVision)

Mikrozkumavky s mikrofiltry do 10kDa (Millipore)

96 jamková destička (Orange Scientific)

#### **4.3.5. Vysokorezoluční respirometrie**

Etanol (Penta)

Karbonylkyanid-*p*-trifluoro-methoxyfenylhydrazon FCCP (Sigma-Aldrich)

Oligomycin (Sigma-Aldrich)

Kyanid draselný KCN (Sigma-Aldrich)

## **5. Metody**

### ***5.1. Pěstování buněčné kultury za normoxických podmínek***

Buňky z lidské nádorové linie HepG2 byly kultivovány při 37°C v 5% CO<sub>2</sub> a 20,9% O<sub>2</sub> na kultivačních miskách nebo lahvích v inkubátoru. Pro udržení vlastností buněk byly každé 3-4 dny „pasážování“, většinou dosahovaly 80-90% konfluence. „Pasážování“ buněk bylo prováděno následovně: v první fázi odsátí živného média z kultivační nádoby a následné promytí buněk pomocí PBS. Dále působením trypsinu (cca 5 min v 37°C) byly buňky uvolněny ze dna nádoby, účinky trypsinu byly zastaveny přidáním stejného objemu čerstvého média. Opakovaným nasáváním suspenze pipetou byly vzniklé shluky buněk rozděleny. Následně byly buňky v požadované hustotě (pro zjištění počtu buněk byla užitá automatická počítací komůrka) přemístěny do nové kultivační nádoby v čerstvém médiu.

Počítání buněk probíhalo následovně: pomocí automatické pipety bylo odebráno do mikrozkušavky 10μl trypanové modři a k tomu bylo přidáno 10μl suspenze buněk v médiu s trypsinem (po suspendování pipetou na jednotlivé buňky). Směs barviva s buňkami byla pečlivě promíchána nasáváním do špičky pipety. Poté bylo z toho odebráno 10μl, které byly nanесeny do počítací komůrky. Pomocí automatické počítací komůrky bylo spočteno, kolik buněk je obsaženo v 1 ml suspenze.

### ***5.2. Pěstování kultury za hypoxických podmínek***

V naší laboratoři byly pro buňky HepG2 stanoveny hypoxické podmínky zahrnující 5% O<sub>2</sub> a 5% CO<sub>2</sub>. Podmínky byly stanoveny na základě toho, že tyto buňky ve tkáni normálně přežívají za 5% O<sub>2</sub> (toto je jejich normoxická fyziologická hladina: viz. kap. 2.1.) Ale jelikož jsou tyto buňky pěstovány v buněčné kultuře, za atmosférického tlaku a 20,9% O<sub>2</sub>, tak se postupnou adaptací pro ně stala hladina 20,9% O<sub>2</sub> normoxická.

„Pasážování“ buněk za hypoxických podmínek probíhá stejným postupem jako za podmínek normoxických, v hypoxickém boxu, který lze využít jak pro „pasážování“ buněk, tak pro kultivaci, protože je v něm udržována stálá teplota 37°C a koncentrace O<sub>2</sub>. Pro experimenty jsou buňky ponechány v hypoxii alespoň po dobu 3 dnů, což je doba, za kterou se buňky HepG2 adaptují na hypoxické podmínky. V laboratoři jsme stanovili tuto dobu na základě ustálení změn mitochondriální dynamiky.

Složení PBS: NaCl 8 g; KCl 0,2 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,53 g; Destilovaná H<sub>2</sub>O do 1000 ml; pH = 7,2

Trypsin: koncentrace 5mg/ml (rozpuštěn v EDTA).

### 5.3. Generační doba buněk

Generační doba buněk (=doba potřebná k vytvoření další generace buněk) je důležitým ukazatelem rychlosti proliferace buněk a také schopnosti adaptace buněk na prostředí (zejména hypoxické). Určení generační doby se prakticky provádí „nasetím“ buněk do kultivační nádoby o určité hustotě (počet buněk  $N_0$  v čase  $t_0$ ) a opětovným počítáním buněk po určité době kultivace při 37°C (počet buněk  $N_t$  v čase  $t$ ).

Výpočet generační doby (g):

$$ng = \frac{(\log_{10} N_t) - (\log_{10} N_0)}{\log_{10} 2}$$

ng = počet generací v čase t  
 $N_t$  = Počet buněk v čase t  
 $N_0$  = Počet buněk v čase  $t_0$   
g = generační doba (hod)  
t = čas (hod)

### 5.4. Elektroforéza a Western blot

#### 5.4.1. Příprava vzorků pro elektroforézu

Po třídní inkubaci v normoxických/hypoxických podmínkách byly buňky odděleny ode dna láhve pomocí stěrky (bez odsátí média) a rychle přemístěny pomocí pipety do zkumavky s uzávěrem. Po dobu „seškrabávání“ dalších buněk byly zkumavky chlazeny ledem, aby bylo znemožněno působení proteas a dalším degradačním procesům. Zkumavky se suspenzemi byly stočeny po dobu 10 min (4°C, 300g) v centrifuze. Po odsátí média byly buňky promyty v PBS a znovu stočeny při stejných podmínkách. Po důkladném odsátí PBS byl pelet rozpuštěn v lyzačním pufru (cca 400μl na střední láhev s 80% konfluencí) a celá suspenze přenesena do mikrozukavky. Po 30 minutách probíhající lyzace buněk (na ledu) byly mikrozukavky stočeny po dobu 20 min (4°C, 5000 g) v centrifuze. Vzniklý supernatant byl odebrán a rozdělen na alikvoty, které byly s 10% glycerolem uchovány při -20°C.

Metodou BCA bylo zjištěno množství proteinu v jednotlivých supernatantech. Jako standard pro vytvoření kalibrační přímky byl použit hovězí sérový albumin (BSA). Do mikrozkušavek bylo pipetováno 0, 5, 10, 20, 30, 40 a 50  $\mu\text{l}$  roztoku BSA (1mg/ml) a doplněno do 100 $\mu\text{l}$  vodou. Pro zjištění koncentrace proteinu bylo vždy odebráno 5 a 10  $\mu\text{l}$  z každého supernatantu lyzátu buněk a doplněno na 100  $\mu\text{l}$  vodou. Poté byla namíchána směs BCA a 0,25M  $\text{CuSO}_4$  v poměru 50:1, pro spuštění kolorimetrické reakce. Do každé mikrozkušavky (se standardy BSA i supernatanty) byl přidán 1 ml této směsi a 30 minut ponecháno při 37°C v inkubátoru. Směsi se po tuto dobu zbarvily do fialovo-zeleného odstínu, dle koncentrace proteinu ve vzorku. Směsi byly spektrofotometricky proměřeny při 562 nm. Z hodnot standardů BSA byla sestavena kalibrační křivka (závislost hmotnosti (mg) na absorbanci), a z rovnice regrese byly určeny hmotnosti (a poté hmotnostní koncentrace (mg/ml) proteinu ve vzorcích. Hodnoty koncentrací z téhož vzorku (vzorek s 5 a 10  $\mu\text{l}$  supernatantu) byly zprůměrovány. Nakonec bylo vypočteno množství supernatantu, které bylo naředěno vodou a následně smícháno s 2x koncentrovaným vzorkovým pufrům (se 4% 2-merkaptoetanolem) do objemu 30 $\mu\text{l}$ , tak aby koncentrace celkového proteinu činila 1mg/ml a vzorkový pufr byl v konečné směsi 1x koncentrovaný. Celá směs byla inkubována 20min při 90°C.

Složení pufrů:

**Lyzační pufr:** 50mM HEPES, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton TX-100,  $\text{H}_2\text{O}$ , úprava na pH 7,4 + 1mM PMSF

**Vzorkový pufr (1x):** 50mM Tris (6,8 pH), 15% glycerol, 0,002% bromfenolová modř, 3% SDS

#### 5.4.2. Elektroforéza (SDS-PAGE)

Nejdříve byl připraven separační gel (tabulka 2, str. 40). Hustota gelu byla určena dle hmotnosti požadovaného proteinu. Pro detekci Tim 23 byl použit 12% gel (23kDa), pro určení PDH (komplex pyruvátdehydrogenasy), p-PDH (fosforylovaná forma PDH) (43kDa) a  $\beta$ -aktinu (42 kDa) byl použit 10% gel a HIF-1 $\alpha$  (120kDa) byl pozorován nejlépe na 8% separačním gelu. 7,5 ml separačního gelu bylo nalito mezi skla a převrstveno isopropanolem. Po 20 minutách tuhnutí gelu byl isopropanol vysušen a přelit vrstvou zaostřovacího gelu (2,5 ml) (složení v tabulce 3, str. 41) s hřebínkem. Po 10 minutách byl hřebínek vyjmut z gelu a skla s oběma gely zasazeny do aparatury



s elektrodami v elektroforetické nádobě. Celá nádoba byla zalita elektroforetickým pufrům. Do vzniklých „jamek“ po hřebínku v zaostřovacím gelu bylo nanášeno pipetou s úzkou špičkou 30 µl vzorku proteinu se vzorkovým pufrům (viz kapitola 5.4.1.) a také standard proteinové hmotnosti. Dále byly připojeny elektrody ke zdroji proudu (15mA/gel), dále po cca 30 minutách, kdy proteiny s nejnižší hmotností dosáhly hranice separačního gelu, byl proud zvýšen na 30mA/gel. Proteiny jsou unášeny gelem směrem k anodě různou rychlostí, dle hmotnosti (nejmenší putují gelem nejrychleji, mají menší odpor než velké proteiny). SDS je detergent (obsažen ve vzorkovém pufru i gelu), který všem proteinům uděluje záporný náboj a tak všechny proteiny putují směrem ke kladné elektrodě: anodě.

**Složení separačního gelu 10%:** 10% Akrylamid/Bis-akrylamid, 400mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,04% TEMED, H<sub>2</sub>O.

Složení separačního gelu 12% a 8% se liší od 10% pouze v obsahu Akrylamid/Bis-akrylamidu a vody. (přesné objemy jsou uvedeny v tabulce 2.)

**Složení separačního gelu (celkový objem 10ml):**

Složka gelu:	Objem jednotlivých složek pro <b>8% gel:</b>	Objem jednotlivých složek pro <b>10% gel:</b>	Objem jednotlivých složek pro <b>12% gel</b>
30% Akrylamid/Bis-akrylamid	2,66 ml	3,33 ml	4 ml
1M Tris-HCl (8,8 pH)	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
5% SDS	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
10% APS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	4 µl	4 µl	4 µl
H <sub>2</sub> O	3,29 ml	2,61 ml	1,94 ml

Tabulka 2: Složení 8%, 10% a 12% polyakrylamidového gelu (10 ml) pro SDS-PAGE.

**Složení zaostřovacího gelu (celkový objem 4 ml) :**

Složka gelu:	Objem jednotlivých složek pro zaostřovací gel
30% Akrylamid/Bis-akrylamid	0,5 ml
0,25M Tris-HCl (6,8 pH)	2,0 ml
5% SDS	80 µl
10% APS	60 µl
TEMED	10 µl
H <sub>2</sub> O	1,35 ml

Tabulka 3: Složení zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE (4 ml).

Složení roztoků pro elektroforézu:

**30% Akrylamid/Bis-akrylamid:** 29,2% akrylamid, 0,8% Bis-akrylamid, H<sub>2</sub>O.

**Elektroforetický pufr:** 25mM Tris-HCl, 192 mM glycin, 0,1 % SDS, H<sub>2</sub>O.

**5.4.3. Western blot (Imunocytochemie)**

Po dvou hodinách byla elektroforéza ukončena. Gely byly vyjmuty z elektroforetické aparatury a nechány smáčet 10 minut v pufru pro přenos proteinů (TBB) v Petriho misce. PVDF membrány byly nejdříve navlhčeny metanolem a poté také 10 minut smáčeny v TBB pufru. Membrána byla přiložena ke gelu tak, aby nevznikaly vzduchové bubliny, a z obou stran byly ještě přiloženy Whatman filtrační papíry namočené v TBB pufru. Nakonec byl celý „sandwich“ upevněn z obou stran umělohmotnými mřížkami a byl vložen do aparatury pro Western blot, do které byl nalit TBB pufr. Aparatura byla připojena do zdroje, přenos proteinů (které mají záporný náboj díky SDS) probíhal směrem od katody k anodě, tedy z gelu (blíže ke katodě) na membránu (blíže k anodě) při 300mA po dobu 1 hodiny. Poté byly membrány máčeny v 5% nízkotučném mléce (roztok z práškového mléka v TTBS) 1 hodinu (na rotátoru). „Blokování v mléce“ se provádí z důvodu obsazení volného místa na membráně kaseinem z mléka, zabrání se tak nespecifickému navázání Imunoglobulinů z primární protilátky na povrch membrány. Dále se mléko vymyje pomocí TTBS pufru (3x10 min) a nakonec se nechá působit primární protilátka (přes noc za stálého rotování). Další den se membrány promyjí opět TTBS puftrem (3x10 min) a po dobu 1 hodiny se nechá působit sekundární protilátka (specifické

protilátky proti myším Imunoglobulinům G (IgG) (detekce PDH,  $\beta$ -aktinu, HIF-1 $\alpha$ , Tim 23) a králíčím IgG (detekce p-PDH) s navázanou křenovou peroxidasou. Nakonec se membrána vloží do folie a nakape se roztok luminolu a peroxidu vodíku (uchování ve tmě). Luminol je křenovou peroxidasou (za přítomnosti peroxidu vodíku) oxidován až na aminoftalát, přičemž dochází k emisi fotonů (chemiluminiscence), která je detekovatelná při 425 nm. Detekce je prováděna pomocí FUJILAS-1000.

Kontrola množství nanášeného vzorku do jamek probíhá obarvením membrány pomocí roztoku Coomasie blue, který se váže na proteiny, nebo detekcí „housekeeping“ proteinu (=protein, jehož koncentrace je neměnná, v této práci využíván  $\beta$ -aktin). Snímky membrán z FUJILAS-1000 byly vyhodnoceny v programu ImageJ: intenzita chemiluminiscenčních signálů na membráně byla převedena na absolutní číslo, aby byly proužky porovnatelné. Stejným způsobem byla vyhodnocena v ImageJ intenzita signálu detekující  $\beta$ -aktin (nebo obarvená membrána pomocí Coomasie-blue) a poté procentuálně porovnána.

Složení pufrů:

**Pufr pro přenos proteinů (TBB):** 25mM Tris, 192mM glycin, 0,35mM SDS, 20% (v/v) metanol, H<sub>2</sub>O.

**Pufr na vyvolání botu (TTBS):** 20mM Tris, 0,5M NaCl, 0,05% Tween-20, upravit na pH 7,5.

**Roztok Coomasie Blue:** 0,19% Coomasie blue, 45% etanol, 19% kyselina octová.

## ***5.5. Stanovení laktátu***

Množství laktátu, produkované buňkami, bylo stanoveno z média pomocí laktátového Kitu K607-100 od firmy BioVision. Bylo odebráno 0,5 ml média do mikrozkušavky a uchováno po dobu odběru ostatních vzorků média na ledu (tím dojde k zpomalení reakce rozkladu laktátu enzymem LDH). Dále byla odebraná média přesunuta do mikrozkušavek s filtry (max. 10 kDa), aby byla odfiltrována LDH, a pro urychlení filtrace byly mikrozkušavky centrifugovány 15min (4°C, 14 000 g). Sada pufru, enzymového mixu, značky (proby) a standardu byla rozmražena (je uchováván při -20°C). Dále byl dle návodu od BioVision připraven standard, smícháním 5 $\mu$ l koncentrovaného standardu s 495 $\mu$ l pufru. Po ukončení filtrace byly vzorky médií 5x zředěny, a z toho 10 $\mu$ l

odebráno do 96 jamkové destičky a každý vzorek byl doplněn 40 $\mu$ l pufrem. Zároveň byla také připravena řada standardů (0, 2, 4, 6, 8 a 10 $\mu$ l připraveného 100x ředěného roztoku standardu + doplnit na 50  $\mu$ l pufrem) do jamek destičky. Všechny vzorky i standardy byly nakonec doplněny 50 $\mu$ l Reakčního Mixu (složení: 2 $\mu$ l enzymového mixu+2  $\mu$ l značky (proby) + 46 $\mu$ l pufru). Laktát reaguje s enzymovým mixem a vytváří tak produkt, který s probou tvoří růžovou barvu. Množství laktátu ve vzorku je tak přímo úměrné intenzitě zbarvení, které je měřitelné spektrofotometricky při 595 nm. Absorbance byla proměřena ve čtečce destiček, která byla propojena s PC a vizualizována pomocí programu Gen 5. Vytvořením kalibrační přímky lze spočítat koncentraci laktátu (závislost molárního množství na Absorbanci). Získáme tak po dosazení Absorbance (hodnota y) do rovnice regrese hodnotu x= molární množství laktátu ve vzorku, které lze převést na koncentraci  $c=(n/V) \cdot \text{ředění}$ . Tu zohledňujeme počtem buněk v médiu (pro přesné hodnoty je nezbytné spočítat množství buněk v kultivační nádobě, ze které bylo médium odebráno), aby byly hodnoty porovnatelné.

## **5.6. Vysokorezoluční respirometrie**

Rychlost spotřeby kyslíku mitochondriemi, a tím vyvození důležitých parametrů, jako využití mitochondrií za různých kultivačních podmínek, byla proměřena na Oxygrafu-2K (Oroboros Instruments).

### **5.6.1. Oxygraf-2K**

Oxygraf-2K (obr. 14, str. 44) se skládá ze dvou komor, které jsou izolované, lze tedy v nich udržovat stálou teplotu (37°C). Dno komory je opatřeno magnetem, vyvíjejícím elektromagnetické pole, a míchadlem, aby bylo umožněno míchání suspenze po dobu měření (nastavení na 700rpm). Do komor se aplikuje 2 ml suspenze média s buňkami a uzavře ze shora víkem, jehož středem vede tenký průřez, který je určen pro aplikaci činidel, inhibitorů atd. do suspenze tenkou skleněnou stříkačkou (na 10 $\mu$ l) s jehlou. Každá komora je opatřena polarografickou kyslíkovou elektrodou, která slouží jako senzor O<sub>2</sub>. Oxygraf-2K je propojen s PC a používá pro vizualizaci dat operační program DatLab.



Obr. 14: Oxygraf-2K (Oroboros Instruments)

Převzato z [www.orooboros.at](http://www.orooboros.at)

Kyslíkový senzor se kalibruje na dvě hodnoty: 0% nasycení média vzdušným kyslíkem a na hodnotu 100% nasycení. Kalibrace hodnoty 100% nasycení vzdušným kyslíkem se provádí před každým měřením (víko komory je otevřené), po dobu cca 20-30 minut, dokud není hodnota koncentrace  $O_2$  a teploty ustálena. Hodnota 0% nasycení kyslíkem nastane, pokud při měření buňky spotřebují všechny kyslík. Po kalibraci tak senzor ukazuje hodnotu koncentrace  $O_2$  v médiu při atmosférickém tlaku (101 325 Pa) v jednotkách  $nmol O_2/ml$ . Pro snadnější zpracování dat se zobrazuje i první derivace této křivky, která znázorňuje rychlost spotřeby  $O_2$  za sekundu (vždy na stejný počet buněk) ( $pmol/s$ ).

Komory se desinfikují mezi každým měřením 70% etanolem.

