



УДК 577.112.7:616

## МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ ЗА ГІПОКСІЇ

**Д. О. Мінченко<sup>1,2</sup>, О. В. Губеня<sup>1,3</sup>, К. І. Кубайчук<sup>1</sup>,  
Т. В. Бакалець<sup>1</sup>, Я. А. Гармаш<sup>1</sup>, І. В. Кривдюк<sup>1</sup>, Р. Ю. Маруніч<sup>1</sup>,  
Б. М. Терлецький<sup>1</sup>, Р. В. Сулік<sup>3</sup>, Н. К. Мурашко<sup>3</sup>, О. Г. Мінченко<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, вул. Леонтовича, 9, Київ 01601, Україна

<sup>2</sup>Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця,  
бульв. Шевченка, 13, Київ 01601, Україна

<sup>3</sup>Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика  
вул. Дорогожицька, 9, Київ 04112, Україна  
e-mail: [ominchenko@yahoo.com](mailto:ominchenko@yahoo.com)

Гіпоксія є одним із потужних індукторів експресії великої групи генів, у тому числі генів, які контролюють гліколіз, ангиогенез і процеси проліферації, що сприяє виживанню клітин за умов зниженого рівня кисню. Але гіпоксія, що має місце у клітинах злоякісних пухлин, відбувається за умов нормального парціального тиску кисню внаслідок зниженого його споживання. Більше того, гіпоксія є обов'язковим компонентом процесів злоякісного росту і значною мірою контролює процеси гліколізу, ангиогенезу та проліферації. Аналізуються дані про молекулярні механізми індукції залежного від гіпоксії транскрипційного фактора HIF у клітинах за гіпоксії і у злоякісних пухлинах, а також його роль у регуляції експресії генів, механізми взаємодії цього транскрипційного фактора зі специфічними регуляторними послідовностями промоторів генів, що активуються за гіпоксії.

**Ключові слова:** гіпоксія, молекулярні механізми регуляції, HIF, експресія генів, злоякісні пухлини.

### ВСТУП

Відомо, що гіпоксія істотно змінює характер метаболічних процесів у організмі, значно посилює інтенсивність гліколізу, що сприяє забезпеченню клітин організму енергією в умовах зниженого рівня кисню або недостатнього його використання, а також є надзвичайно важливим фактором росту і прогресії злоякісних пухлин. У даній роботі проаналізовані й узагальнені наявні в літературі дані про молекулярні механізми регуляції експресії генів у клітинах за гіпоксії та у злоякісних пухлинах, про механізми індукції процесів проліферації, ангиогенезу та гліколізу, а також про роль ключових ензимів і факторів, зокрема роль HIF, транскрипційного фактора, що індукується гіпоксією, у регуляції цих процесів і в механізмах адаптації клітин до умов гіпоксії, як у нормі, так і за різноманітних патологічних станів.

Реакція клітин на недостатню кількість кисню має важливе значення для розуміння патологічних процесів, що відбуваються в організмі. Відомо, що за онкологічних захворювань істотно порушується тонкий баланс між потребою у кисні та його доставкою до клітин і що у трансформованих клітинах відбуваються певні зміни в метаболізмі, хоча повне розуміння цих змін, як і механізмів їх виникнення, залишається ще недостатньо з'ясованим [1–3]. Важливою особливістю злоякісних пухлин є гіпоксія внаслідок зниженого споживання кисню та низки інших причин, асоційована з посиленням транспортом до клітин глюкози і її розщепленням до молочної кислоти й ацидозом мікрооточення, що сприяє росту пухлин і збільшує їх резистентність до лікування [4–7]. Так, за допомогою полярографічного кисневого електрода було встановлено, що тиск кисню у деяких типах злоякісних пухлин коливається у межах 0–20 мм Hg (0–2,8%), що значно нижче, ніж у нормальних тканинах, які розташовані поруч: 24–60 мм Hg (3,36–8,4%) [2, 8]. У середньому, рівень кисню в нормальних тканинах коливається в межах близько 7%, а у злоякісних пухлинах – не більше 1,5%.

Тож яким чином генерується гіпоксичний стан у злоякісних пухлинах і як клітини пухлин реагують на гіпоксію, є надзвичайно важливим питанням для розуміння механізмів як росту пухлин, так і їх метастазування. Коли первинна пухлинна клітина починає інтенсивно ділитися, то значна маса клітин, які містяться в центрі такої мікропухлини, віддалена від капілярів, а відповідно і від кисню, і від багатьох речовин, потрібних для життєдіяльності клітин [3]. Таким чином створюються гіпоксичні умови, і клітини відповідають на гіпоксію активацією ключового транскрипційного фактора, який індукується гіпоксією (HIF) і який контролює експресію великої групи генів, що є необхідною передумовою забезпечення виживання трансформованих клітин і їхньої резистентності до лікування. І хоча вже відомо багато чинників, необхідних для забезпечення ефективного росту злоякісних пухлин, точна роль гіпоксії у рості пухлин залишається ще далеко не з'ясованою [3, 7].

Гіпоксія є своєрідним ключем до розшифрування тонких молекулярних механізмів регуляції процесів обміну речовин і дає можливість глибше проникнути у розуміння молекулярних механізмів перебігу як фізіологічних, так і низки патологічних процесів в організмі, їх регуляції. За гіпоксії ініціюються процеси еритропоезу, утворення нової сітки капілярів (ангіогенезу), спостерігається активація процесів транспорту глюкози крізь мембрану клітин та її метаболізму шляхом гліколізу, спрямованих на адаптацію клітин до умов дефіциту кисню й енергії, а також на активацію процесів проліферації і апоптозу клітин, що значною мірою опосередковано індукцією чутливого до кисню транскрипційного фактора HIF [6, 9, 10].

Більше того, експресія HIF не лише посилюється за умов гіпоксії, а й є також підвищеною в різних злоякісних пухлинах людей і корелює з несприятливим прогнозом, а пригнічення експресії альфа-субодиниці цього транскрипційного фактора часто призводить до зниження інтенсивності росту різних злоякісних пухлин [6, 11–15].

**HIF, транскрипційний фактор, що активується за гіпоксії.** HIF вважається основним транскрипційним фактором регуляції експресії генів, що відповідають за реакцію організму чи окремих клітин на нестачу кисню [10, 16–18]. Активація HIF-сигнального шляху забезпечує адекватні відповіді на гіпоксію, посилює експресію генів шляхом взаємодії комплексу HIF зі специфічними регуляторними нуклеотидними послідовностями, так званими HIF-залежними регуляторними елементами (HRE), що містяться у регуляторних ділянках генів [19–23].

Транскрипційний комплекс HIF складається з однієї альфа-субодиниці (HIF- $\alpha$ ) та однієї бета-субодиниці (HIF- $\beta$ , яка має ще й іншу назву – ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). На даний момент відомим є лише один варіант субодиниці HIF- $\beta$ , а HIF- $\alpha$  субодиниця існує у кількох варіантах із різними біологічними властивостями (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ ), що кодуються трьома різними генами, причому транскрипти першого і третього генів можуть утворювати по шість альтернативних сплайс-варіантів із різною структурою і функціональними властивостями [24–29].

Відомо, що альфа-субодиниці HIF мають структурно подібні ДНК-зв'язуючі сайти, але відрізняються за трансактиваційними доменами, а це означає, що вони можуть мати унікальні гени-мішені. Перша і друга альфа-субодиниці HIF мають подібну структуру, але HIF-2 $\alpha$  є коротшим варіантом. У своїй структурі вони мають основну ділянку типу спіраль-петля-спіраль (bHLH, basic helix-loop-helix), два Per/Arnt/Sim (PAS) домени; залежний від кисню домен деградації (ODD), який включає в себе N-кінцевий домен трансактивації (NAD або TAD-N) та C-кінцевий домен трансактивації (CAD або TAD-C), причому наявність домену  $\beta$ HLH визначає приналежність до великої родини димерних еукаріотичних факторів транскрипції, у яких домен HLH відповідає не лише за димеризації та зв'язування зі специфічними послідовностями ДНК, а й за взаємодію з РНК-полімеразою [30, 31]. Третя альфа-субодиниця HIF має подібну структуру, але в ній відсутній CAD домен [32, 33].