### 5.6.2. Příprava vzorků

Buňky HepG2 byly kultivovány po dobu 3 dnů v hypoxických/normoxických podmínkách. Vzorky na měření respirace byly připraveny odsátím média (které bylo uchováno při 37°C), poté opláchnutím buněk PBS a trypsinizací. Buňky byly pipetou odděleny a spočteny. Z důvodu zachování vlastností byly buňky přesunuty zpět do původního média a upraven jejich počet na 1 milion buněk/1ml média. Nejdříve se kalibruje  $O_2$  senzor na 100% nasycení vzdušným kyslíkem při 37°C a desinfikují se komory (a poté se promyjí vodou). Dále jsou do komor pipetovány 2 ml suspenze média

s buňkami. Na začátku měření se zatlačí víko do komory, tak aby byl zamezen přístupu vzduchu.

### 5.6.3. Respirace buněk

Po uzavření komory oxygrafu, buňky spotřebovávají kyslík celkovou buněčnou respirací, která se skládá z endogenní respirace (mitochondriální spotřeba  $O_2$  dýchacím řetězcem) a dalších procesů (nemitochondriální zdroje- např. NAD(P)H oxidasa). Celkově se tento stav nazývá **stav 3**. U buněk HepG2 je nemitochondriální spotřeba  $O_2$  zanedbatelná, proto hodnotu stavu 3 považujeme za endogenní respiraci.

Je-li v mitochondriích dostatek substrátů (zejména ADP, NADH, sukcinátu), probíhá i fosforylace ADP komplexem ATP synthasy (komplex V). Proto je endogenní respirace nazývána často fosforylující respirace. Po 5-10 minutách dojde k ustálení stavu. Endogenní respirace je prvním ukazatelem, jak moc jsou buňky závislé na energii vznikající v mitochondrii. Hodnota endogenní respirace závisí na zásobě  $O_2$  (normoxické x hypoxické prostředí), substrátu (ADP) a metabolismu buňky.

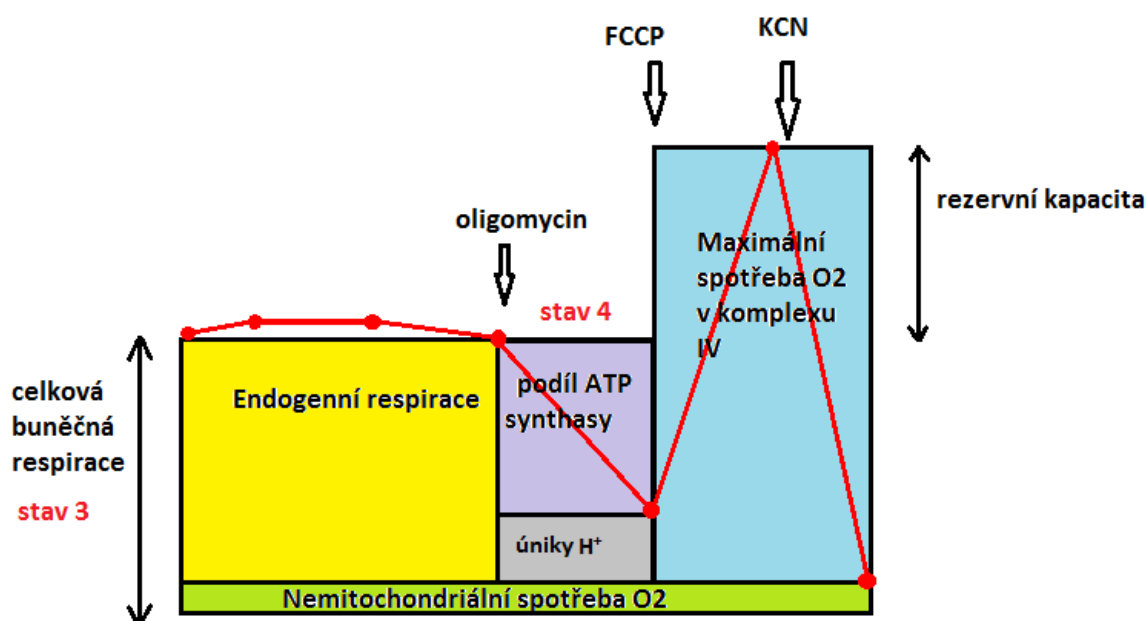
Dalším stavem je nefosforylující respirace (také **stav 4**), která nastává při vyčerpání ADP. U buněk tento stav může také být navozen inhibicí komplexu V. respiračního řetězce oligomycinem. K úplné inhibici komplexu V. u buněk HepG2 ve většině případů postačí koncentrace 0,2  $\mu\text{g/ml}$ . Rychlost spotřeby kyslíku klesne, ovšem ne na nulovou hodnotu, kvůli spotřebě  $O_2$  nemitochondriálními zdroji a únikům  $H^+$  (anglicky „leaky“) přes membránu do matrixu mitochondrie. Inhibicí ATP synthasy dojde k hromadění  $H^+$  v mezimembránovém prostoru a tím se zvýší membránový potenciál. Přetlak  $H^+$  způsobí unikání  $H^+$  zpět do matrixu a tím částečné obnovení respiračního řetězce (spotřeba  $O_2$  komplexem IV). Další příčinou spotřeby  $O_2$  ve stavu 4 je zvýšená produkce ROS [114], zpomalený elektronový přenos způsobí delší setrvání semichinonové radikálové formy ubiquinonu v komplexu III a ty reagují s  $O_2$  v membráně [56].

Kolaps membránového potenciálu, při kterém  $H^+$  prochází skrz membránu zpět do matrixového prostoru, a tím se zvýší rychlost elektronového transportu a rychlost respirace je tak **maximální**, způsobí přidavek FCCP. FCCP patří mezi „odpřahovače“ (patří mezi ně i 2,4-dinitrofenol, CCCP atd.), tyto látky odpojí („odpřáhnou“) elektronový transport od fosforylace ADP, elektrony proudí skrz komplexy respiračního řetězce až na komplex IV, kde redukují dvě molekuly  $O_2$  na vodu, nezávisle na fosforylaci ADP. Limitním parametrem se stává kapacita respiračního řetězce a také množství endogenního

substrátu. Množství FCCP použitého k postupné titraci, závisí na typu buněk a metabolismu, a také množství substrátu (NADH, sukcinátu atd.) [114].

Přídavkem 1mM KCN byl irreverzibilně inhibován komplex IV, čímž došlo k celkové inhibici mitochondriální spotřeby  $O_2$ . Tímto krokem zjistíme nemitochondriální spotřebu  $O_2$ . U buněk HepG2 je tato spotřeba zanedbatelná, proto hodnotu stavu 3 považujeme za endogenní respiraci.

Schéma průběhu měření rychlosti spotřeby  $O_2$  je nastíněn na obr. 15.



Obr. 15: Schéma průběhu měření rychlosti spotřeby  $O_2$  (červená linka). V první části buňky spotřebovávají kyslík jak mitochondriálními, tak nemitochondriálními zdroji. Tato celková spotřeba se nazývá stav 3. Dále inhibujeme komplex V. dýchacího řetězce oligomycinem. Zjistíme tak stav 4, který je charakterizován poklesem spotřeby  $O_2$  kvůli neprobíhající fosforylaci ATP a zároveň je ukazatelem úniků  $H^+$  přes membránu do matrixu, který je zapříčiněn vysokým membránovým potenciálem. Přetlak  $H^+$  se uvolní při přidání FCCP, který způsobí pronikání  $H^+$  skrz membránu zpět do matrixu a tím se stane respirace maximální. Nakonec přidáním KCN se irreverzibilně inhibuje komplex IV, čímž zjistíme nemitochondriální spotřebu  $O_2$ .

Absolutní hodnoty stavu 3, stavu 4 a maximální respirace jsou klíčové k určení **indexu respirační kontroly (IRK= podíl endogenní respirace a inhibované respirace oligomycinem =stav 3/stav 4)**, **rezervní kapacity** a dalšího poměru: **FCCP/stav 4**.

IRK je důležitým parametrem vyjadřujícím mitochondriální integritu. Čím je tento poměr vyšší, tím v metabolismu buňky hraje mitochondriální dýchání větší roli. IRK ovlivňují úniky  $H^+$  z mezimembránového prostoru do matrixu (čím větší úniky  $H^+$  tím je integrita mitochondrií menší) [58].

Poměr FCCP/stav 4 závisí na množství substrátu pro respiraci (NADH, sukcinátu), na množství úniků  $H^+$  a maximální respiraci, tedy vypovídá o celkové kapacitě respiračního řetězce.

Dalším sledovaným parametrem je rezervní kapacita (=rozdíl mezi maximální respirací a endogenní respirací. Endogenní respirace je spotřeba kyslíku při dostatečném množství substrátu, a nedochází k inhibici žádného z komplexů. Ale tato respirace nedosahuje maximálních hodnot, jako při použití „odpřahovače“ FCCP, kdy je právě limitní celková kapacita řetězce a dostupnost substrátu.)

Každé měření bylo provedeno minimálně třikrát (kromě detekce stabilizovaného HIF-1 $\alpha$  v časovém rozmezí, z důvodu časové náročnosti).



## 6. Výsledky

### 6.1. Generační doba buněk HepG2

Cílem této diplomové práce bylo porovnat vlastnosti energetického metabolismu nádorových buněk HepG2 pěstovaných v médiích obsahující rozdílné substráty pro růst a proliferaci: glukosu a galaktosu, v kombinaci s glutaminem a pyruvátém. Zároveň jsme pozorovali vliv hypoxického prostředí na tyto vlastnosti. Energetický metabolismus ovlivňuje proliferaci, proto jsme se nejprve zaměřili na stanovení generační doby za daných podmínek.

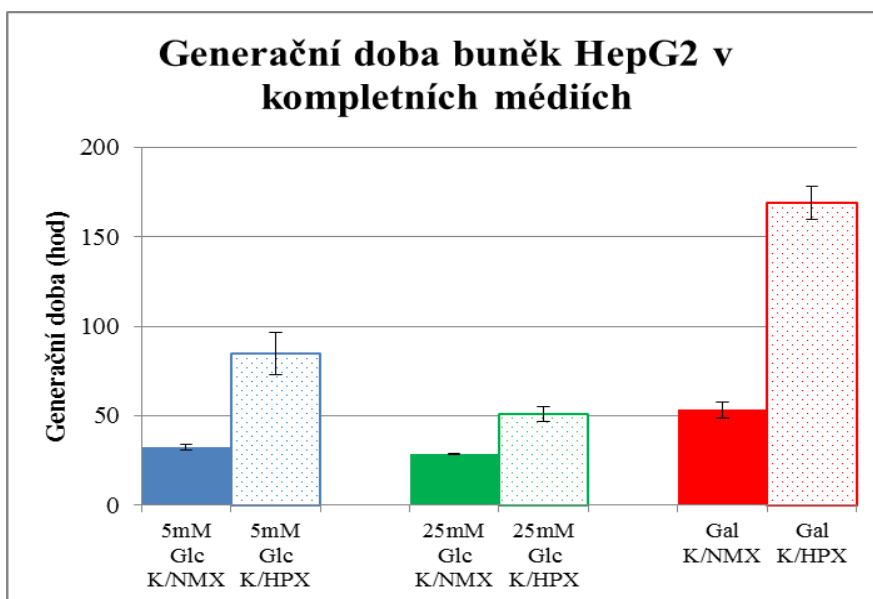
#### 6.1.1. Role glutaminu

Buňky byly „nasety“ do médií (viz. 4.3.2.) v přesném počtu (např. 1 milion buněk na malou (25 cm<sup>2</sup>) kultivační láhev) a byly spočteny po určené době. Zjistili jsme, že buňky pěstované v médiu bez přídavku glutaminu a pyruvátu v hypoxii i normoxii (5mM Glc –pyr –gln/NMX a 25mM Glc –pyr –gln/NMX) nejsou schopny proliferace. Buňky, nejen že se nemnožily, ale postupně vymíraly. Tento fakt nasvědčuje tomu, že glutamin hraje u glykemických i hyperglykemických buněk HepG2 důležitou roli v proliferaci, zejména v syntéze „stavebních kamenů“ (jako AMK a lipidů).

#### 6.1.2. Role hexosy

Buňky pěstované v galaktosových médiích bez přídavku galaktosy jsou závislé jen na glutaminu a pyruvátu, nemají k dispozici žádnou hexosu. Jak se dalo předpokládat, glutamin a pyruvát nejsou schopny kompletně zajistit jak ATP, tak i „stavební kameny“ pro růst. Platí to pro podmínky hypoxické i normoxické: buňky v galaktosovém médiu bez Gal neproliferovaly a vymíraly. Stejně výsledky se předpokládají i u glykemických a hyperglykemických buněk při absenci glukosy.

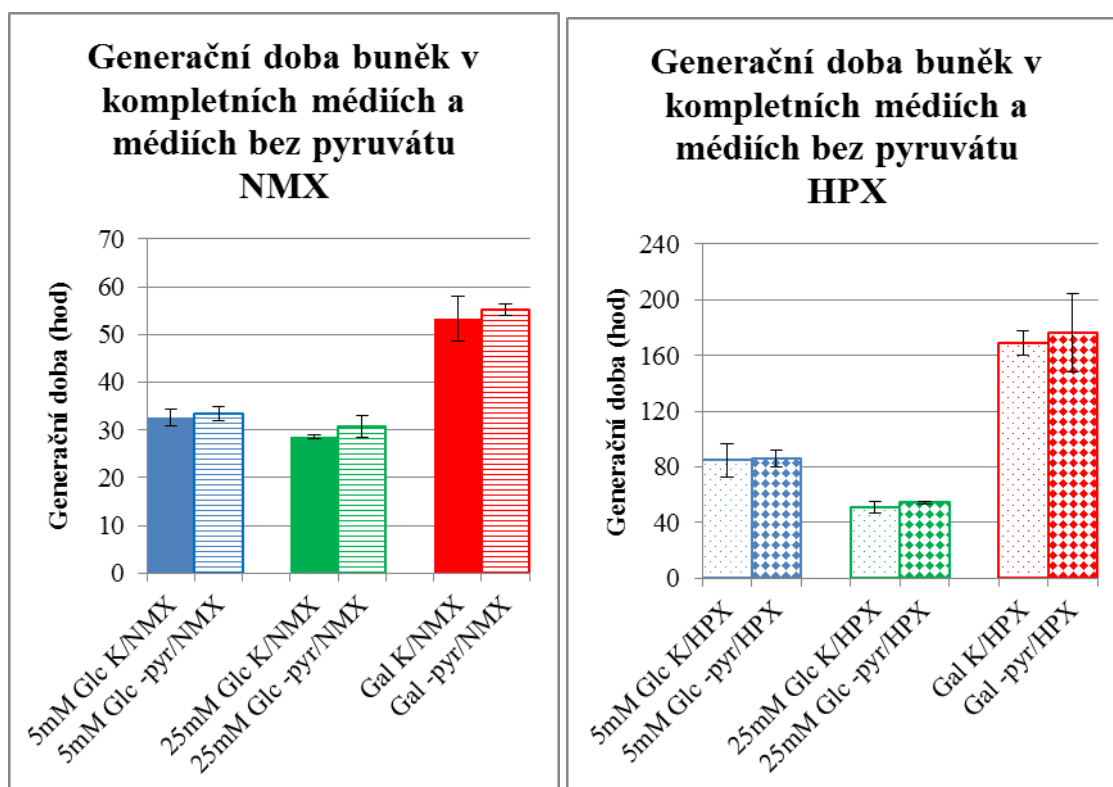
Galaktosa je zpracována buňkou pomaleji v porovnání s metabolismem glukosy, což se odráží i na generační době. Buňky pěstované v Gal K/NMX mají generační dobu skoro dvakrát delší (53,29 hod) než hyperglykemické buňky (25mM Glc K/NMX) (28,5 hod). Glykemické buňky (5mM Glc K/NMX) mají generační dobu 32,62 hod, což odpovídá tomu, že čím více je buňka HepG2 závislá na glukose, tím rychleji proliferuje (obr. 16, str. 49).



Obr. 16: Generační doba buněk HepG2 v kompletních médiích (K) pěstovaných za normoxie (NMX) a hypoxie (HPX).

### 6.1.3. Role pyruvátu

Pro ověření role pyruvátu v proliferaci jsme buňky také kultivovali v médiích v hypoxii i normoxii, kde nebyl přítomen pyruvát (označení média -pyr). Generační doba se v porovnání s kompletními médii v průměru mírně prodloužila u všech používaných médií, jak v normoxii, tak v hypoxii, ovšem výsledky nenabývají statistické významnosti (obr. 17, str. 50). Generační doba buněk HepG2 pěstovaných v médiu 25mM Glc – pyr/NMX je v průměru 30,7 hod, v 5mM Glc – pyr/NMX 33,4 hod a v Gal – pyr/NMX je 55,2 hod. V hypoxii došlo také k mírnému prodloužení generační doby buněk oproti kompletním médiím: buňky inkubované v 25mM Glc – pyr/HPX dosáhly v průměru generační doby 54,4 hod, v 5mM Glc – pyr/HPX 86,0 hod a v Gal – pyr/HPX 176,0 hod. Tyto výsledky naznačují mírné prodloužení generační doby, pokud není v médiu přítomen pyruvát. Pro nabytí statistické významnosti by bylo zapotřebí přesnějších hodnot měření.



Obr. 17: Generační doba buněk HepG2 kulturovaných v kompletních médiích (K) a médiích bez pyruvátu (-pyr) za normoxie (NMX) (graf vlevo) a za hypoxie (HPX) (graf vpravo).

Pro snazší orientaci v grafech doporučuji nahlédnout na obr. 13, str. 33.

#### 6.1.4. Role hypoxického prostředí

Buňky se v hypoxickém prostředí dělí daleko pomaleji (prodlužuje se generační doba) než v normoxii (obr. 16, str. 49). Generační doba buněk HepG2 rostoucích v 25mM Glc K/HPX je v průměru 50,89 hod, v 5mM Glc K/HPX 84,80 hod, a Gal K/HPX 168,8 hod. Buňka je závislá na metabolismu využívající limitní množství kyslíku, což zahrnuje mimo jiné sníženou respiraci, sníženou rychlost metabolismu a jiných procesů. Závisí také na rychlosti adaptace buněk na hypoxii, která zahrnuje zejména aktivaci faktoru HIF-1. Aktivace HIF-1 a její rychlost je klíčová k procesu adaptace a tím úpravě metabolismu, který podpoří proliferaci buňky.

## 6.2. Rychlost stabilizace HIF-1 v buňkách HepG2

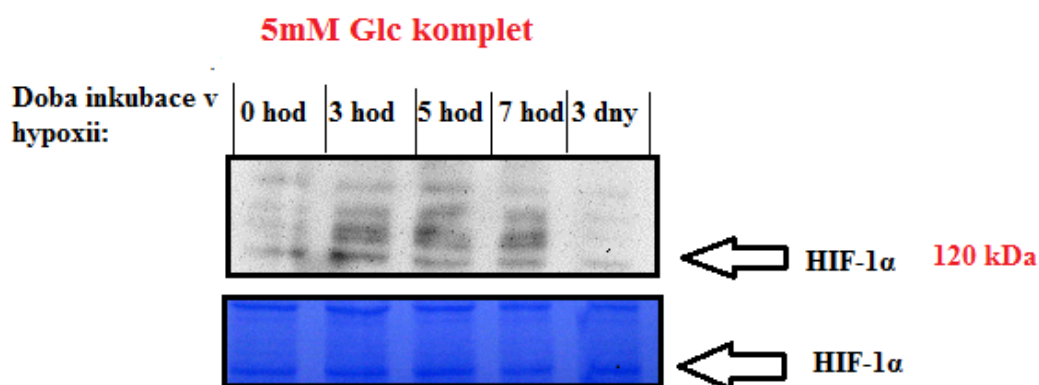
Pro detekci stabilizovaného HIF-1 proteinu byly využity lyzáty buněk, které byly inkubovány 0, 3, 5, 7 a 72 hod v hypoxickém prostředí v kompletních médiích. Metodou SDS-elektroforézy a Western blotu s použitím protilátky proti podjednotce HIF-1 $\alpha$  (podjednotka, jejíž stabilita je závislá na množství O<sub>2</sub>) jsme zjistili množství stabilizovaného HIF-1 v časovém rozmezí.