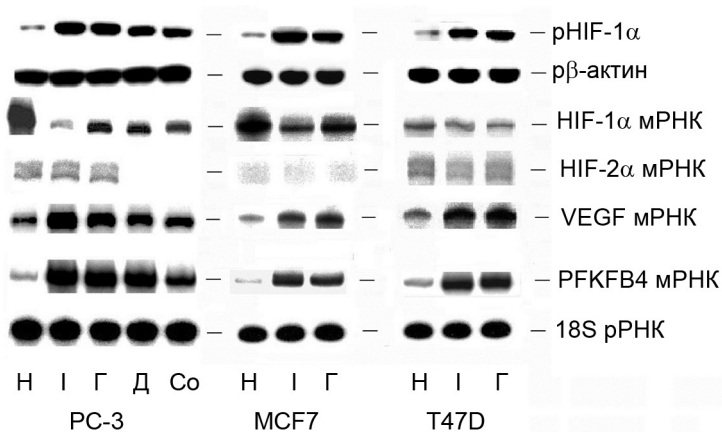
Виявлено п'ять основних ізоформ HIF-1 $\alpha$ : 1) HIF-1 $\alpha^{\text{FL}}$  ізоформа, яка дуже схожа з HIF-1 $\alpha$  основного варіанта за винятком трьох додаткових нуклеотидних залишків між 1-м і 2-м екзонами; 2) HIF-1 $\alpha^{736}$  ізоформа, яка не має домену трансактивації, тому що втратила 14-й екзон, причому ці перші два варіанти, можливо, є відповідальними за активацію експресії ендотеліального фактора росту судин VEGF за умов гіпоксії; 3) HIF-1 $\alpha^{557}$  ізоформа, в якій відсутній 12-й екзон та 4) HIF-1 $\alpha^{516}$  ізоформа, яка не має 11-го та 12-го екзонів, а тому третя і четверта ізоформи HIF-1 $\alpha$  функціонують як доміант-негативні; 5) HIF-1 $\alpha^{785}$  ізоформа, яка не має екзону 11 в ODD домені, але містить усі функціональні домени і тому функціонує як транскрипційний активатор [27–29]. Було виявлено, що у сім'яниках людини специфічно експресується саме доміант-негативний варіант HIF-1 $\alpha$  [34].

Одною із найбільш вивчених сплайс-ізоформ HIF-3 $\alpha$  є IPAS (inhibitory PAS domain protein), доміант-негативний варіант альфа-субодиниці HIF [32, 33]. IPAS має два домени: bHLH та PAS, але не має трансактиваційного домену. Він може димеризуватися з HIF-1 $\beta$ , що зменшує можливість взаємодії HIF-1 $\alpha$  з HIF-1 $\beta$ , оскільки такий комплекс не здатен зв'язуватися з HRE. Підвищення рівня мРНК HIF-3 $\alpha$  за гіпоксії виявляється уже через дві години. На відміну від HIF3 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$  і HIF2 $\alpha$  активують транскрипцію та індуюють залежну від гіпоксії експресію генів [35–38]. Високі рівні HIF-3 $\alpha$  спостерігаються у тимусі [24]. Виявлено високий рівень експресії доміант-негативної ізоформи HIF-1 $\alpha$  у сім'яниках [36].

Оскільки субодиниця HIF-1 $\alpha$  є чутливою до кисню, то вона є мішенню для залежних від кисню сигнальних шляхів. За нормального рівня кисню в клітинах організму активність транскрипційного комплексу HIF є надзвичайно малою через низький рівень протеїну HIF-1 $\alpha$ , який постійно розщеплюється, а в умовах гіпоксії його кількість різко зростає, причому переважно за рахунок блокади його деградації [25, 26, 39–45].

Нищими дослідженнями було встановлено, що рівень протеїну HIF-1 $\alpha$  підвищується за гіпоксії у різних типах клітин, як нормальних, так і пухлинних клітин,

причому ця індукція HIF-1 $\alpha$  не залежала істотно від функції мітохондрій, оскільки спостерігалася в клітинах без мітохондріальної ДНК (r0-клітини) [42–45]. У той же час рівень мРНК HIF-1 $\alpha$  за гіпоксії не збільшується, а здебільшого істотно знижується, хоча по-різному у різних типах клітин, а рівень мРНК HIF-2 $\alpha$  при цьому переважно не змінюється (рис. 1) [23, 45]. У той же час рівень мРНК HIF-1b за гіпоксії істотно не змінюється [23]. Більше того, було встановлено, що зміни в експресії генів HIF-1a, HIF-2a, ендотеліального фактора росту судин (VEGF) і 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-4 (PFKFB4) у клітинах аденокарцином простати лінії PC-3 та грудної залози ліній MCF7 і T47D за гіпоксії є подібними до змін за дії диметилноксалілгліцину, специфічного інгібітора пролілгідроксилаз HIF-a та сполук, що зв'язують іони заліза (дезферіоксаміну) або конкурують з ними (хлориду кобальту). Отримані нами результати переконливо свідчать про те, що ефекти гіпоксії можливо моделювати, збільшуючи рівень HIF-1 $\alpha$  протеїну різними сполуками, але всі вони впливають на один ензим, пролілгідроксилазу альфа-субодиниць HIF, блокуючи її активність, як і гіпоксія.