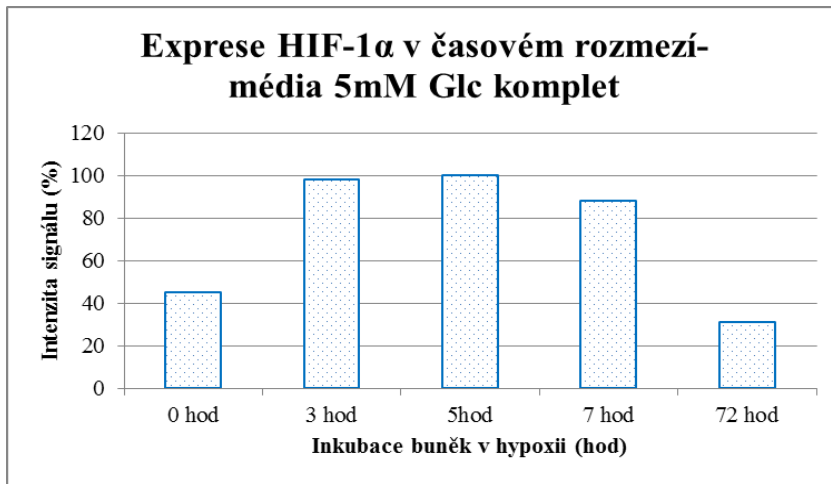
Ve všech kompletních médiích: 5mM Glc K/HPX (obr. 18 a.), 25mM Glc K/HPX (obr. 18 b., str. 52), Gal K/HPX (obr. 18 c, str. 53) byla nalezena nejvyšší koncentrace proteinu HIF-1 $\alpha$  po 5 hodinách od okamžiku, kdy byly buňky vloženy do hypoxického prostředí.

U buněk pěstovaných v galaktosovém médiu (obr. 18 c., str. 53) se stabilizuje HIF-1 $\alpha$  pozvolněji než u buněk pěstovaných v médiích glykemických a hyperglykemických. Což může vysvětlit i nejdelsí adaptaci na hypoxické podmínky (nejdelsí generační doba buněk v hypoxii). Po 72 hodinách se množství stabilizovaného faktoru HIF-1 u glykemických buněk vrátila na původní hodnoty, ale galaktosové buňky si stále drží mírně vyšší koncentraci, což opět koreluje s pomalou adaptací na hypoxické podmínky.

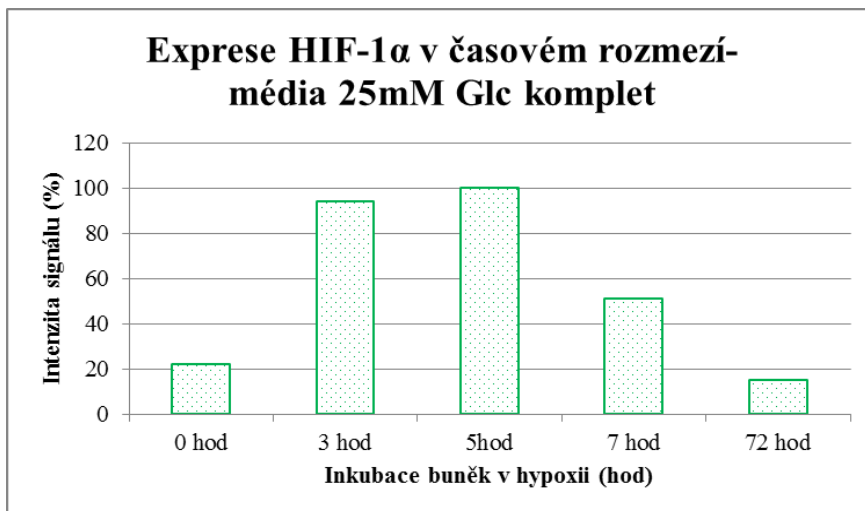
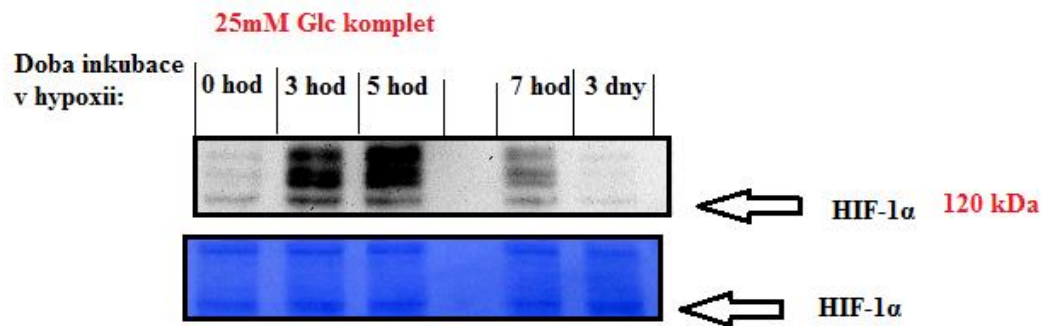
HIF-1 $\alpha$  je také stabilizován vysokou koncentrací glukosy [výsledky laboratoře Dr. P. Ježka], [115], což potvrzuje i nejsilnější intenzita signálu na snímku membrány hyperglykemických buněk (obr. 18 b., str. 52).

a.)

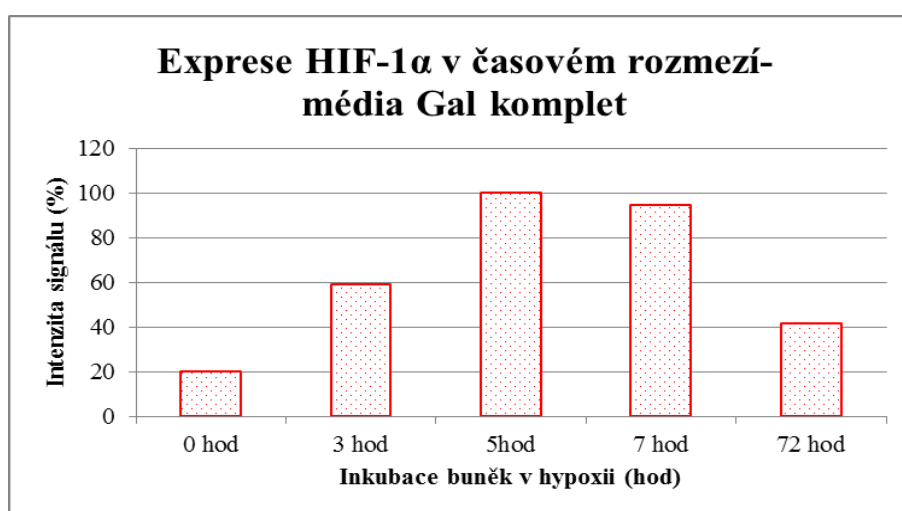
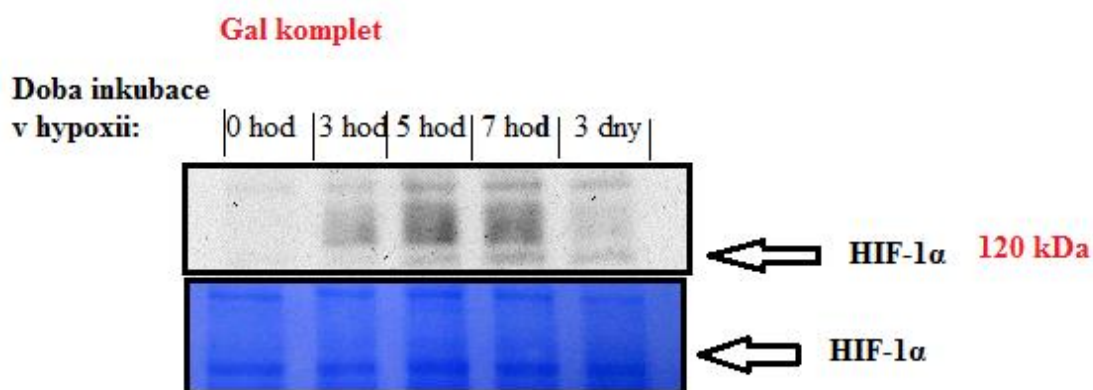




b.)



c.)



Obr. 18: Snímky Western blotu zobrazující expresi HIF-1 $\alpha$  (120kDa) a kontrola nanášení vzorku obarvením proteinů na membráně Coomassie blue. Vyhodnocení intenzity signálu chemiluminiscence na mambráně bylo provedeno v programu ImageJ, (také bylo vyhodnoceno v ImageJ množství proteinu obarveného Coomassie blue a nakonec intenzita signálu z membrány byla vztažena na množství proteinu), a následně procentuálně porovnáno v grafech. HIF-1 $\alpha$  byl detekován v buňkách pěstovaných v kompletních médiích: 5mM Glc K/HPX (a), 25mM Glc K/HPX (b) a Gal K/HPX (c) a inkubovány v hypoxickém prostředí po dobu 0, 3, 5, 7 a 72 hod.

### ***6.3. Detekce fosforylované a nefosforylované formy pyruvátdehydrogenasového komplexu***

Dalším postupem, který je nezbytný pro popis energetického metabolismu buněk HepG2 za hypoxie, je zjištění míry fosforylace pyruvátdehydrogenasového komplexu

(PDH). Neboť vlivem faktoru HIF-1 dochází k fosforylaci PDH a tím jeho inaktivaci, pyruvát nemůže vstupovat do Krebsova cyklu a neslouží dále jako zdroj substrátů pro respirační řetězec atd. Ověřili jsme také, zda nedochází ke změně exprese samotného PDH za hypoxických podmínek.

Metodami SDS-elektroforézou a Western blotem, jsme za použití protilátky proti fosforylované formě PDH (=p-PDH) porovnávali množství p-PDH v buňkách HepG2, které byly inkubovány v prostředí hypoxie i normoxie. Stejným způsobem jsme detekovali množství PDH protilátkou proti podjednotce E1 pyruvátdehydrogenasového komplexu. Chemiluminiscenční signál byl detekován na přístroji LAS-1000 a intenzita signálu (která je přímo úměrná k množství sledovaného proteinu) byla v programu ImageJ vyhodnocena a následně převedena na procenta.

### **6.3.1. PDH ve všech médiích**

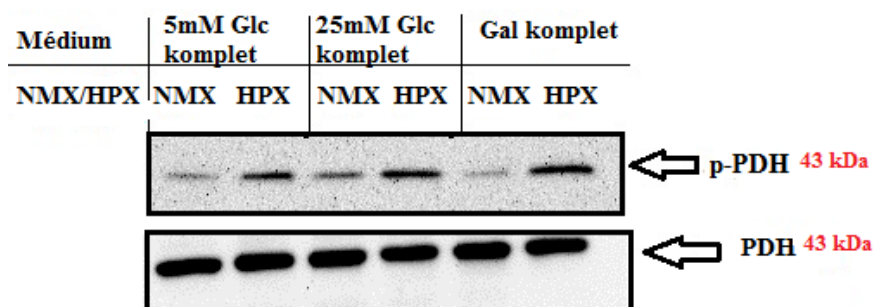
Bylo zjištěno, že koncentrace PDH je neměnná ve všech případech, hodnoty jsou stejné pro hypoxii i normoxii pro dané médium, ve kterém byly buňky pěstovány. Tedy intenzitu chemiluminiscenčního signálu PDH můžeme považovat za kontrolu stejného nanášení vzorku (obr. 19 a., str. 55).

### **6.3.2. Fosforylovaná forma PDH (p-PDH) v kompletních médiích**

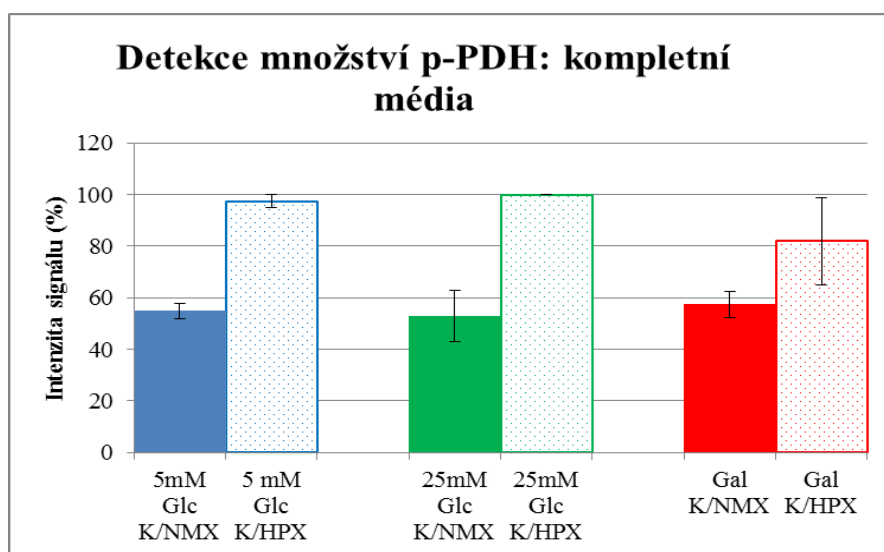
Snímek chemiluminiscenčních signálů detekující množství p-PDH v kompletních médiích poukazuje na zvýšení míry fosforylace PDH za hypoxie oproti normoxii (obr. 19 a, str. 55). Exprese PDH je ve všech médiích stejná.

Dle grafu na obr. 19 b, str. 55 je průměrná fosforylace PDH u glykemických a hyperglykemických buněk zvýšená v hypoxii. U buněk pěstovaných v Gal K/HPX není v průměru míra fosforylace příliš výrazná (ovšem s velkými odchylkami). Z toho může vyplývat, že buňky pěstované v médiu s galaktosou nedosahují tak výrazného odklonu pyruvátu od Krebsova cyklu.

a.)



b.)



Obr. 19: Snímky Western blotu detekující intenzitu signálu p-PDH a PDH (obr. a). Buňky HepG2 byly inkubovány v různých druzích kompletních médií v pořadí: 5mM Glc K v normoxii (NMX), hypoxii (HPX), 25mM Glc K/NMX, 25mM Glc K/HPX, Gal K/NMX a Gal K/HPX. Intenzita signálu detekující p-PDH byla převedena v programu ImageJ na procenta (%) a porovnána v grafu (obr. b.).

### 6.3.3. Fosforylovaná forma PDH v médiích bez pyruvátu

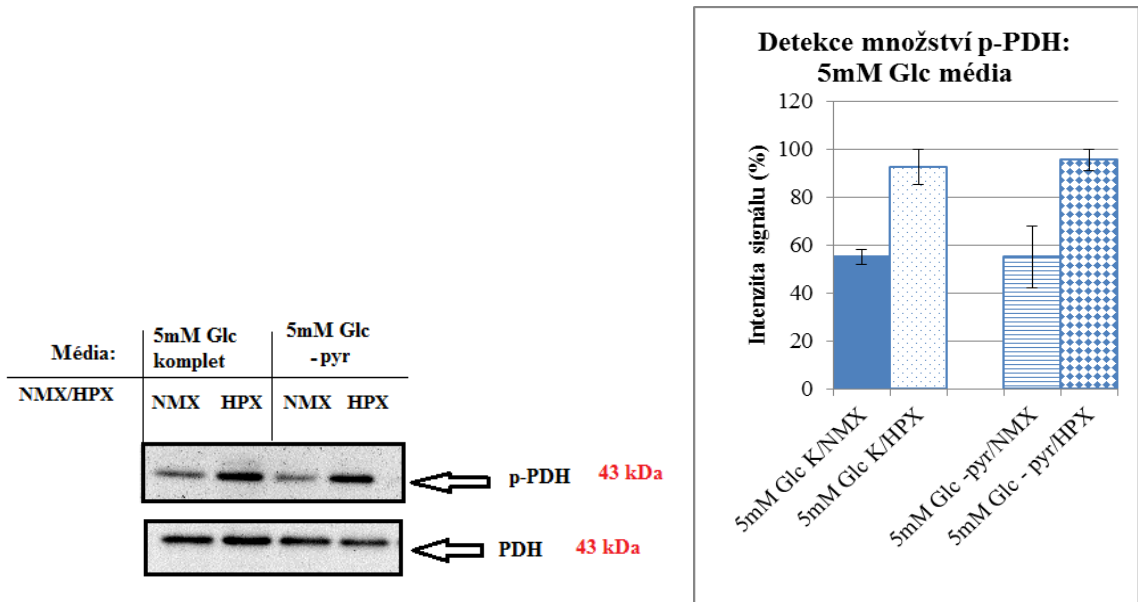
Detekovali jsme množství fosforylované formy PDH (p-PDH) i v buňkách pěstovaných v médiích bez pyruvátu. Tak jako u buněk v kompletních médiích, bylo nalezeno zvýšené množství p-PDH u buněk pěstovaných v médiích bez pyruvátu v hypoxii oproti normoxii.

Při srovnání množství p-PDH u buněk HepG2 kultivovaných v kompletních médiích/NMX a v médiích bez pyruvátu/NMX, nedochází u glykemických (i

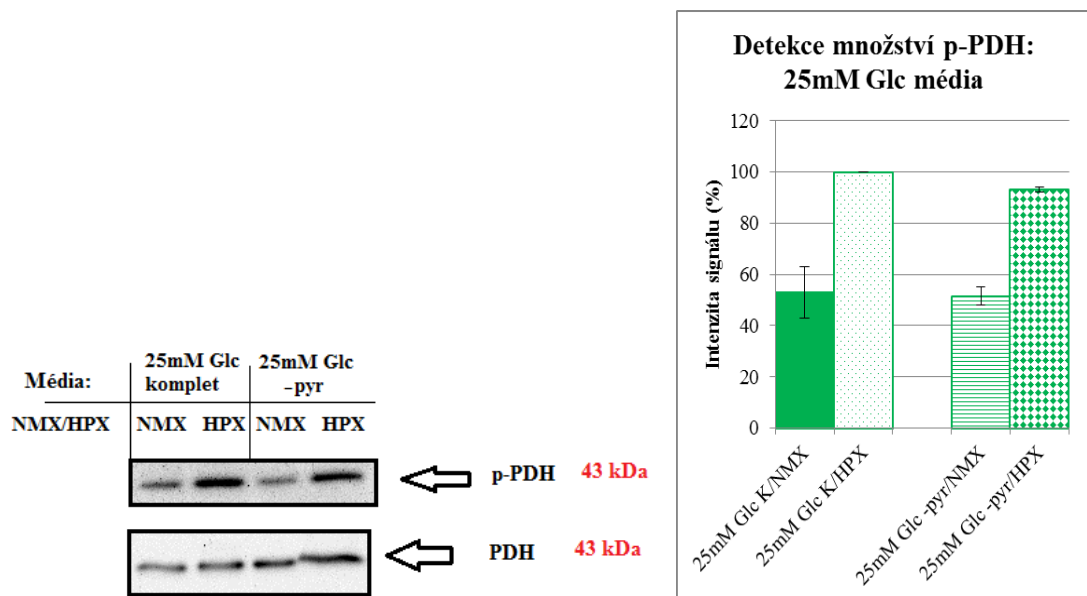


hyperglykemických) buněk k výrazným změnám mezi těmito médii (obr. 20 a, b). U galaktosových buněk bylo nalezeno o 20% více p-PDH v kompletním médiu/NMX než v médiu bez pyruvátu/NMX. Tento rozdíl spíše přepisujeme výrazné směrodatné odchylce této semikvantitativní metody, protože s velkou pravděpodobností 1mM pyruvát nezpůsobuje tak markantní rozdíl (obr. 20 c., str. 57).