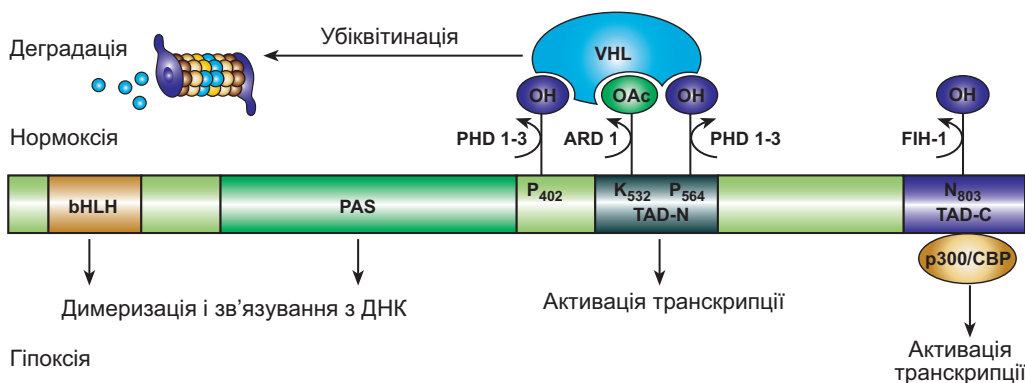


**Рис. 1.** Вплив гіпоксії (Г), диметилноксалілгліцину, специфічного інгібітора пролілгідроксилаз HIF-a, (I) та сполук, що зв'язують іони заліза [дезферіоксамін (Д)] або конкурують із ними [хлорид кобальту (Co)] на експресію мРНК HIF-1a, HIF-2a, 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-4 (PFKFB4) та ендотеліального фактора росту судин (VEGF), а також HIF-1a протеїну в клітинах аденокарцином простати лінії PC-3 та грудної залози ліній MCF7 і T47D [46]

**Fig. 1.** Effect of hypoxia (Г), dimethylglycine, specific inhibitor of HIF-a prolyl hydroxylase, (I) and compounds which bind the iron [desferrioxamine (Д)] or compete with it [cobalt chloride (Co)] on the expression of HmRNA of IF-1a, HIF-2a, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB4) and vascular endothelial growth factor (VEGF) as well as HIF-1a protein level in prostate adenocarcinoma cell line PC-3 and breast cancer cell lines MCF7 and T47D [46]

**Молекулярні механізми регуляції рівня альфа-субодиниці транскрипційного фактора HIF.** Кисень, при нормальному його рівні, спрямовує альфа-субодиницю HIF на убіквітинацію і деградацію. Механізми цього процесу зображені на рис. 2. Залежне від кисню гідроксилювання пролінових залишків (P) 402 та 564 в HIF-1a ензимами PHD (пролілгідроксилаза домен-протеїн) потребує для зв'язування тумор-супресорний білок von Hippel-Lindau (VHL), який є розпізнавальним компонентом E3 убіквітин-білок лігази [39–41, 47]. Зв'язування VHL активується також ацетилюванням залишку лізину (K) 532 ARD1 ацетилтрансферазою [48, 49].

Комплекс HIF-1а з VHL підлягає убиквітинації, що і приводить до його деградації 26S протеосою [41]. Але кисень контролює не лише убиквітинацію альфа-субодиниць HIF, а й також їх взаємодію з коактиваторами транскрипції. Так, залежно від кисню окислення залишку аспарагіну (N)-803 в HIF-1а, що опосередковується ензимом FIH1 (фактор, який інгібує HIF-1), блокує зв'язування протеїнів p300/ CBP з HIF-1а і таким чином інгібує транскрипцію генів, опосередковану HIF-1а [47, 49]. В умовах гіпоксії швидкість окислення проліну й аспарагіну знижується. Протеїн VHL не може зв'язуватися з HIF-1а, в якому пролін не гідроксильований, що знижує деградацію HIF-1а. Разом з тим, p300/ CBP може зв'язуватися з HIF-1а, оскільки аспарагін не є гідроксильованим, у результаті чого відбувається активація транскрипції залежних від HIF-1а генів.



**Рис. 2.** Залежні від кисню механізми регуляції активності протеїну HIF-1а шляхом його убиквітинації та протеасомної деградації за нормоксії або в умовах гіпоксії. За гіпоксії спостерігається інактивація PHD (пролілгідроксилаза домен-білок) ензимів (PHD 1-3), які відповідальні за убиквітинацію HIF-1а: bHLH – основний мотив типу „спіраль-петля-спіраль”; PAS – Per-ARNT-Sim; TAD-N – N-кінцевий трансактиваційний домен; TAD-C – трансактиваційний домен C-кінця; p300/CBP – коактиватори транскрипції p300/CREB-binding protein (CBP)

**Fig. 2.** Oxygen-dependent mechanisms of the regulation of HIF-1α protein activity through its ubiquitination and proteasome degradation at normoxia or hypoxic condition. The inactivation of PHD (prolyl hydroxylase domain-protein) enzymes (PHD 1-3), which are responsible for HIF-1α ubiquitination, was observed: bHLH – basic „helix-loop-helix” motif; PAS – Per-ARNT-Sim; TAD-N – N-terminal transactivation domain; TAD-C – C-terminal transactivation domain; p300/CBP – transcriptional co-activator protein p300/CREB-binding protein (CBP)

Присутність кисню запускає гідроксильовання пролінових залишків 402 та 564 HIF у залежному від кисню домені деградації (ODD). Це гідроксильовання каталізується родиною внутрішньоклітинних пролілгідроксилаз (PHD1, PHD2 та PHD3), що слугує сигналом для впізнавання  $\alpha$ -субодиниці HIF білком фон Хіпель-Ліндау (pVHL), який є компонентом E3 убиквітин протеїнлігази [50–54].

Для активації субодиниці HIF-1 $\alpha$  надзвичайно важливим моментом є її взаємодія з коактиватором транскрипції p300/CBP, яка контролюється специфічною аспарагіл-гідроксилазою, що названа FIH-1 (factor-inhibiting HIF-1). FIH-1 блокує зв'язування p300/CBP з HIF-1 у результаті залежного від кисню окислення залишку аспарагіну (Asp-803) в HIF-1 і таким чином пригнічується транскрипція генів, опосередкована фактором регуляції транскрипції HIF [55–57].

Детальний аналіз структури пролілгідроксилаз альфа-субодиниць HIF і фактора FIH-1 показав, що вони є членами однієї родини Fe(II)- та 2-оксоглутарат-залежних

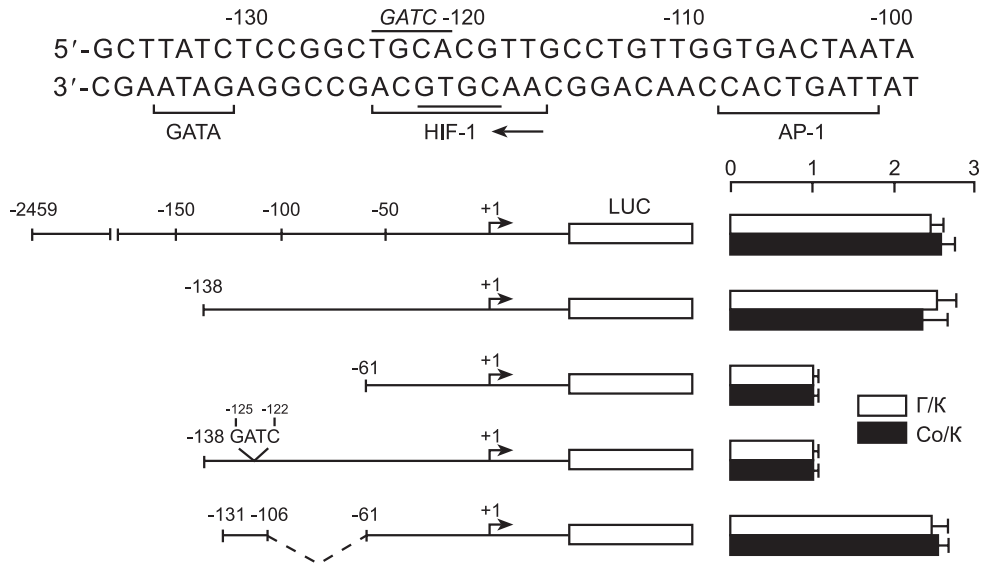
діоксигеназних ензимів [58–61]. У зв'язку з цим ці ензими не проявляють активності при відсутності іонів заліза або у присутності хелаторів цих іонів [62, 63]. Відомо, що залізо – дуже важливий елемент для всіх живих організмів, оскільки воно є необхідним кофактором для протеїнів, що зв'язуються з киснем [62]. Більше того, метаболізм заліза дуже тісно пов'язаний з кисневим гомеостазом та еритропоезом.