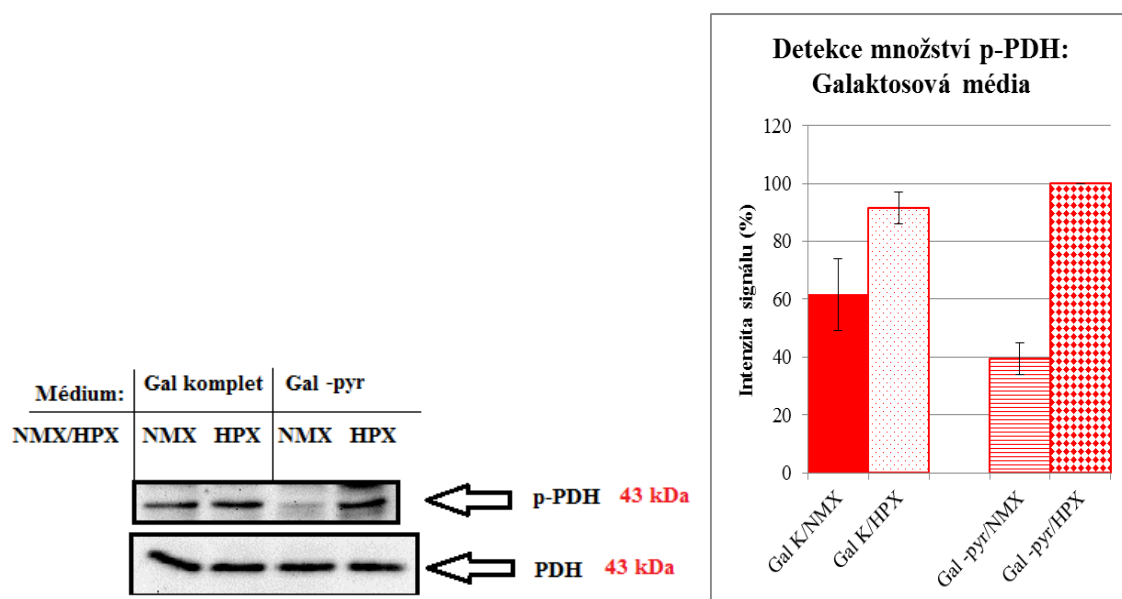
a.)



b.)



c.)



Obr. 20: Snímky Western blotu detekující množství p-PDH a PDH. Dále byl signál chemiluminiscence vyhodnocený v programu ImageJ, následně procentuálně porovnáno v grafech. Pořadí chemiluminiscenčních signálů: kompletní médium za NMX, kompletní médium za HPX, médium bez pyruvátu za NMX, médium bez pyruvátu za HPX. Obr. a: detekce p-PDH buněk inkubovaných v médiích s 5mM Glc, obr. b: v médiích s 25mM Glc, obr. c: v galaktosových médiích.

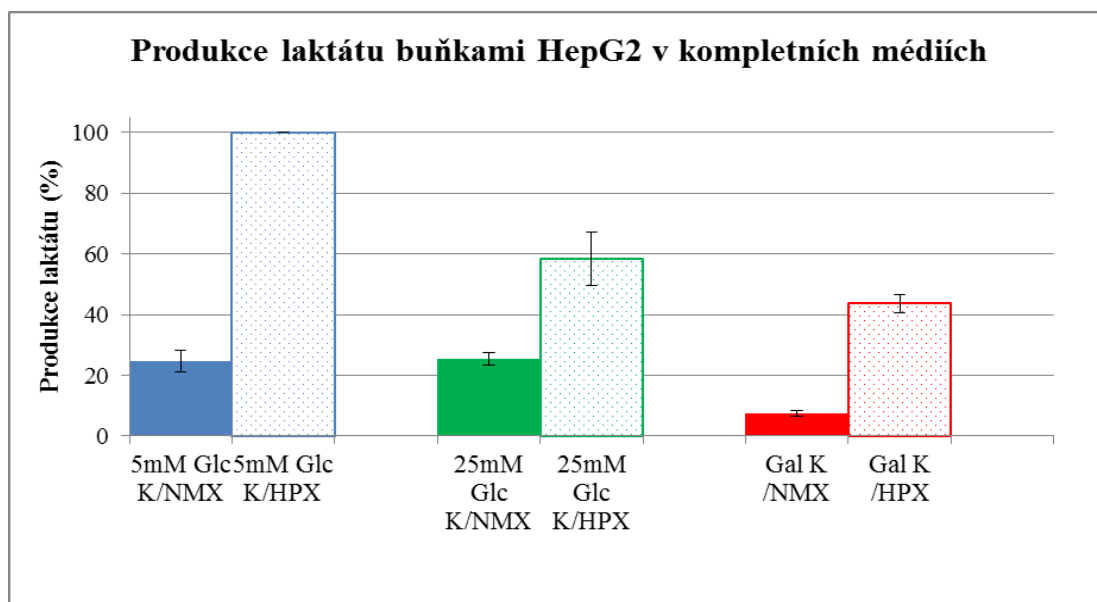
Pro snazší orientaci v grafech doporučuji nahlédnout na obr. 13, str. 33.

## 6.4. Produkce laktátu

### 6.4.1. Produkce laktátu v kompletních médiích

Prověřovali jsme dále produkci laktátu, který buňka vyrábí jako odpadní produkt z pyruvátu, a ten odvádí do extracelulárního prostoru (proto se dá koncentrace laktátu určit přímo z média). V předchozím experimentu bylo dokázáno, že buňky v hypoxii mají ve zvýšené míře fosforylovanou PDH, tím pyruvát nevstupuje do Krebsova cyklu a je metabolizován na laktát. Jak bylo očekáváno, dle výsledků všechny buňky HepG2 v hypoxii produkují více laktátu než v normoxii. Největší koncentrace laktátu byla nalezena v 5mM Glc K/HPX (stanoveno jako 100%), v normoxii 5mM Glc K v průměru čtyřikrát méně (24,6%). V 25mM Glc K/HPX bylo změřeno průměrně 64,5 % laktátu, a 25mM Glc/NMX 25,47% (obr. 21, str. 58).

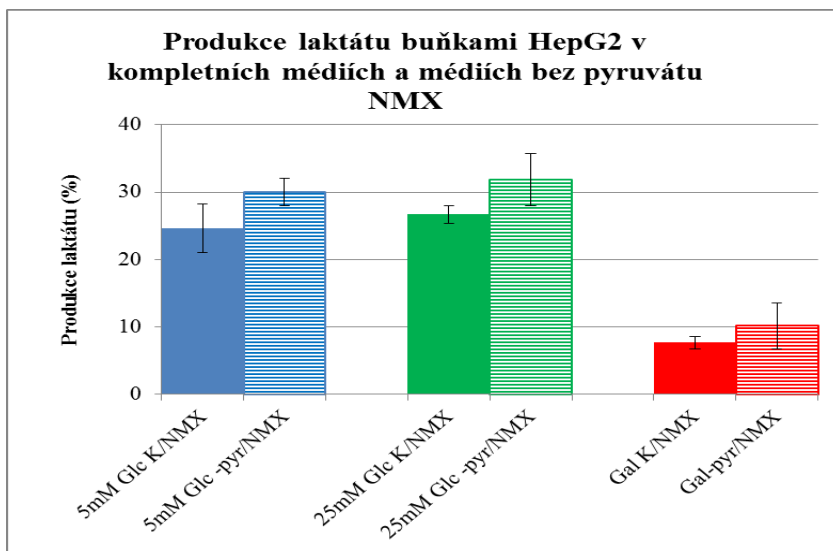
Dále bylo zjištěno, že galaktosové buňky produkují nejméně laktátu: v Gal K/NMX pouze v průměru 7,5% laktátu, a Gal K/HPX 43,6%. To by mohlo znamenat, že pyruvát v galaktosových buňkách je více využit pro metabolity Krebsova cyklu (a dále pro respiraci), jak vyplývá i ze snížené fosforylace PDH (viz. kap. 6.3.2.).



Obr. 21: Produkce laktátu v kompletních médiích (K) za normoxie (NMX) a hypoxie (HPX).

#### 6.4.2. Produkce laktátu v médiích bez pyruvátu za normoxie (NMX)

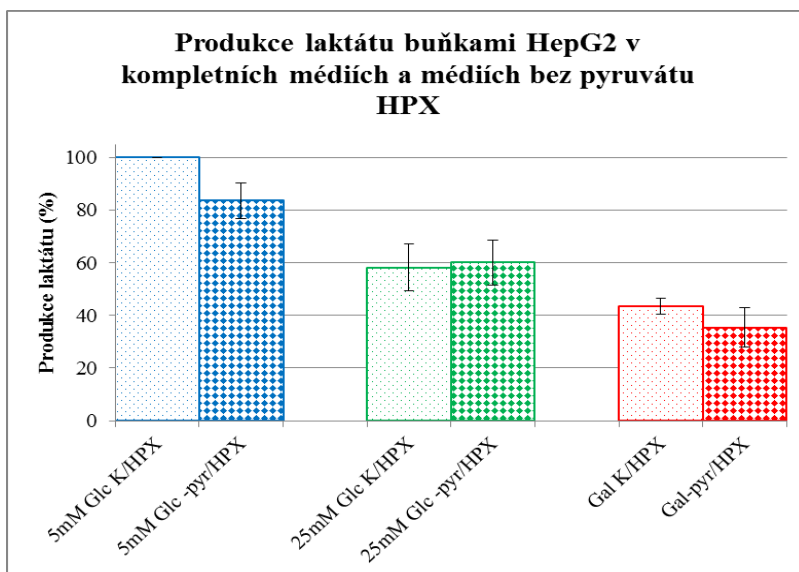
Produkce laktátu v médiích bez pyruvátu za normoxie (-pyr/NMX) byla u všech médií v průměru mírně zvýšena v porovnání s kompletními médii za normoxie (K/NMX). Toto zjištění je překvapivé, neboť by se spíše dalo předpokládat, že přidaný pyruvát bude metabolizován u glykemických buněk především na laktát a jeho úbytek spíše sníží laktátovou produkci. Za normoxických podmínek mají buňky dostatek endogenního substrátu, který tvoří zpracováním glukosy a další přídavek pyruvátu již příliš nemetabolizují. Tedy mírně zvýšené hodnoty u buněk bez pyruvátu spíše připisujeme směrodatné odchylce (obr. 22, str. 59).



Obr. 22: Produkce laktátu buňkami HepG2 v kompletních médiích (K) a médiích bez pyruvátu (-pyr) v normoxii (NMX).

#### 6.4.3. Produkce laktátu v médiích bez pyruvátu za hypoxie

Produkce laktátu v médiích bez přidaného pyruvátu byla za hypoxických podmínek (-pyr/HPX) převážně nižší než v kompletních médiích (K/HPX) (obr. 23). Což je pravděpodobně dáno tím, že buňky v hypoxii mají pomalejší metabolismus, a tím je pro ně i přidaný pyruvát (oproti normoxickým podmínkám) využitelným substrátem pro tvorbu laktátu.



Obr. 23: Produkce laktátu buňkami pěstovaných v kompletních (K) médiích a médiích bez pyruvátu (-pyr) v hypoxii (HPX).

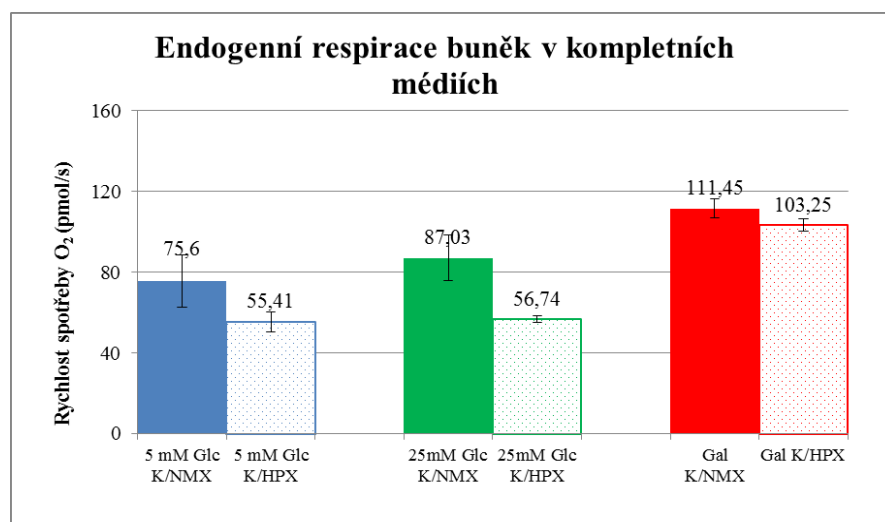
Pro snazší orientaci v grafech doporučuji nahlédnout na obr. 13, str. 33.

## 6.5. Endogenní respirace

Metodou respirometrie bylo zjištěno, které substráty v závislosti na použitých médiích podporují respiraci, nebo naopak mitochondriální funkci potlačují. V testu produkce laktátu buňky pěstované v galaktosových médiích produkovaly nejméně laktátu, což naznačuje i vyšší obrát Krebsova cyklu. Pomocí oxygrafu-2K byly stanoveny hodnoty rychlosti spotřeby kyslíku buňkami HepG2, ze kterých lze vyvodit, jak buňky využívají respirační řetězec a tím dále i mitochondriální bioenergetiku s konečnou produkcí ATP. Endogenní respirace (stav 3) je respirace buňky bez přidaného inhibitoru/aktivátoru, buňky jsou závislé na endogenních substrátech. Tedy porovnáním stavů 3 (měřením spotřeby kyslíku) můžeme zjistit, jak buňky samovolně respirují.

### 6.5.1. Endogenní respirace-kompletní média

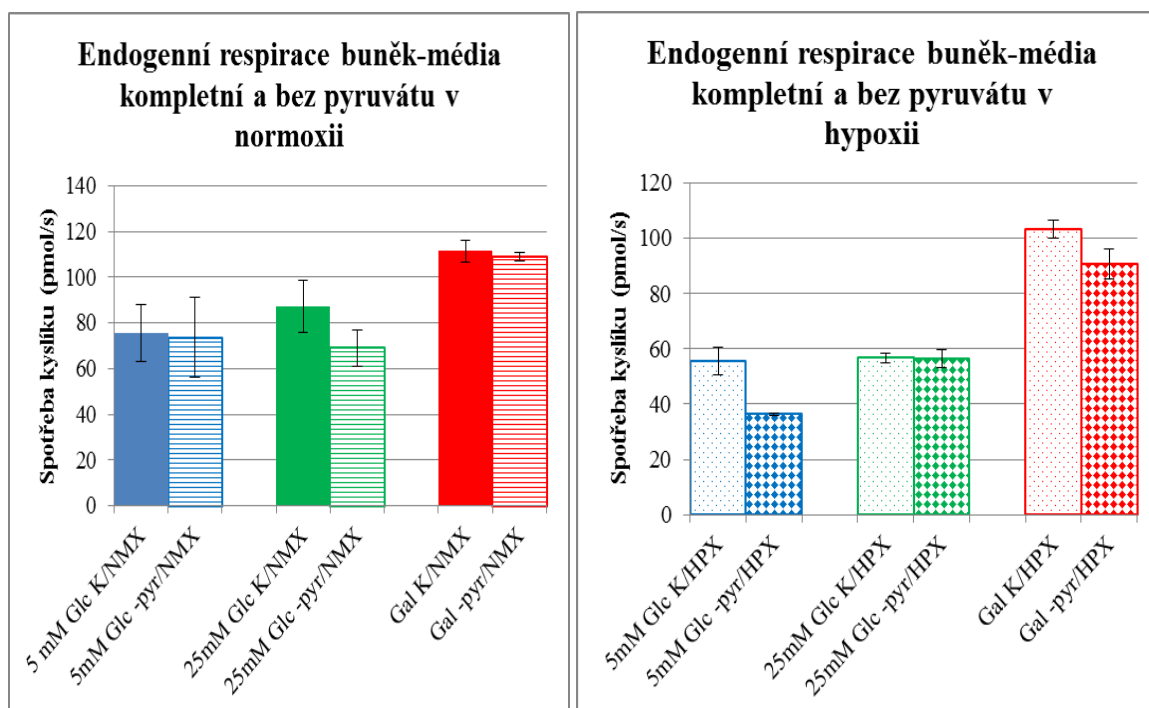
Spotřeba kyslíku buněk pěstovaných v Gal komplet (Gal K) byla v průměru nejvyšší, jak v normoxii (111,45 pmol/s), tak i v hypoxii (103,25 pmol/s). Glykemické i hyperglykemické buňky respirovaly méně: spotřeba kyslíku buněk v 5mM Glc K/NMX činila 75,6 pmol/s a v 5mM Glc K/HPX 55,41 pmol/s. Hyperglykemické buňky (25mM Glc K) spotřebovaly 87,03 pmol O<sub>2</sub>/s v NMX a 56,74 pmol O<sub>2</sub>/s v HPX (obr. 24).



Obr. 24: Endogenní respirace (stav3) buněk HepG2 v kompletních médiích (K) za normoxie (NMX) a hypoxie (HPX).

### 6.5.2. Endogenní respirace- média bez pyruvátu

Endogenní respirace buněk kultivovaných v médiích bez pyruvátu (-pyr) byla v průměru mírně nižší v porovnání s kompletními médii. Toto snížení by se dalo předpokládat, protože pyruvát je substrátem pro Krebsův cyklus, který je zdrojem substrátů pro respirační řetězec (obr. 25).



Obr. 25: Endogenní respirace buněk v kompletních médiích (K) a v médiích bez pyruvátu (-pyr). Vlevo v normoxických podmínkách (NMX) a vpravo v hypoxických podmínkách (HPX).

Pro snazší orientaci v grafech doporučuji nahlédnout na obr. 13, str. 33.

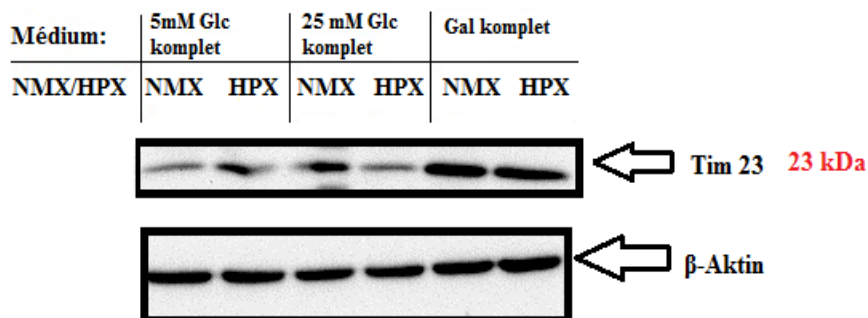
### 6.6. Semikvantifikace mitochondrií

Vzhledem k tomu, že galaktosové buňky mají vyšší endogenní respiraci než buňky glykemické a hyperglykemické, je důležitým krokem kvantifikovat mitochondrie, neboť zvýšená respirace může být odrazem zvýšeného množství mitochondrií v buňce. Využili jsme semikvantitativní metodu SDS elektroforézu a Western blot s imunodetekcí proteinu Tim 23 (translokátor proteinů vyskytující se pouze na vnitřní membráně mitochondrií, proto ho lze využít pro kvantifikaci mitochondrií). Jako kontrola správného nanášení proteinu na elektroforézu byla užitá protilátka proti  $\beta$ -aktinu (ten je exprimován v buňkách HepG2 za všech podmínek stejně).

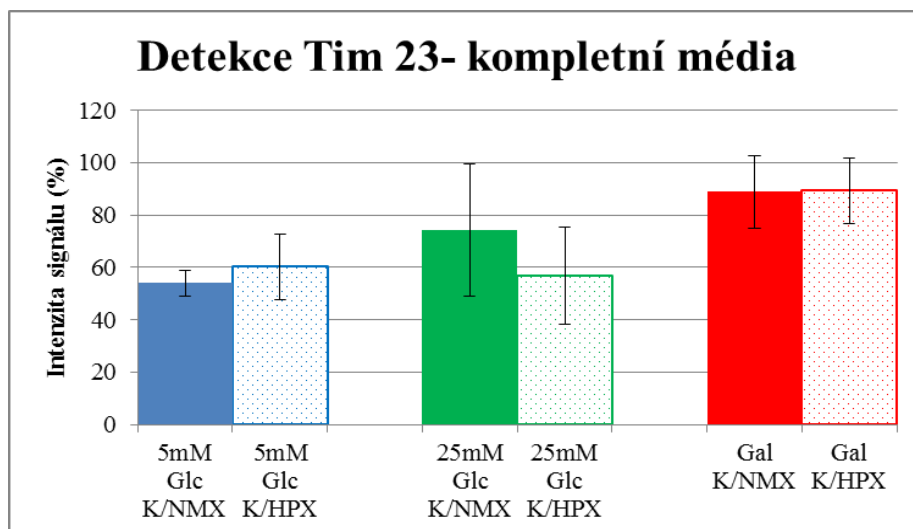
### 6.6.1. Semikvantifikace mitochondrií v kompletních médiích

V porovnání s glykemickými a hyperglykemickými buňkami mají v průměru zvýšené množství Tim 23 buňky pěstované v galaktosových médiích (obr. 26).

a.)



b.)



Obr. 26: Snímky Western blotu detekující množství Tim 23 (a kontrola správného nanášení vzorků na elektroforézu  $\beta$ -actinem). Dále byl signál chemiluminiscence vyhodnocený v programu ImageJ, následně procentuálně porovnáno v grafu.

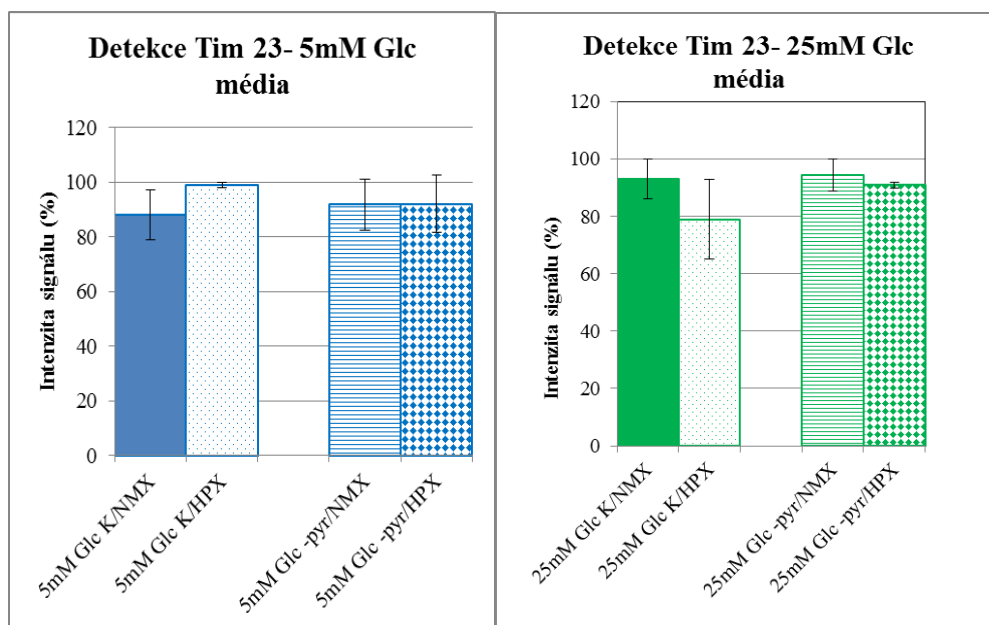
### 6.6.2. Kvantifikace mitochondrií v médiích bez pyruvátu

Množství Tim 23 bylo prověřeno i v médiích bez pyruvátu. Při porovnání množství Tim 23 detekovaných u buněk v kompletních médiích oproti médiím bez pyruvátu, výsledky se téměř neliší. Jelikož se jedná o semikvantitativní metodu, jsou zde i velké směrodatné odchylky (obr. 27, str. 63). Na obr. 27 nejsou vyobrazeny snímky přenosu

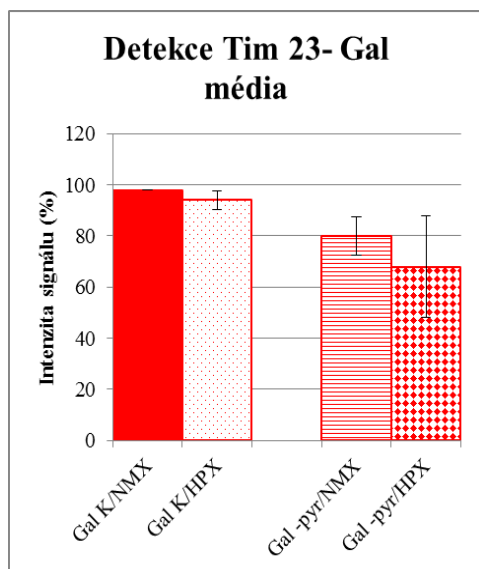
proteinů na membrány, tak jako v předchozích experimentech využívající tuto metodu, kvůli nedostatku reprezentativního materiálu. Jsou zde vyobrazeny jen průměrné hodnoty intenzit chemiluminiscenčního signálu, již přepočítané na množství nanášeného proteinu.

a.)

b.)



c.)



Obr. 27: Grafy průměrných hodnot chemiluminiscenčních signálů z Western blotu detkující Tim 23 (jako kontrola správného nanášení vzorků na elektroforézu byl užit  $\beta$ -aktin). Signál chemiluminiscence vyhodnocený v programu ImageJ, následně procentuálně porovnáno v grafech. (a) 5mM Glc média, (b) 25mM Glc média a (c) Gal média.



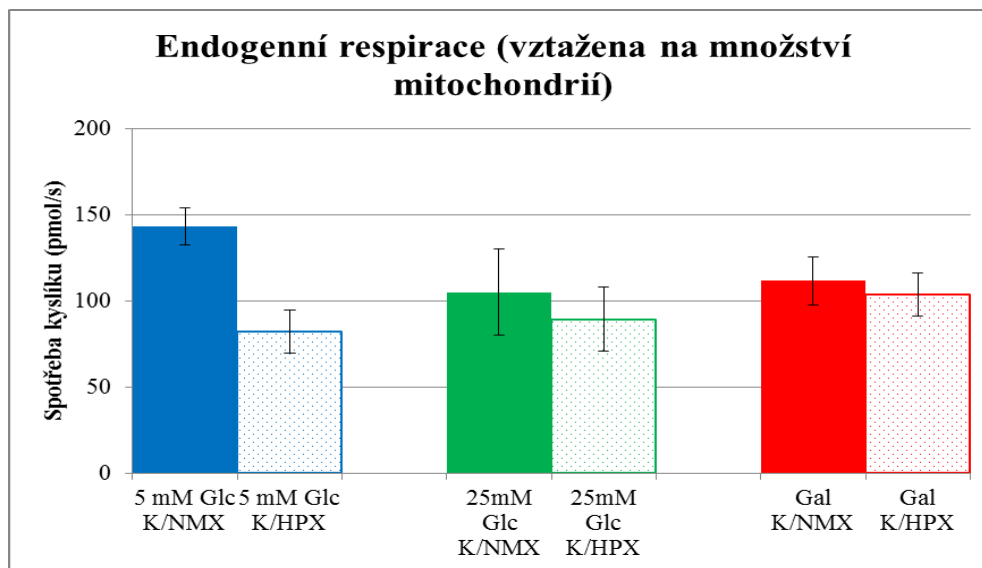
Pro snadnou orientaci v grafech doporučuji shlédnout obr. 13 na str. 33.

### 6.6.3. Endogenní respirace buněk HepG2 vztažená na množství mitochondrií

Semikvantifikací mitochondrií jsme zjistili, že buňky pěstované v médiu s galaktosou mají více mitochondrií. Proto je nezbytné pro další experimenty vztáhnout naměřenou hodnotu endogenní respirace (kap. 6.5) na počet mitochondrií, abychom zjistili aktivitu samotné mitochondrie. Jelikož byla endogenní respirace proměřována vždy u stejného počtu buněk, lze tedy tento vztah provést.

Z výsledků vyplývá, že buňky pěstované za hypoxie v Gal K mají mírně zvýšenou aktivitu mitochondrií, oproti glykemickým a hyperglykemickým buňkám v hypoxii. Za normoxie bychom předpokládaly stejný trend, ovšem dle výsledků mají mitochondrie nejvyšší aktivitu u 5mM Glc K/NMX, což připisujeme nepřesnosti metod (SDS elektroforézy a Western blotu) (obr. 28).

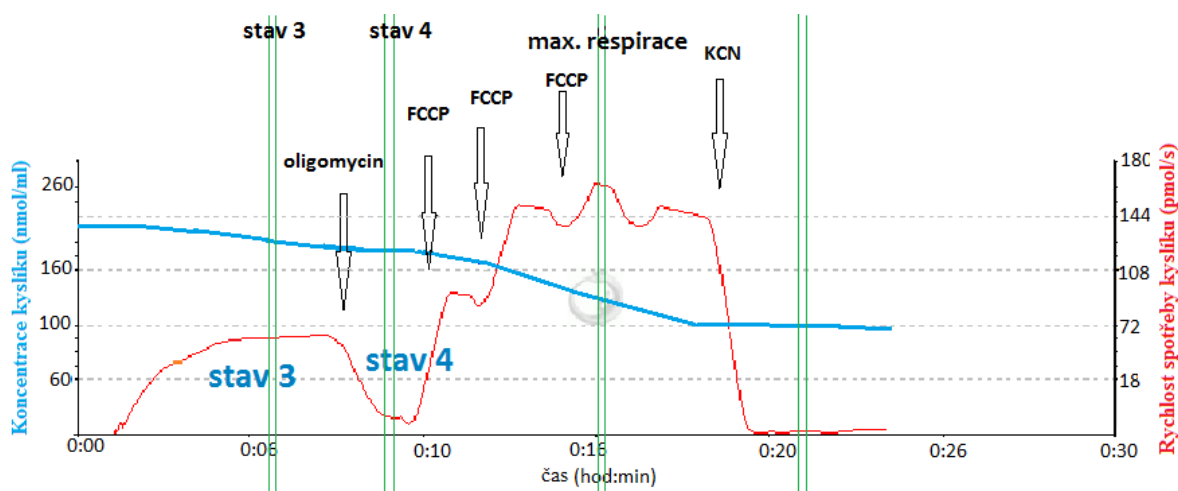
Takový převod jsme již neprováděli u buněk pěstovaných v médiích bez pyruvátu, protože hodnoty endogenní respirace se od kompletních médií příliš nelišily, a totéž platí u detekce Tim 23. Proto předpokládáme podobný trend jako na obr. 28.



obr. 28: Endogenní respirace buněk HepG2 v kompletních médiích za normoxie (NMX) a hypoxie (HPX) vztažená na počet mitochondrií. Kvantifikace mitochondrií byla provedena metodami SDS elektroforézou a Western blotem s imunodetekcí mitochondriálního translokátoru Tim 23.

## 6.7. Index respirační kontroly

Z křivek závislosti rychlosti spotřeby  $O_2$  na čase (obr. 29), získáme hodnoty pro dané stavy: stav 3 (endogenní respirace) a stav 4 (inhibice respirace oligomycinem). Z poměru stavu 3 a stavu 4 získáme důležitý parametr pro mitochondriální integritu *Index respirační kontroly (IRK)*.

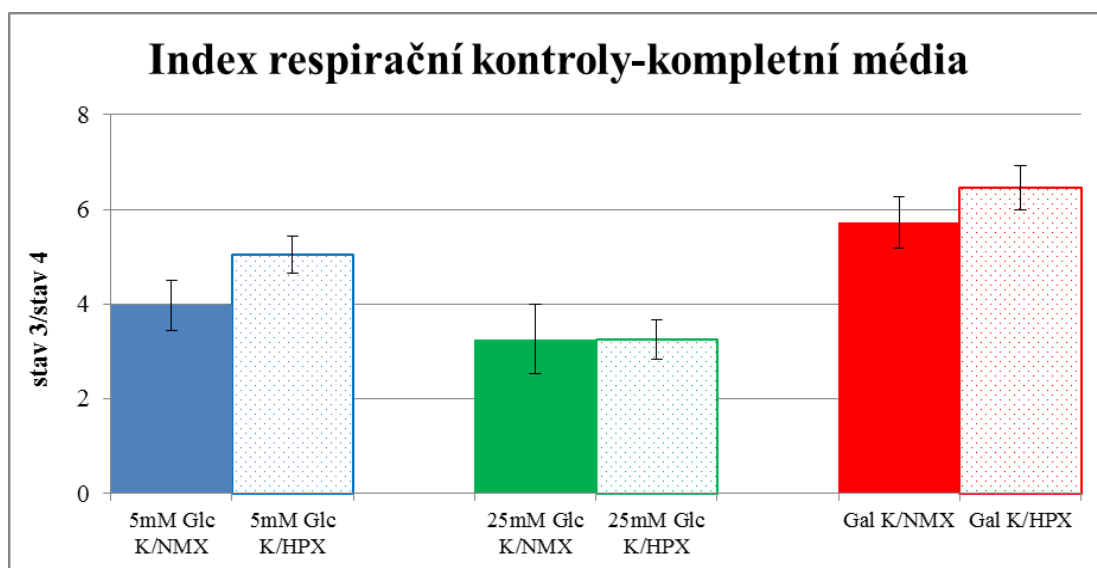


Obr. 29 : Graf závislosti koncentrace  $O_2$  (modrá křivka), její první derivace-rychlost spotřeby  $O_2$  (červená křivka) na čase, který je vytvořen programem DatLab. Černé šipky znázorňují přidávek určitého aktivátoru/inhibitoru respirace. Pro získání hodnot pro daný stav byla označena část křivky rychlosti spotřeby kyslíku (zelenými svislými čarami) v okamžiku ustálení v daném stavu a hodnoty byly zprůměrovány.

### 6.7.1. IRK-kompletní média

Z hodnot stavu 3 a stavu 4 byly vypočteny IRK pro buňky inkubované v kompletních médiích. (Hodnoty stavů není nutné převádět dle množství mitochondrií, protože se jedná o poměr.) Nejnižší IRK bylo vypočteno u hyperglykemických buněk (25mM Glc K): průměrná hodnota 3,26 za normoxie a hodnota 3,25 za hypoxie. Buňky rostlé v 5mM Glc K médiích vykazovaly mírně zvýšené hodnoty IRK: 3,97 za normoxie a 5,04 za hypoxie, tedy zřejmě 5mM Glc mají více aktivní mitochondrie a respirační řetězec, s menším množstvím úniků  $H^+$ . Buňky využívající galaktosu mají jak hodnoty endogenní respirace, tak i IRK nejvyšší: průměrná hodnota 5,72 v normoxii a 6,46 v hypoxii (obr 30, str. 66). Nejvyšší hodnoty IRK napovídají, že galaktosové buňky využívají respirační řetězec pro výrobu ATP mnohem více než buňky glykemické. Pozoruhodný výsledek je

zvýšení IRK u galaktosových a glykemických buněk za hypoxie, což naznačuje zvýšenou efektivitu mitochondriální respirace za hypoxie.

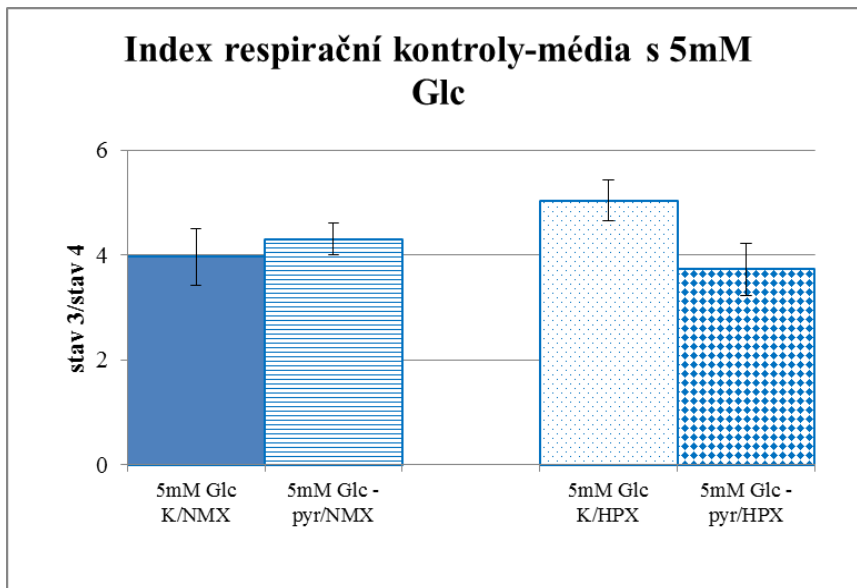


Obr 30: Indexy respirační kontroly (IRK= stav 3/stav4) buněk v kompletních médiích za normoxie (NMX) a hypoxie (HPX).

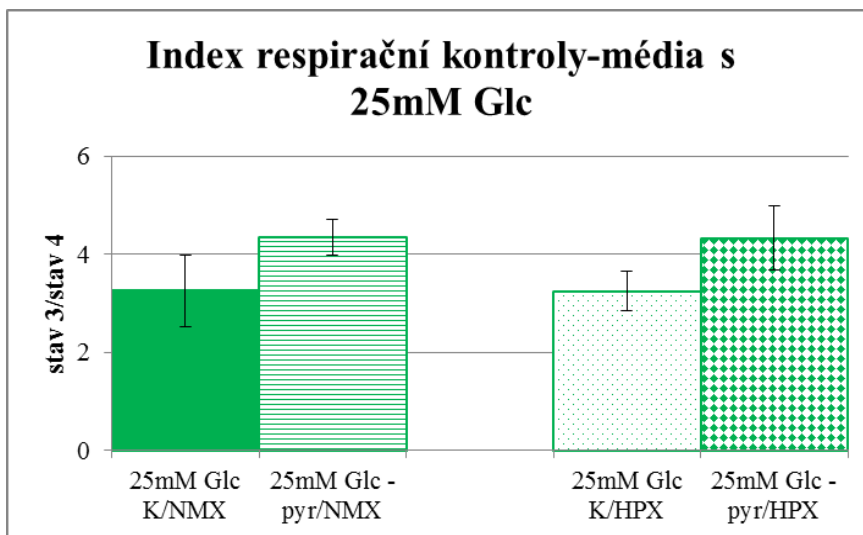
### 6.7.2. IRK-média bez pyruvátu

IRK vypočtené u buněk pěstovaných v médiích bez pyruvátu jak v normoxii, tak v hypoxii, se příliš nelišilo od kompletních médií za daných podmínek. Za normoxických podmínek jsme předpokládali, že by pyruvát neměl mít velký vliv na respiraci, za hypoxických podmínek by mohlo docházet k mírnému snížení hodnot IRK. Dle výsledků ale nedochází k výrazným změnám ani za hypoxie (jen IRK u 5mM Glc –pyr/HPX je oproti Glc K/HPX mírně snížen), směrodatné odchylky nenabývají statistické významnosti (obr. 31, str. 67).