Багато залежних від гіпоксії генів, у тому числі ті, що кодують VEGF, ендотелін-1 (ET1), альдолазу А, фосфогліцерат кіназу 1, фосфофруктокіназу 1, енолазу 1, містять у регуляторній зоні залежний від гіпоксії елемент (hypoxia responsible element, HRE) [23, 64–66]. Встановлено, що HRE специфічно зв'язує транскрипційний фактор HIF обома ланцюгами ДНК у головній боріздці, причому найбільш важливим є абсолютно консервативний тетра nukлеотид, який розташований по центру послідовності: 5'-(C/G)(A/T)**CGTG**(G/C)(G/C/T)-3'.

У наших працях було показано, що гіпоксія посилює експресію генів VEGF, переносника глюкози-1 (GLUT1), ендотеліну-1 (ET1), PFKFB3 та PFKFB4 як у культурі нормальних та пухлинних клітин, так і *in vivo* в досліджах на щурах та мишах, причому детальний аналіз молекулярних механізмів індукції експресії гена VEGF у клітинах ендометрію відбувається не лише через залежний від HIF механізм, а і під впливом естрогенів через специфічну послідовність у промоторі цього гена, що зв'язує рецептор естрогенів [23, 42–45, 67–70]. Більше того, при дослідженні механізмів індукції експресії гена ендотеліну-1 за гіпоксії було ідентифіковано залежний від гіпоксії елемент у регуляторній ділянці промотору, який зв'язував обидві субодиниці HIF (альфа і бета), що було підтверджено методом гель-шифту і супер-шифту зі специфічними до цих субодиниць антитілами [23, 70]. Результати цих досліджень представлені на рис. 3, з якого видно, що HRE гена ET1 перебуває на відстані від -118 до -125 від місця ініціації транскрипції та що заміна 4 нуклеотидних залишків у послідовності цього елемента, як і делеція ділянки HRE, повністю знімали активацію транскрипції ET1 за умов гіпоксії. У той же час заміна 4 нуклеотидних залишків у послідовності рядом з HRE не вплинула на індукцію транскрипції з промотору гена ET1 як за умов гіпоксії, так і за дії хлориду кобальту. Окрім того, було показано, що для прояву ефектів HIF важливим є не лише збільшення рівня його альфа-субодиниці, а і її фосфорилування, оскільки у присутності інгібітора тирозинових протеїніназ дженістейну пригнічувався ефект гіпоксії на експресію гена ендотеліну-1 [23].

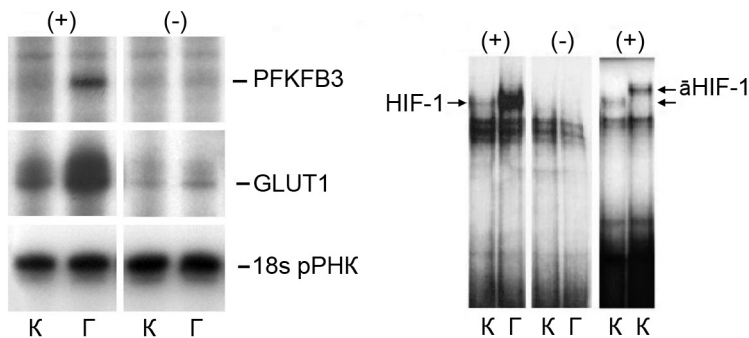
Нами вперше була виявлена гіпоксична активація генів родини PFKFB, що є ключовими регуляторами гліколізу і відповідальними за ефект Варбурга у клітинах злоякісних пухлин [43, 44, 67]. Також було встановлено, що індукція експресії генів PFKFB3 та PFKFB4 опосередкована транскрипційним фактором HIF, оскільки вона не виявлялася у клітинах, нокаутних за геном альфа-субодиниці HIF, а диметилноксалілгліцин, що є інгібітором пролілгідроксилаз HIF-1а, збільшував експресію цих генів, як і гіпоксія (рис. 3). Гель-шифт аналіз ядерних екстрактів із цих клітин показав відсутність HIF-1а у клітинах нокаутних за цим геном. Супершифт аналіз з антитілами до HIF-1а показав зв'язування HIF-1а з HIF залежним елементом гена [43].