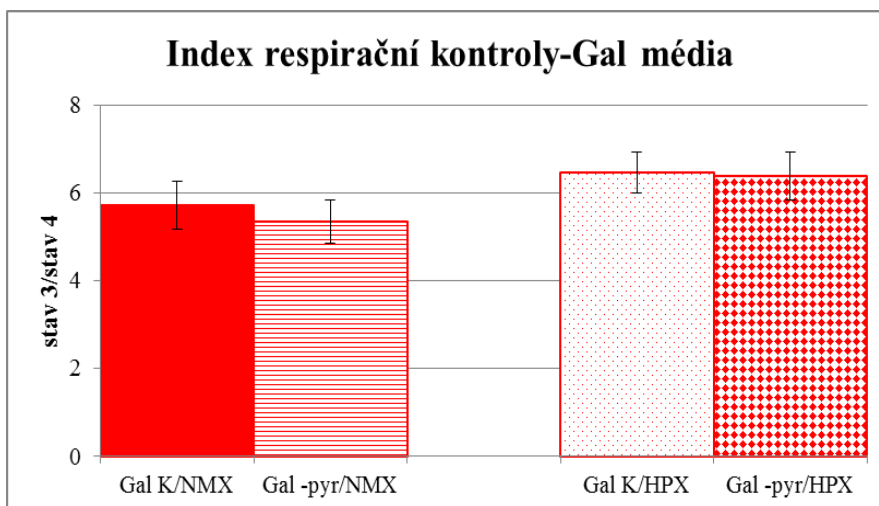
a.)



b.)



c.)



Obr. 31: Grafy IRK buněk pěstovaných v 5mM Glc médiích (a), 25mM Glc médiích (b) a Gal médiích (c).

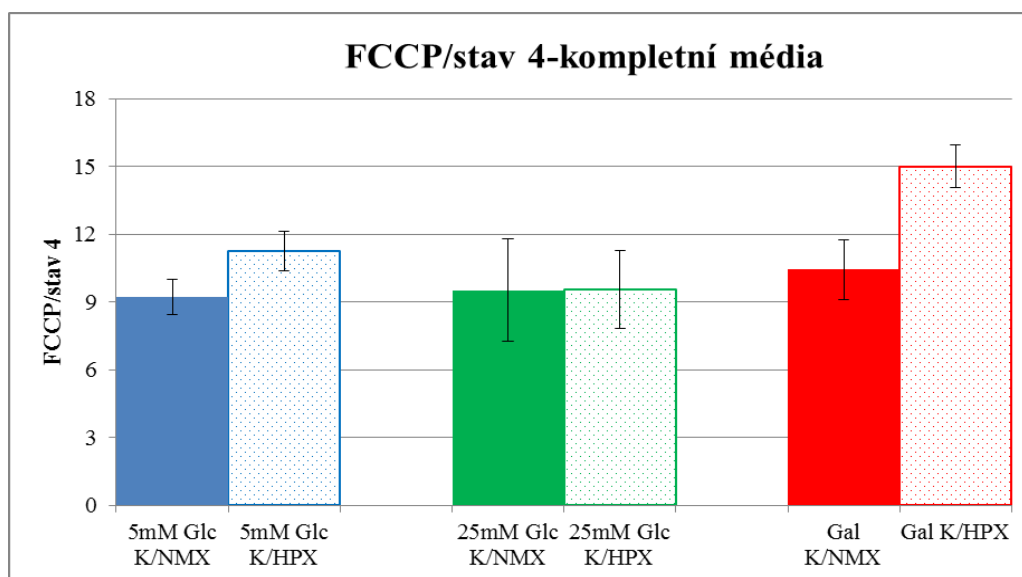
Pro snazší orientaci v grafech doporučuji shlédnutí obr. 13 na str. 33.

## 6.8. Poměr FCCP/stav 4

Získali jsme hodnoty maximálního „odpřažení“ postupnou titrací FCCP a hodnoty stavu 4 (přídavkem oligomycinu), a tím byl určen poměr FCCP/stav 4.

### 6.8.1. FCCP/stav 4-kompletní média

Tento poměr určuje, jaká je maximální kapacita respirace s ohledem na úniky  $H^+$  z mezimembránového prostoru do matrixu (kap. 5.6.3.). Jak již bylo očekáváno vzhledem k předchozím měření, buňky kultivované v Gal K/NMX i HPX mají hodnoty poměru FCCP/stav 4 zvýšené (oproti glykemickým a hyperglykemickým buňám): průměrná hodnota 10,44 pro normoxii a hodnota 14,99 pro hypoxii. U glykemických buněk (5mM Glc K/NMX a HPX) byla spočtena průměrná hodnota 9,20 pro NMX, a hodnota 11,26 pro HPX. U hyperglykemických buněk (25mM Glc K) jsou hodnoty pro normoxii (9,52) a hypoxii (9,56) nižší, což vypovídá menší efektivitě respiračního řetězce (obr. 32). Opět můžeme pozorovat zvýšení maximální kapacity řetězce u galaktosových a glykemických buněk v hypoxii (tak jako u hodnot IRK).

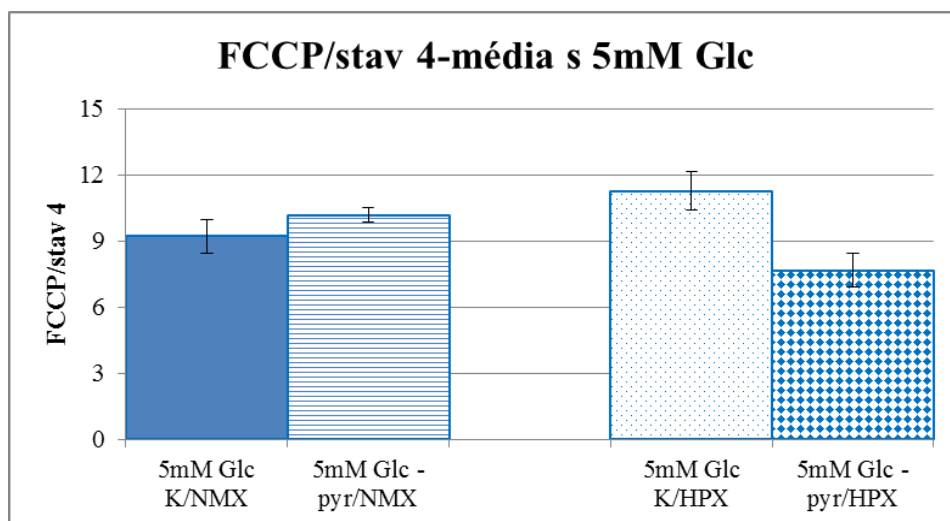


Obr. 32: Poměr FCCP/stav 4 buněk HepG2 v kompletních médiích (K) za normoxie (NMX) a hypoxie (HPX).

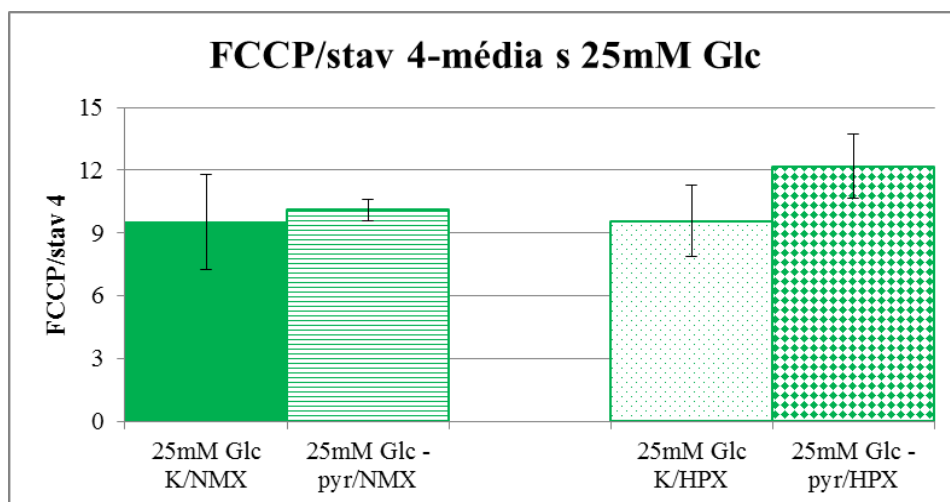
### 6.8.2. FCCP/stav 4-média bez pyruvátu

Za normoxických podmínek nedochází k výrazné změně při porovnání médií bez pyruvátu a kompletních médií u všech druhů médií. Za hypoxických podmínek dochází k poklesu kapacity řetězce u buněk pěstovaných v médiích bez pyruvátu (mimo 25mM Glc médií, kde je chyba zřejmě způsobena odchylkou hodnot) (obr. 33).

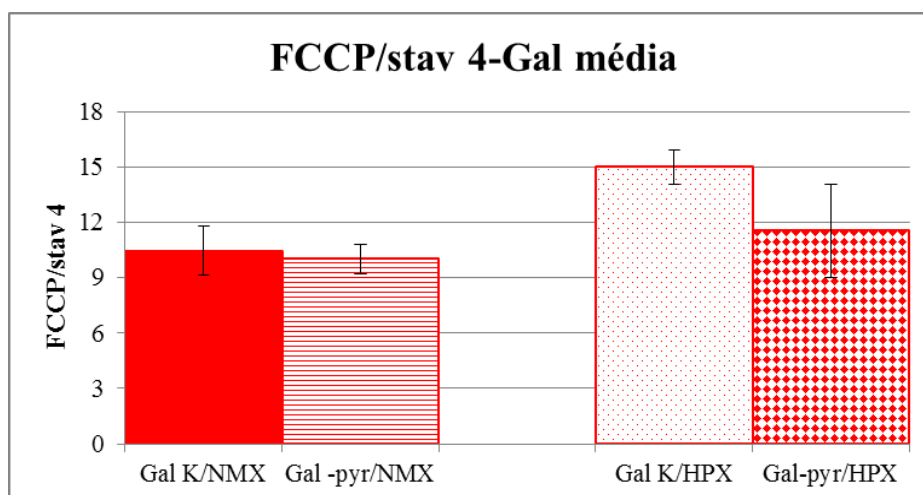
a.)



b.)



c.)



Obr. 33: Poměr FCCP/stav 4 u buněk v 5mM Glc médiích (a.), 25mM Glc médiích (b) a Gal médiích (c.) za normoxie (NMX) a hypoxie (HPX).

Pro snazší orientaci v grafech doporučuji shlédnout obr. 13 na str. 33.

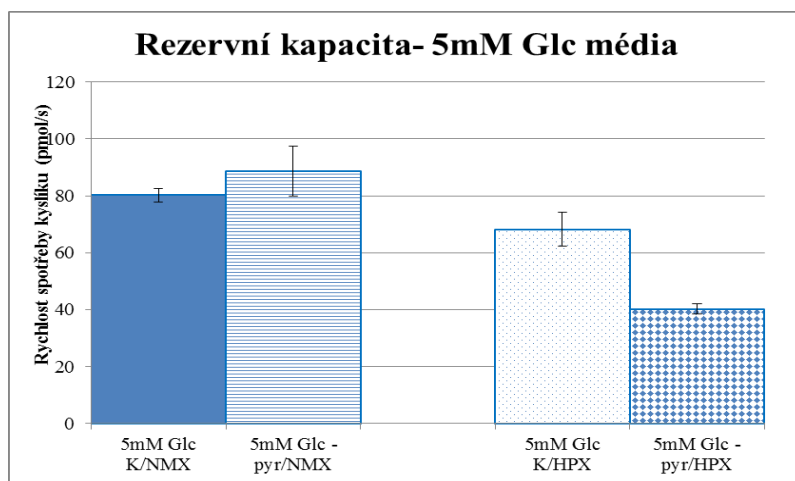
## 6.9. Rezervní kapacita respiračního řetězce

Rezervní kapacita je důležitým parametrem respirometrie, který udává rozdíl mezi maximální respirací dosaženou přidávkem FCCP (limitní se stává kapacita řetězce a dostupnost substrátů) a endogenní respirací, kdy buňka využívá respirační řetězec dle podmínek a také dostupnosti substrátu (obr. 15, str. 46).

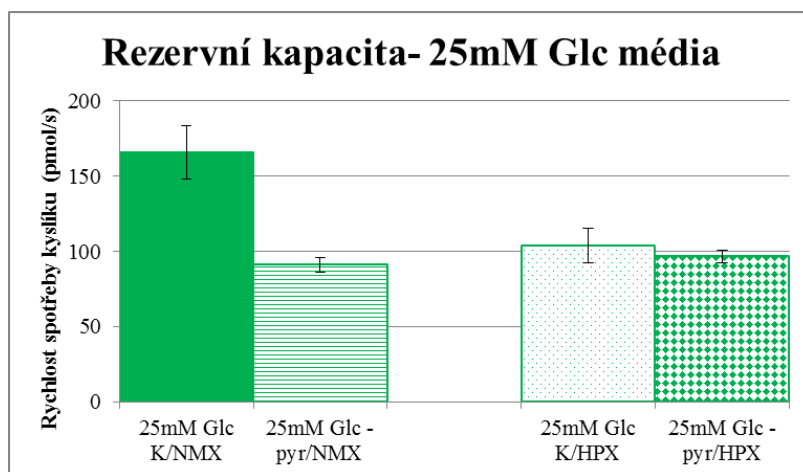
Porovnáme-li mezi sebou buňky pěstované v kompletním médiu a médiu bez pyruvátu, můžeme zpozorovat, že rezervní kapacita je u všech kompletních médií v hypoxii i normoxii vyšší oproti médiu bez pyruvátu (obr. 34, str. 71). Jen u buněk pěstovaných v 5mM Glc K/NMX je rezervní kapacita nižší, což přisuzujeme odchylce hodnot. Tento trend znamená, že pyruvát přítomný v kompletním médiu pravděpodobně zvyšuje rezervní kapacitu respiračního řetězce buněk HepG2, zejména za hypoxie (ale i normoxie), neboť ho buňka může použít jako substrát pro maximální „odpřažení“ (kap.6.8.2.) (tedy maximální respiraci).

U Gal K/HPX můžeme pozorovat zvýšení rezervní kapacity oproti Gal K/NMX, což u glykemických a hyperglykemických buněk není zřejmé.

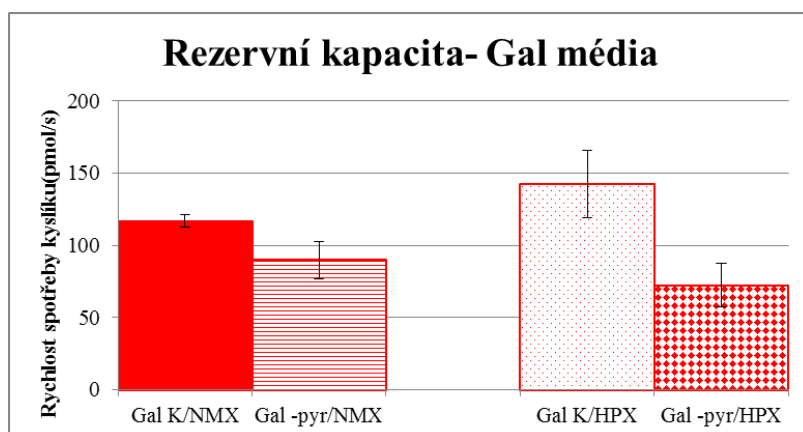
a.)



b.)



c.)



Obr. 34: Rezervní kapacita buněk HepG2 kultivovaných v 5mM Glc médiích (a.), 25mM Glc médiích (b.) a Gal médiích (c.) za normoxie (NMX) a hypoxie (HPX).

Pro snazší orientaci v grafech doporučuji náhled na obr. 13, str. 33



## 7. Diskuse

Cílem této diplomové práce je prověřit energetický metabolismus buněk HepG2 v závislosti na různých energetických substrátech a podmínkách různé koncentrace O<sub>2</sub>. Jako dva základní substráty jsme užívali glukosu a galaktosu, které ovlivňují energetický metabolismus. Dále jsme pozorovali změny v metabolismu vlivem hypoxických podmínek (5% O<sub>2</sub> a 5% CO<sub>2</sub>).

Vzhledem k masivní invazi nádoru dochází často ve tkáních k poruchám angiogeneze a tím k poklesu přísunu živin a kyslíku [6]. Některé mikroregiony nádoru se tak ocitají v hypoxii (někdy až v anoxii). Proto je výzkum vlivu hypoxického prostředí na nádorovou buňku důležitý. Pro přežití a adaptaci buňky na hypoxické prostředí je klíčová aktivace faktoru HIF-1, který ovlivňuje mimo jiné energetický metabolismus buňky [15]. HIF-1 působí jako transkripční faktor a ovlivňuje aktivitu různých enzymů (např. glykolytických enzymů [50], pyruvátdehydrogenasového komplexu [51], laktátdehydrogenasy [52] atd.). Tím způsobí „přepnutí“ energetického metabolismu buňky z oxidativní fosforylace na aerobní glykolýzu [13], [41] (tento jev je nazýván Warburgův efekt [64]). Zároveň HIF-1 „spolupracuje“ s různými onkogeny a tumor supresorovými geny buňky [12].

Existuje mnoho prací, které dokazují, že přítomnost exogenní glukosy u nádorové buňky způsobí přesmyk energetického metabolismu z oxidativní fosforylace na efektivně a rychle probíhající aerobní glykolýzu [64], [93]. Tento efekt byl nazván Crabree efekt [91], [92]. Tuto inhibici oxidativní fosforylace způsobí i několik dalších hexos (fruktosa, glukosa-6-fosfát, fruktosa-6-fosfát, glyceraldehyd-3-fosfát nebo PEP) [93].

Energetický metabolismus buňky je spojen i s rychlostí proliferace buňky. Proto jsme v první řadě stanovili generační dobu experimentálního modelu: nádorových buněk HepG2 (z jaterního karcinomu). Zjistili jsme, že opravdu vlivem exogenní 10mM galaktosy dochází ke změnám v rychlosti proliferace (v porovnání s buňkami pěstovaných v 5mM glukose). Dochází ke zpomalení proliferace (dvakrát delší generační doba).

Vlivem vyšší koncentrace glukosy (hyperglykemické buňky, 25mM glukosa) dochází k ještě rychlejší proliferaci buněk než u glykemických buněk (5mM glukosa).

K podobným závěrům dochází R. Rossignol et al., kteří se zabývají rychlostí proliferace HeLa buněk (z karcinomu děložního čípku) pěstovaných v 25mM glukose a 10mM galaktose. Pěstováním buněk v médiích obsahující tyto různé hexosy dochází

k závěrům, že se generační doba buňky HeLa rostoucí na 10mM galaktose prodloužila (až třikrát), oproti buňkám HeLa rostoucím na 25mM glukose [88].

Galaktosa je zpracována buňkou mnohem pomaleji než glukosa. Po vstupu do buňky je galaktosa nejdříve tří krokovou reakcí za spotřeby ATP přeměněna na glukosu-6 fosfát a až teprve pak může vstoupit do procesu glykolýzy. Tyto reakce přeměny jsou pomalé a limitující, a tedy buňka využívající galaktosu musí mít k dispozici ještě nějaký exogenní energetický substrát. Tím zdrojem je aminokyselina glutamin- ten je po vstupu do buňky přeměněn glutamínem na glutamát a dále je transaminační reakcí konvertován na anaplerotický substrát  $\alpha$ -ketoglutarát [86], [107]. Zajišťuje nejen syntézu mnoha aminokyselin, ale je nepostradatelným zdrojem pro Krebsův cyklus (a s ním spojen respirační řetězec, i syntéza lipidů z citrátu) [110]. Sice je glutamin majoritním zdrojem energie a živin v médiích s obsahem galaktosy, ale jak se ukázalo v našich experimentech, galaktosa je také nezbytně důležitá, protože buňky HepG2 nebyly schopny přežít a množit se, pokud v médiu nebyla přítomna galaktosa. Galaktosa zajišťuje syntézu nukleových kyselin (pentosa fosfátovým cyklem) a dalších potřebných metabolitů (aminokyselin).

Pro buňky HepG2, které jsou pěstovány v médiu s obsahem glukosy, je glutamin také nezbytně důležitý (přesto majoritním zdrojem energie v těchto médiích je glukosa), protože pokud jsme buňkám HepG2 nedodávali exogenní glutamin a pyruvát, buňky nebyly schopny proliferace a snižoval se jejich počet. Přitom pokud nebyl v médiu přítomen pouze pyruvát, buňky se množily podobně jako v kompletních médiích.

V hypoxickém prostředí je proliferace buňky zpomalena. U hyperglykemických buněk HepG2 v hypoxii se generační doba zdvojnásobila oproti normoxii. U buněk pěstovaných v 10mM galaktose se generační doba téměř ztrojnásobila. Buňka je závislá na metabolismu využívající limitní množství kyslíku, což zahrnuje mimo jiné omezenou respiraci, rychlost zpracování substrátů a jiných procesů. Závisí také na rychlosti adaptace buněk na hypoxii, která zahrnuje zejména aktivaci faktoru HIF-1. Rychlost aktivace HIF-1 je klíčová v procesu adaptace a tím úpravě metabolismu, který podpoří proliferaci buňky a umožní přežití v hypoxických podmínkách.

Proto jsme v této práci sledovali stabilizaci faktoru HIF-1 v časovém rozmezí u buněk pěstovaných v hypoxii, protože rychlost nástupu stabilizace podjednotky HIF-1 $\alpha$  je pro buňku v hypoxii zásadní. Už po třech hodinách, kdy buňky byly ponechány v hypoxii, byla koncentrace HIF-1 $\alpha$  (sledovali jsme podjednotku  $\alpha$ , která se stabilizuje až při nízké koncentraci kyslíku, jako reakce na hypoxické podmínky) u buněk pěstovaných v médiu

s glukosou (5mM i 25mM glukosou) více než 90%, po 5 hodinách byla koncentrace nejvyšší (100%). U buněk pěstovaných v 10mM galaktose byl nástup stabilizace HIF-1 $\alpha$  pozvolnější, ale po 5 hodinách byla koncentrace HIF-1 $\alpha$  také nejvyšší. Po tomto vrcholu došlo u všech sledovaných buněk HepG2 k poklesu koncentrace HIF-1 $\alpha$ , po 7 hodinách už je koncentrace HIF-1 $\alpha$  mírně snížena (u galaktosových buněk k poklesu dochází pozvolněji než u glukosových). Tyto výsledky dokazují reakci buňky na hypoxii aktivací faktoru HIF-1 $\alpha$ , a následnou adaptaci (snižováním stabilizovaného HIF-1 $\alpha$ ), což je pravděpodobně zapříčiněno i klesající koncentrací mitochondriálních ROS (reaktivní formy kyslíku) (viz. 2.2.4.). HIF-1 $\alpha$  může být mimo jiné aktivován vysokou koncentrací glukosy (i za normoxických podmínek) [data laboratoře Dr. Ježka], [115], což poukazuje na nejsilnější stabilizaci HIF-1 $\alpha$  u hyperglykemických buněk.

HIF-1 působí jako transkripční faktor. V rámci adaptace buňky na hypoxii HIF-1 moduluje přestavbu energetického metabolismu, nejen zvýšením exprese glukosových transporterů GLUT 1 a GLUT 3 [48], ale i regulací exprese glykolytických enzymů a tím dojde ke zvýšení rychlosti příjmu a zpracování glukosy (galaktosy) [50]. Zvýšením rychlosti glykolýzy dojde také ke zvýšení produkce ATP. Dalším cílem faktoru HIF-1 je gen *pdk 1* pro kinasu-1 pyruvátdehydrogenasového komplexu (PDK-1), která fosforyluje podjednotku E1 komplexu PDH a tím ji inaktivuje. Pyruvát, který vzniká glykolýzou, nemůže vstupovat do Krebsova cyklu a dochází tak k jeho akumulaci [51]. HIF-1 proto zvyšuje expresi LDH (laktátdehydrogenasy), a tak je pyruvát redukován na laktát, který je odváděn do extracelulárního prostoru [12], [13].

Proto jsme v této práci ověřovali míru fosforylace PDH vlivem hypoxie u buněk HepG2 v závislosti na substrátu (galaktose a glukose). Všechny buňky v hypoxickém prostředí vykazovaly větší míru fosforylace PDH než buňky v normoxii v tomtéž médiu. Buňky pěstované v médiu s obsahem galaktosy vykazovaly menší rozsah fosforylace PDH, v porovnání s buňkami pěstovanými v 5mM a 25mM glukose. Glykemické buňky (i hyperglykemické) tedy mají výraznější odklon pyruvátu z Krebsova cyklu. Ověřili jsme zároveň, že exprese samotného PDH je ve všech buňkách HepG2 stejná, nemění ji ani vliv hypoxie, ani vliv odlišného energetického substrátu. Ovšem v práci R. Rossigola a kolektivu je možné nalézt, že buňky HeLa pěstované v médiu s 10 mM galaktosou mají vyšší expresi PDH oproti buňkám pěstovaným v médiu s 25mM glukosou [88]. Tento rozdíl může být způsoben zejména typem buňky (HepG2 vs. HeLa).

Jelikož jsme zjistili, že buňky HepG2 pěstované v médiu s 10mM galaktosou vykazují nižší fosforylaci PDH než glykemické a hyperglykemické buňky, dalo by se předpokládat, že budou produkovat i méně laktátu. Dalším experimentem jsme zjistili, že buňky pěstované v médiu s galaktosou produkují za normoxických podmínek 3x méně laktátu (a za hypoxických podmínek 2,5x méně) než glykemické buňky. Celkově za hypoxických podmínek všechny buňky produkovaly více laktátu než buňky pěstované v normoxii v tomtéž médiu, což koreluje s vyšší mírou fosforylace PDH za hypoxických podmínek.

Podobné výsledky o produkci laktátu (ale pouze za normoxie) popsali i Aguer et al. ve své práci s lidskými primárními myotuby, kde nastalo výrazné snížení produkce laktátu buňkami do média s 10 mM galaktosou, oproti glykemickým (5mM Glc) a hyperglykemickým (25mM Glc) buňkám primárních myotubů [116].

Fakt, že buňky HepG2 pěstované v médiu s galaktosou produkují méně laktátu, a fosforylace PDH probíhá oproti glykemickým (i hyperglykemickým) buňkám v menší míře, poukazuje na posílený oxidační metabolismus: využití substrátů z Krebsova cyklu pro respirační řetězec a výrobu ATP (potvrzujeme tím i Crabtree efekt). Skupina S. Rodriguez-Enriquez et al. objevila inhibici respirace v nádorových buňkách AS-30D pocházející z jaterního karcinomu, vlivem 5mM glukosy, 10mM fruktosy a dalších hexos, ovšem s výjimkou 10 mM galaktosy [93]. Exogenní galaktosa ovlivňuje energetický metabolismus jiným způsobem než glukosa, nedochází k inhibici respirace.

Do jaké míry využívá buňka respirační řetězec pro výrobu ATP, jsme ověřili vysokorezoluční respirometrií. Z hodnot rychlosti spotřeby kyslíku za inhibice komplexu V. dýchacího řetězce a také za použití „odpřahovače“ FCCP jsme zjišťovali různé parametry, které vypovídají o aktivitě mitochondrií, maximální kapacitě řetězce a rezervní kapacitě nebo integritě mitochondrií.

Nejdříve jsme stanovili hodnoty endogenní respirace, která vyjadřuje rychlost spotřeby kyslíku za nepřítomnosti inhibitoru nebo aktivátoru (buňka je závislá pouze na svých endogenních substrátech). Vyjadřuje tak aktivitu mitochondrií HepG2 buněk. Buňky pěstované za normoxických i hypoxických podmínek v médiu s 10mM galaktosou vykazovaly výrazně zvýšené hodnoty endogenní respirace oproti glykemickým i hyperglykemickým buňkám. Stanovili jsme i počet mitochondrií, protože endogenní respirace je ovlivněna počtem aktivních mitochondrií. I po přepočtu spotřeby kyslíku na

jednotlivé mitochondrie měly galaktosové buňky za hypoxie mírně zvýšenou hodnotu endogenní respirace.

Určením dalších respiračních stavů jsme za normoxických i hypoxických podmínek pozorovali trend zvýšené integrity mitochondrií i zvýšené maximální kapacity řetězce u buněk HepG2 pěstovaných v médiu s obsahem galaktosy oproti glykemickým i hyperglykemickým buňkám.

Ovšem zajímavým výsledkem této práce se stal objev, že buňky HepG2 pěstované v médiu s galaktosou za hypoxie dosáhly úplně nejvyšších hodnot integrity mitochondrií i maximální respirace (ze všech buněk používaných v této práci), i přesto, že jsme prokázali stabilizaci faktoru HIF-1 $\alpha$ , který buňce zajišťuje přesmyk energetického metabolismu ve prospěch glykolýzy a spíše inhibuje respiraci. Dokonce i rezervní kapacita, která byla u glykemických i hyperglykemických buněk pěstovaných v hypoxii snížena oproti hodnotám v normoxii, byla u galaktosových buněk naopak zvýšena za hypoxie oproti normoxii. To naznačuje, že ačkoliv je za hypoxie HIF-1 $\alpha$  stabilizován u galaktosových buněk, dochází k přesmyku energetického metabolismu (směrem ke zrychlené glykolýze s potlačenou respirací) vlivem HIF-1 v mnohem menší míře, než je u glykemických a hyperglykemických buněk HepG2. Buňky pěstované na galaktose i za hypoxie mají zřejmě dostatek substrátu pro respiraci (využívají zejména glutamin), což jsme dokázali zvýšenou hodnotou poměru FCCP/stav 4 ale i IRK (index respirační kontroly), který je závislý mimo jiné na dostatku substrátu pro respiraci. Využití substrátu respirací také dokazuje snížená produkce laktátu, jako odpadního produktu. Další možnou příčinou může být fakt, že za hypoxie dochází ke zpomalenému toku elektronů přes komplexy dýchacího řetězce a spolu s vtokem substrátu to vede k optimalizaci a zefektivnění chodu respiračního řetězce. To jistě také ovlivní produkci ROS.

Jelikož jsme studovali roli energetického metabolismu za různých podmínek pO<sub>2</sub>, další fází našeho výzkumu bylo zjištění role exogenního pyruvátu u buňky HepG2.

Porovnávali jsme mezi sebou rychlost proliferace, endogenní respiraci, poměr FCCP/stav 4, produkci laktátu, míru fosforylace PDH a rezervní kapacitu buněk HepG2 pěstovaných v kompletním médiu a médiu bez pyruvátu.

Dle publikace A. R. Diers et al. pyruvát v médiu hraje významnou roli při proliferaci buněk MCF7 (z lidského adenokarcinomu prsu) [109]. V našich experimentech u buněk HepG2 pěstovaných v médiu bez obsahu pyruvátu za normoxie se generační doba

jen mírně prodloužila v porovnání s kompletními médii. Stejně tak pyruvát hraje bezvýznamnou roli ve fosforylaci PDH a produkci laktátu. Všechna získaná data jsou jen nepatrně odlišná od kompletních médií za normoxických podmínek. Ovšem jak uvádí Diers et al., pyruvát zvyšuje u buněk MCF7 rezervní kapacitu respiračního řetězce [109]. My jsme dosáhli stejného výsledku u všech buněk HepG2 (hyperglykemických, glykemických i galaktosových) za normoxie i hypoxie: buňky HepG2 pěstované za normoxických podmínek mají v průměru zvýšenou rezervní kapacitu v přítomnosti exogenního pyruvátu.

Za hypoxických podmínek jsme pozorovali také mírné prodloužení generační doby v nepřítomnosti pyruvátu u všech buněk HepG2. Ale na rozdíl od normoxických podmínek pyruvát přispívá za hypoxie k produkci laktátu (mírně zvýšená produkce laktátu všech buněk HepG2 v přítomnosti exogenního pyruvátu), a dále pyruvát přispěl ke zvýšení maximální kapacity i rezervní kapacity řetězce. Z toho vyplývá, že pro buňky v hypoxii se pyruvát stává využitelným substrátem pro přežití buňky ve stavu sníženého  $pO_2$ .

Při výzkumu energetického metabolismu buněk HepG2 pěstovaných v médiích se substrátem galaktosou (a glutaminem) jsme zjistili, že tyto buňky využívají daleko více oxidační metabolismus spojený s respirací oproti buňkám pěstovaných v glukose, a to i za hypoxických podmínek, které se často v průběhu invaze tumoru objevují. Hypoxické podmínky paradoxně přispívají k vyšší kapacitě respiračního řetězce a aktivitě mitochondrií těchto buněk, a to navzdory stabilizovanému HIF-1 $\alpha$ . Pokud bychom se podívali na rychlost proliferace těchto buněk, zjistíme, že se množí daleko pomaleji, než buňky čerpající jako zdroj glukosu. Buňky rostoucí na glukose jsou mnohem více odolné vůči působení nízkého  $pO_2$ , protože jejich ústřední metabolickou dráhou je glykolýza s potlačenou respirací, a tak spotřebují daleko méně kyslíku- ten je v mnoha nádorech limitující složkou. Tohoto faktu by se dalo využít zejména při léčbě rakoviny, protože pokud víme, že nádory využívající oxidační metabolismus jsou méně odolné, mohly bychom v budoucnu přispět k novým metodám léčby rakoviny, které budou založeny právě na „přesmyku“ energetického metabolismu na oxidační.

## 8. Závěr

Studovali jsme energetický metabolismus buněk HepG2, který byl ovlivňován energetickými substráty glukosou a galaktosou (a glutaminem) za mírných hypoxických podmínek (porovnávali jsme s normoxickými podmínkami). Za hypoxie dochází reakcí buňky na nízký  $pO_2$  k aktivaci faktoru HIF-1, který je nezbytný pro přežití buněk. HIF-1 moduluje energetický metabolismus ve prospěch rychle probíhající aerobní glykolýzy, odklonu pyruvátu z Krebsova cyklu a tím zvýšené produkce laktátu a inhibice respirace. U všech buněk HepG2 v hypoxii (pěstovaných v glukose i galaktose) došlo k aktivaci HIF-1. U buněk, které byly pěstovány v glukose, došlo k výše popsanému přesmyku energetického metabolismu.

Zajímavým paradoxem ovšem byla reakce buněk pěstovaných na galaktose. U nich nedošlo k modulaci metabolismu vlivem HIF-1, zachovaly si oxidační metabolismus a vlivem hypoxie došlo ještě ke zvýšení integrity buněk, maximální kapacity respiračního řetězce a rezervní kapacity oproti normoxickým podmínkám. Jelikož respirační řetězec, jako zdroj ATP, vyžaduje množství substrátů pocházejících z Krebsova cyklu, nedochází ani k inhibici Krebsova cyklu, jako u buněk v glukose. Tím se také snížila produkce laktátu, jako odpadního produktu. Galaktosa v těchto buňkách je zpracována aerobní glykolýzou, která zajišťuje buňce „stavební kameny“ pro růst, zejména nukleové kyseliny a aminokyseliny. Ovšem pro produkci energie je využit spíše glutamin. Galaktosa je buňkou zpracována mnohem pomaleji než glukosa, a tento fakt se i odráží na rychlosti proliferace. Galaktosové buňky se množí až dvakrát pomaleji, než buňky glykemické a to i v hypoxickém prostředí. Toho by se dalo využít při léčbě rakoviny.

## Seznam použité literatury:

1. Hochachka, P.W.: Mechanism and evolution of hypoxia-tolerance in humans; *J. Exp. Biol.* **201**, 1243–1254 (1998)
2. Folkman, J.; Hahnfeltd, P.; Hlatky, L.: Cancer looking outside the genome; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 76-79 (2000)
3. Brahim-Horn M. C.; Pouyssegur, J.: Oxygen, a source of life and stress; *FEBS Lett.* **581**, 3582-3591 (2007)
4. Brooks, A. J.; Eastwood, J.; Beckingham, I. J.; Girling, K.J.: Liver tissue partial pressure of oxygen and carbon dioxide during partial hepatectomy; *Br. J. Anaesth.* **92**, 735-737 (2004)
5. Hoppeler, H.; Vogt, M.; Weibel, E.R.; Fluck, M.: Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia; *Exp. Physiol.* **88**, 109-19 (2003)
6. Vaupel, P.; Hockel, M.; Mayer, A.: Detection and characterization of tumor hypoxia using pO<sub>2</sub> histography; *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 1221-35 (2007)
7. Rijken, P.F.; Bernsen, H. J; Peters, J. P; Hodgkiss, R.J; Raleigh, J.A; van der Kogel, A. J.: Spatial relationship between hypoxia and the (perfused) vascular network in a human glioma xenograft: a quantitative multi-parameter analysis; *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **48**, 571-582 (2000)
8. Vaupel, P.: Tumor microenvironment physiology and its implications for radiation oncology; *Semin. Radiat. Oncol.* **14**, 198-206 (2004)
9. Dewhirst, M. W.; Braun, R. D.; Lanzen, J. L.; Temporal changes in pO<sub>2</sub> of R3230AC tumors in Fischer-344 rats; *Int. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **42**, 723-726 (1998)
10. Rofstad, E. K; Sundfor, K.; Lyng, H.; Tropé, C. G.: Hypoxia-induced treatment failure in advanced squamous cell carcinoma of the uterine cervix is primarily due to hypoxia-induced radiation resistance rather than hypoxia-induced metastasis; *Br. J. Cancer* **83**, 354-359 (2000)
11. Cairns, R. A.; Kalliomaki, T.; Hill, R. P.: Acute (cyclic) hypoxia enhances spontaneous metastasis of KHT murine tumors; *Cancer. Res.* **61**, 8903-8908 (2001)
12. Semenza, G. L.: Targeting HIF-1 for cancer therapy; *Nat. Rev. Cancer* **3**, 721-732 (2003)
13. Semenza, G. L.: Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia inducible factor 1; *Biochem. J.* **405**, 1-9 (2007)
14. Wenger, R. H.; Stiehl, D. P.; Camenish, G.: Integration of oxygen signaling at the consensus HRE; *Sci. STKE* **306**, re12 (2005)
15. Klimova, T.; Chandel N. S.: Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF; *Cell Death Differ.* **15**, 660-666 (2008)
16. Semenza, G. L; Nejfelt, M. K.; Chi, S. M.; Antonarakis, S. E.: Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5680–5684 (1991)
17. Semenza, G. L.; Wang, G. L.: 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**, 5447–5454 (1992)
18. Wiesener, M.S.; Jürgensen, J.S.; Rosenberger. C.; Scholze, C.K.; Hörstrup, J.H.; Warnecke, C.; Mandriota, S.; Bechmann, I.; et al Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs; *FASEB J.* **17**, 271-273 (2003)