Залежність експресії гена PFKFB3 від HIF підтверджена також експериментами на клітинах із мутантним геном VHL. За відсутності протеїну VHL у клітинах аденокарциноми нирки спостерігалася посилена експресія генів HIF-2а, VEGF, PFKFB3 та GLUT1, а стабільна трансфекція клітин функціонально активним геном VHL призводила до значного зниження експресії цих генів (рис. 4) [43]. Детальний аналіз промоторної ділянки гена PFKFB4 показав наявність залежного від гіпоксії елемента CG**CGTG**CC, що опосередковує ефект гіпоксії на експресію цього гена [44].



**Рис. 3.** Ідентифікація залежного від гіпоксії елемента в регуляторній зоні гена ендотеліну-1. Представлена послідовність регуляторної ділянки гена ET1 від -138 до -100 від місця початку транскрипції, а також положення ідентифікованого HRE (від -118 до -125) з підкресленим консервативним сайтом. Нуклеотидні залишки (GATC), які були введені в мутантний варіант, зображені над HRE. Представлені результати відносної транскрипційної активності промотору гена ендотеліну-1 в репортерних конструкціях із різною довжиною регуляторної ділянки гена ET1, а також із мутацією в HRE за гіпоксії та дії хлориду кобальту (Co); К – контроль [23]

**Fig. 3.** Identification of the hypoxia-responsive element in regulatory region of endothelin-1 gene. The sequence of ET1 gene regulatory region from -138 to -100 from transcription start site and the location of identified HRE (from -118 to -125) with underlined conservative site were shown. Nucleotide residues (GATC) which were introduced into mutated variant for suppression of hypoxic regulation were exposed over HRE. The results of relative transcriptional activity of endothelin-1 gene promoter in reporter constructs with different length of ET1 gene regulatory region as well as with introduced into HRE mutation under hypoxia (Г) and cobalt chloride action (Co) were presented; K – control [23]



**Рис. 4.** Вплив гіпоксії (Г) на експресію мРНК PFKFB3 та переносника глюкози GLUT1 в ембріональних фібробластах миші (+) та нокаутних за HIF-1а клітинах (-) (зліва); К - контроль. Гель-шифт аналіз HIF-1а в ядерних екстрактах нормальних і нокаутних за HIF-1а фібробластах миші за гіпоксії (справа) [43]

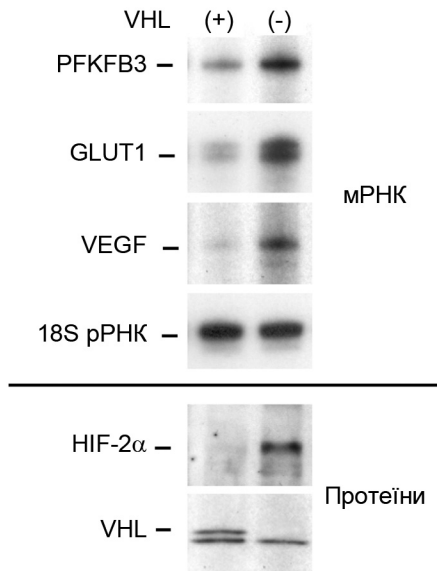
**Fig. 4.** Effect of hypoxia on the expression of mRNA of PFKFB3 and glucose transporter-1 (GLUT1) in mouse embryonic fibroblasts (+) and HIF-1a knockout cells (-) (left); K – control. Gel-shift analysis of HIF-1a in nuclear extracts from normal and knockout mouse fibroblasts: effect of hypoxia (right) [43]

Розташований він на відстані близько 300 пар нуклеотидних залишків від старту транскрипції і виявився подібним до більшості HRE в інших, залежних від HIF, генах. Заміна 4 нуклеотидних залишків у виявленій нами послідовності (CTAG замість CGTG) повністю знімала ефект гіпоксії та диметилноксалілгліцину на транскрипцію гена PFKFB4 [44].