19. Gruber, M.; Hu, C.J.; Johnson, R.S.; Brown, E. J.; Keith, B.; Simon, M. C.: Acute postnatal ablation of HIF-2 $\alpha$  results in anemia; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 2301-2306 (2007)
20. Kaelin, W. G. Jr.; Ratcliffe, P. J.: Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway; *Mol. Cell* 30, 393-402 (2008)
21. Lando, D.; Peet, D.J.; Gorman, J.J.; Whelan, D. A.; Whitelaw, M. L.; Bruick, R. K.: FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor; *Genes Dev.* 16, 1466-71 (2002)
22. Lando, D.; Peet, D. J.; Whelan, D. A.; Gorman, J. J.; Whitelaw, M. L.: Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch; *Science* 295, 858-861 (2002)
23. Semenza, G. L.: HIF-1 and human disease: one highly involved factor; *Genes Dev.* 14, 1983-1991 (2000)
24. Maxwell, P. H.; Wiesener, M. S.; Chang, G. W.; Clifford, S. C.; Vaux, E. C.; Cockman, M. E. et al: The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis, *Nature* 399, 271-275 (1999)
25. Greer, S. N.; Metcalf, J. L.; Wang, Y.; Ohh, M.: The updated biology of hypoxia-inducible factor, *EMBO J.* 31, 2448-2460 (2012)
26. Chandel, N. S.; Maltepe, E.; Goldwasser, E.; Mathieu, M. C.; Simon, M. C.; Schumacker, P. T.: Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11715-11720 (1998)
27. Guzy, R. D.; Schumacker, P. T.: Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia; *Exp. Physiol.* 91, 807-819 (2006)
28. Gerald, D.; Berra, E.; Frapart, Y. M.; Chan, D. A.; Giaccia, A. J.; Mansuy, D.; et al.: JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress; *Cell* 118, 781-794 (2004)
29. Wenger, R. H.; Gassmann, M.: Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1.; *Biol. Chem.* 378, 609-616 (1997)
30. Dalgard, C. L.; Lu, H.; Mohyeldin, A.; Verma, A.: Endogenous 2-oxoacids differentially regulate expression of oxygen sensor; *Biochem. J.* 380, 419-424 (2004)
31. King, A.; Selak, M. A.; Gottlieb, E.: Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer; *Oncogene* 25, 4675-4682 (2006)
32. Pollard, P. J.; Briere, J. J.; Alam, N. A.; Barwell, J.; Barcay, E.; Wortham, N. C.; Hunt, T.; Mitchell, M.; Olphin, S.; Moat, S. J.; et. al: Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1 $\alpha$  in tumours which result from germline *FH* and *SDH* mutations; *Hum. Mol. Genet.* 14, 2231-2239 (2005)
33. Parsons, D.W.; Jones, S. ; Zhang, X.; Lin, J.C.; Leary, R.J.; Angenendt, P. ; Mankoo, P.; Carter, H.; Siu, I.M.; Gallia, G.L.; Olivi, A.; et al.: An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme, *Science* 321, 1807-1812 (2008)
34. Ward, P.S.; Patel, J.; Wise, D.R.; Abdel-Wahab, O.; Bennett, B.D. ; Collier, H.A. ; Cross, J.R.; Fantin, V.R.; Hedvat, C.V. ; Perl, A.E.: The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate, *Cancer Cell* 17, 225-234 (2010)
35. Yan, H.; Parsons, D. W.; Jin, G.; McLeondon, R.; Rasheed, B. A.; Yuan, W.; Kos, I.; Batinic-Haberle, I.; Jones, S.; Riggins, G. J.; et al: *IDH1* and *IDH2* mutations in gliomas; *N. Engl. J. Med.* 360, 765-773 (2009)

36. Dang, L.; White, D. W.; Gross, S.; Bennett, B. D.; Bittinger, M. A.; Driggers, E. M.; Fantin, V. R.; Jang, H. G.; Jin, S.; Keenan, M. C.; et al: Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate; *Nature* **462**, 739-744 (2009)
37. Fukuda, R.; Zhang, H.; Kim, J. W.; Shimoda, L.; Dang, C. V.; Semenza, G. L.: HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells; *Cell* **129**, 111-122 (2007)
38. Staller, P.; Sulitkova, J.; Lisztwan, J.; Moch, H.; Oakeley, E. J.; Krek, W.: Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumor suppressor pVHL; *Nature* **425**, 307-311 (2003)
39. Bell, E.L.; Emerling, B.M.; Ricoult, S.J.; Guarente, L.: SIRT3 suppresses hypoxia inducible factor 1alpha and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production; *Oncogene* **30**, 2986-2996 (2011)
40. Finley, L.W.; Carracedo, A.; Lee, J.; Souza, A.; Egia, A.; Zhang, J.; Teruya-Feldstein, J.; Moreira, P.I.; Cardoso, S.M.; Clish, C.B.; Pandolfi, P.P.; Haigis, M.C.: SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1alpha destabilization; *Cancer Cell* **19**, 416-428 (2011)
41. Denko, N.C.: Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour; *Nat. Rev. Cancer* **8**, 705-713 (2008)
42. Wang, G. L.; Semenza, G. L.: General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4304-4308 (1993).
43. Feldser D.; Agani, F.; Iyer, N. V.; Pak, B.; Ferreira, G.; Semenza, G. L.: Reciprocal Positive Regulation of Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  and Insulin-like Growth Factor 2; *Cancer. Res.* **59**, 3915-3918 (1999)
44. Kaluz, S.; Kaluzova, M.; Stanbridge, E. J.: Regulation of gene expression by hypoxia: Integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hypoxia-responsive element; *Clin. Chim. Acta* **395**, 6-13 (2008)
45. Chandel, N.; Budinger, G. R.; Kemp, R. A.; Schumacker, P. T.: Inhibition of cytochrome c oxidase activity during prolonged hypoxia; *Am. J. Physiol.* **268**, L918-925 (1995)
46. Hagen, T.; Taylor, C. T.; Lam, F.; Moncada, S.: Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1 $\alpha$ ; *Science* **302**, 1975-1978 (2003)
47. Herst, P. M.; Berridge, M. V.: Cell surface oxygen consumption: A major contributor to cellular oxygen consumption in glycolytic cancer cell lines; *Biochim. Biophys. Acta* **1767**, 170-7 (2007)
48. Maxwell P. H.; Dachs, G. U.; Gleadle, J. M.; Nicholls, L. G.; Harris, A. L.; Stratford, I. J.; Hankinson, O.; Pugh, C. W.; P. J. Ratcliffe: Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8104-8109 (1997)
49. Mathupala, S. P.; Rempel, A.; Pedersen, P. L.: Glucose Catabolism in Cancer Cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions; *J. Biol. Chem.* **276**, 43407-43412 (2001)
50. Iyer, N. V.; Kotch, L. E.; Agani, F.; Leung, S. W.; Laughner, E.; Wenger, R. H.; et al.: Cellular and developmental control of O<sub>2</sub>homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ; *Genes Dev.* **2**, 149-162 (1998)
51. Kim, J. W.; Tchernyshyov, I.; Semenza, G. L.; Dang, C. V.: HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia; *Cell Metab.* **3**, 177-85 (2006)
52. Semenza, G. L.; Jiang, B. H.; Leung, S. W.; Passantino, R.; Concordet, J. P.; Maire, P.; et al: Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate

- dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1; *J. Biol. Chem.* 271, 32529-32537 (1996)
53. Ullah, M. S.; Davies, A. J.; Halestrap, A. P.: The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 $\alpha$ -dependent mechanism; *J. Biol. Chem.* 281, 9030-9037 (2006)
  54. Jezek, P.; Hlavata, L.: Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism; *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 2478-2503 (2005)
  55. Droge, W.: Free radicals in the physiological control of cell function; *Physiol. Rev.* 82, 47-95 (2002)
  56. Raha, S.; Robinson, B. H.: Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing; *Trends Biochem. Sci.* 25, 502-507 (2000)
  57. De Grey, A. D.: HO<sub>2</sub>\*: The forgotten radical; *DNA Cell Biol.* 21, 251-257 (2002)
  58. Nicholls, D. G.; Ferguson, S. J.: Bioenergetics (3 vydání), London: Academic Press (2002)
  59. Hanahan, D.; Weinberg, R. A.: The hallmarks of cancer; *Cell* 100, 57-70 (2000)
  60. DeBerardinis, R.J.; Lum, J.J.; Hatzivassiliou, G.; Thompson, C.B.: The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation; *Cell Metab.* 7, 11-20 (2008)
  61. Pfeiffer, T.; Schuster, S.; Bonhoeffer, S.: Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways; *Science* 292, 504-507 (2001)
  62. Zu, X. L.; Guppy, M.: Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 459-465 (2004)
  63. Warburg, O.: On respiratory impairment in cancer cells; *Science* 124, 269-270 (1956)
  64. Moreno-Sanchez, R.; Rodriguez-Enriquez, S.; Marin-Hernandez, A.; Saavedra, E.: Energy metabolism in tumor cells; *FEBS J.* 247, 1393-1418 (2007)
  65. Gottlieb, E.; Tomlinson, I. P.: Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical up-date; *Nat. Rev. Cancer* 5, 857-866 (2005)
  66. Jones, R. G.; Thompson, C. B.: Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth; *Genes Dev.* 23, 537-548 (2009)
  67. Cotter, T. G.: Apoptosis and cancer: the genesis of a research field; *Nat. Rev. Cancer* 9, 501-507 (2009)
  68. Matoba, S., Kang, J. G.; Patino, W. D.; Wragg, A.; Boehm, M.; Gavrilova, O., et al.: p53 regulates mitochondrial respiration; *Science* 312, 1650-1653 (2006)
  69. Nisson, J. A.; Cleveland, J. L.: Myc pathways provoking cell suicide and cancer; *Oncogene* 22, 9007-9021 (2003)
  70. Dang, C. V.; Kim, J.; Gao, P.; Yustein, J.: The interplay between MYC and HIF in cancer; *Nat. Rev. Cancer* 8, 51-56 (2008)
  71. Dang, C. V.; Semenza, G. L.: Oncogenic alterations of metabolism; *Trends Biochem. Sci.* 24, 68-72 (1999)
  72. Kim, J. W.; Dang, C. V.: Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect; *Cancer Res.* 66, 8927-8930 (2006)
  73. Wise, D. R.; DeBerardinis, R. J.; Mancuso, A.; Sayed, N.; Zhang, X. Y.; Pfeiffer, H. K.; et al.: Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 18782-18787 (2008)
  74. Zhang, H.; Gao, P.; Fukuda, R.; Kumar, G.; et al: HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of c-MYC activity, *Cancer cell* 11, 407-420 (2007)

75. Pedersen, P. L.: Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen; *J. Bioenerg. Biomembr.* 39, 211-222 (2007)
76. Hammerman, P. S.; Fox, C. J.; Thompson, C. B.: Beginnings of a signal-transduction pathway for bioenergetic control of cell survival; *TIBS* 29, 586-592 (2004)
77. Mazurek, S.: Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells; *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 969-980 (2011)
78. Christofk, H.R.; Vander Heiden, M. G.; Harris, M. H.; Ramanathan, A.; Gerszten, R. E.; et al: The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth; *Nature* 452, 230-233 (2008)
79. Mazurek, S.; Zwerschke, W.; Jansen-Dur, P.; Eigenbrodt, E.: Effects of the human papilloma virus HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic-enzyme complex; *Biochem. J.* 356, 247-256 (2001)
80. Christofk, H. R.; Vander Heiden, M. G.; Wu, N.; Asara, J. M.; Cantley, L. C.: Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein; *Nature* 452, 181-186 (2008)
81. Eigenbrodt, E.; Leib, S.; Kramer, W.; Friis, R. R.; Schoner, W.: Structural and kinetic differences between the M2 type pyruvate kinases from lung and various tumors; *Biomed. Biochim. Acta* 42, S278-S282 (1983)
82. Ward, P. S.; Thompson, C. B.: Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even Warburg did not anticipate; *Cancer Cell* 21, 297-308 (2012)
83. Dang, C. V.; Hamaker, M.; Sun, P.; Le, A.; Gao, P.: Therapeutic targeting of cancer cell metabolism; *J. Mol. Med.* 89, 205-212 (2011)
84. Bellance, N.; Lestienne, P.; Rossignol, R.: Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis, *Front. Biosci.* 14, 4015-4034 (2009)
85. Wu, M.; Neilson, A.; Swift, A. L.; Moran, R.; Tamagnine, J.; Parslow, D.; et al: Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetics function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells; *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C125-136 (2007)
86. Reitzer, L.; Wice, B.; Kennel, D.: Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells; *JBC* 254, 2669-2676 (1979)
87. Rodriguez-Enriquez, S.; Carreno-Fuentes, L.; Gallardo-Perez, J. C.; Saavedra, E.; Quezada, H.; Vega, A.; Marin-Hernandez, A.; et al.: Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma; *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1744-1751 (2010)
88. Rossignol, R.; Gilkerson, R.; Aggeler, R.; Yamagata, K.; Remington, S. J.; Capaldi, R. A. : Energy substrates modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells; *Cancer Res.* 64, 985-994 (2004)
89. Smolkova, K.; Bellance, N.; Scandurra, F.; Genot, Gnaiger, E. ; Plecita-Hlavata, L.; Jezek, P; Rossignol, R.: Mitochondrial bioenergetic adaptations of breast cancer cells to aglycemia and hypoxia, *J. Bioenerg. Biomembr.* 42, 55-67 (2010)
90. Plecita-Hlavata, L.; Lessard, M.; Santorova, J. ; Bewersdorf, J. ; Jezek, P.: Mitochondrial oxidative phosphorylation and energetic status are reflected by morphology of mitochondrial network in INS-1E and HEP-G2 cells viewed by 4Pi microscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 834-846 (2008)
91. Ibsen, K. H.: The Crabtree effect: a review; *Cancer Res.* 21, 829-841 (1961)

92. Guppy, M; Greiner, E; Brand K: The role of the Crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes; *Eur. J. Biochem.* 212, 95-99 (1993)
93. Rodriguez-Enriquez, S.; Juarez, O.; Rodriguez-Zavala, J. S.; Moreno-Sanchez, R.: Multisite control of the Crabtree effect in ascites hepatoma cells; *Eur. J. Biochem.* 268, 2512-2519 (2001)
94. Melo, R. F.; Stevan, F. R.; Campello, A. P.; Carnieri, E. G.; Martinelli de Oliveira, M. B.: Occurrence of the Crabtree effect in HeLa cells; *Cell Biochem. Funct.* 16, 99-105 (1998)
95. Diaz-Ruiz, R.; Averet, N.; Araiza, D.; Pinson, B.; Uribe-Carvajal, S.; Devin, A.; Rigoulet, M.: Mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by fructose 1,6-bisphosphate. A possible role in Crabtree effect induction?; *J. Biol. Chem.* 283, 26948-26955 (2008)
96. Eagle, H.: The specific amino acid requirements of a human carcinoma cell (Stain HeLa) in tissue culture; *J. Exp. Med.* 102, 37-48 (1955)
97. Zielke, H. R.; Ozand, P. T.; Tildon, J. T.; Sevdalian, D. A.; Cornblath, M.: Growth of human diploid fibroblasts in the absence of glucose utilization; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 4110-4114 (1976)
98. Daye, D.; Wellen, K. E.: Metabolic reprogramming in cancer: Unraveling the role of glutamine in tumorigenesis; *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 362-369 (2012)
99. Mueckler, M.; Caruso, C.; Baldwin, S. A.; Panico, M.; Blench, I.; Morris, H. R.; Allard, W. J.; Lienhard, G. E.; Lodish, H. F.: Sequence and structure of a human glucose transporter; *Science* 229, 941-945 (1985)
100. Zhao, F. Q.; Glimm, D. R.; Kennelly, J. J.: Distribution of mammalian facilitative glucose transporter messenger RNA in bovine tissues; *Int. J. Biochem.* 25, 1897-1903 (1993)
101. Smith, T. A.: Facilitative glucose transporter expression in human cancer tissue; *Br. J. Biomed. Sci.* 56, 285-292 (1999)
102. Thorens, B., Cheng, Z. Q.; Brown, D.; Lodish, H. F.: Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells; *Am. J. Physiol.* 259, C279-C285 (1990)
103. Zhao, F.Q.; Keating, A. F.: Functional properties and genomics of glucose transporters; *Curr. Genomics* 8, 113-128 (2007)
104. Weinstein, S. P.; O'Boyle, E.; Fisher, M.; Haber, R. S.: Regulation of GLUT2 glucose transporter expression in liver by thyroid hormone: evidence for hormonal regulation of the hepatic glucose transport system; *Endocrinology* 135, 649-654 (1994)
105. Gould, G. W.; Holman, G. D.: The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression; *Biochem. J.* 295, 329-341 (1993)
106. Colville, C. A.; Seatter, M. J.; Jess, T. J.; Gould, G. W.; Thomas, H. M.: Kinetic analysis of the liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters in *Xenopus* oocytes: substrate specificities and effects of transport inhibitors; *Biochem. J.* 290, 701-706 (1993)
107. Bustamante, E.; Pedersen, P. L.: High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3735-3739 (1977)
108. Srere, P. A.: The Citrate Cleavage Enzyme; *J. Biol. Chem.* 234, 2544-2547 (1959)
109. Diers, A. R.; Broniowska, K. A.; Chang, Ch. F.; Hogg, N.: Pyruvate fuels mitochondrial respiration and proliferation of breast cancer cell: effect of monocarboxylate transporter inhibition; *Biochem. J.* 444, 561-571 (2012)

110. DeBerardinis, R. J.; Mancuso, A.; Daikhin, E.; Nissim, I.; Yudkoff, M.; Wehrli, S.; et al.: Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 19345–19350. (2007)
111. John, A. P.: Dysfunctional mitochondria, not oxygen insufficiency, cause cancer cells to produce inordinate amounts of lactic acid: the impact of this on the treatment of cancer; *Med. Hypotheses* 57, 429-431 (2001)
112. Smolkova, K.; Plecita-Hlavata, L.; Bellance, N.; Benard, G.; Rossignol, R.; Jezek, P.: Waves of gene regulation suppress and then restore oxidative phosphorylation in cancer cells; *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 950-968 (2011)
113. Holleran, A. L.; Briscoe, D. A.; Fiskum, G.; Kelleher, J. K.: Glutamine metabolism in AS-30D hepatoma cells, evidence for its conversion into lipids via reductive carboxylation; *Mol. Cell Biochem.* 152, 95-101 (1995)
114. Pesta, D.; Gnaiger, E.: High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle; *Method Mol. Biol.* 810, 25-58 (2012)
115. Dehne, N.; Hintereder, G.; Brune, B.: High glucose concentration attenuate hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression and signaling in non-tumor cells; *Exp. Cell Res.* 316, 1179-1189 (2010)
116. Aguer, C.; Gambarotta, D.; Mailloux, R. J.; Moffat, C.; Dent, R.; McPherson, R.; Harper, M. E.: Galactose enhances oxidative metabolism and reveals mitochondrial dysfunction in human primary muscle cells; *PLoS one*, 6, e28536 (2011)
117. Jezek, P.; Plecita-Hlavata, L.; Smolkova, K.; Rossignol, R.: Distinctions and similarities of cell bioenergetics and the role of mitochondria in hypoxia, cancer, and embryonic development; *Int. J. Biochem. cell Biol.* 42, 604-622 (2010)

<http://ajrccm.atsjournals.org/content/183/2/152/F1.expansion>

<http://courses.bio.indiana.edu/L104-Bonner/F11/imagesF11/L17/MPs.html>

<http://www.oroboros.at>