Таким чином, транскрипційний комплекс HIF є ключовим у реалізації адаптаційних процесів до гіпоксії на молекулярному рівні широкого кола фізіологічних і патофізіологічних процесів від ембріонального розвитку до злоякісних пухлин.

**Роль HIF у рості злоякісних пухлин.** Підвищена експресія транскрипційного фактора HIF спостерігається не лише за умов гіпоксії, а й також при онкологічних захворюваннях людей і чітко корелює з несприятливим прогнозом, причому саме HIF опосередковує розвиток ефектів гіпоксії у злоякісних пухлинах, яка є важливим фактором їх росту, васкуляризації та метастазування [13, 14, 71–76]. Більше того, підвищена експресія транскрипційного фактора HIF зареєстрована при всіх онкологічних захворюваннях людини.

У наших працях було показано, що у різних злоякісних пухлинах збільшується рівень альфа-субодиниці HIF як на рівні протеїну, так і на рівні мРНК (рис. 5) [71]. Ці дані свідчать про виражену активацію процесів синтезу HIF-1 $\alpha$  під впливом різних факторів, що активуються за пухлинного росту, незважаючи на індуковану гіпоксією та, можливо, й іншими факторами стабілізацію альфа-субодиниць HIF. Підвищений рівень HIF-1 $\alpha$  у злоякісних пухлинах грудної залози та прямої кишки супроводжується індукцією експресії генів GLUT1, PFKFB3 та VEGF [71].



**Рис. 5.** Експресія мРНК PFKFB3, GLUT1 та VEGF, а також рівень протеїну HIF-2 $\alpha$  та VHL у дефіцитних за VHL клітинах карциноми нирки 786-0 (-) та їх сублінії, стабільно трансфектованій функціонально активним VHL (+) [43]. Кількість мРНК, яку вимірювали, стандартизували по 18 S рРНК

**Fig. 5.** The expression of mRNA of PFKFB3, GLUT1 and VEGF as well as HIF-2 $\alpha$  and VHL protein levels in VHL-deficient kidney carcinoma cells 786-0 (-) and its subline stable transfected by functionally active VHL (+) [43]. The measured mRNA quantity was standardized using 18 S rRNA

Було встановлено, що гіпоксія призводить до значних перебудов хроматину і загальної репресії транскрипції, за винятком залежних від гіпоксії генів [78]. Більше того, HIF-1 $\alpha$  відіграє надзвичайно важливу роль у регуляції апоптозу та проліферації клітин, а також процесів ангиогенезу у злоякісних пухлинах, причому



ангіогенний потенціал клітин аденокарциноми простати за умов надекспресії  $\delta$ -катеніну реалізується саме через HIF-1 $\alpha$  та VEGF, що індукується транскрипційним фактором HIF [12, 74, 79].

У зв'язку з надзвичайно важливим значенням альфа-субодиниць HIF у рості злоякісних пухлин виникла ідея пригнічення експресії альфа-субодиниці цього транскрипційного фактора у пухлинних клітинах для блокади проліферативних процесів [15, 80]. Результати експериментальних досліджень показали, що досить часто пригнічення експресії альфа-субодиниць транскрипційного фактора HIF призводить до зниження інтенсивності росту різних злоякісних пухлин шляхом індукції змін в експресії VEGF і p53 та їх сигнальних шляхів, а також змінюючи характер метаболізму глюкози. Так, було встановлено, що домінант-негативна конструкція альфа-субодиниця транскрипційного фактора HIF-1 знижує здатність клітин аденокарциноми підшлункової залози утворювати пухлини шляхом пригнічення метаболізму глюкози, зокрема гліколізу [81]. А в досліджах із пригніченням HIF-2 $\alpha$  у клітинах злоякісних пухлин було показано, що виключення цієї субодиниці транскрипційного фактора HIF у клітинах злоякісних пухлин призводить до активації опосередкованого p53 сигнального шляху смерті пухлинних клітин і збільшує їх чутливість до радіації, а це свідчить про важливу роль HIF-2 $\alpha$  у виживанні пухлинних клітин [15].

Оскільки транскрипційний комплекс HIF контролює широке коло метаболічних процесів у злоякісних пухлинах, то інтенсивно розвивалися дослідження пригнічення експресії окремих HIF-залежних генів з метою зупинки пухлинного росту, причому блокування сигнального шляху VEGF, а також гліколізу, виявилось більш перспективним у плані розробки методів антипухлинної терапії [82, 83].

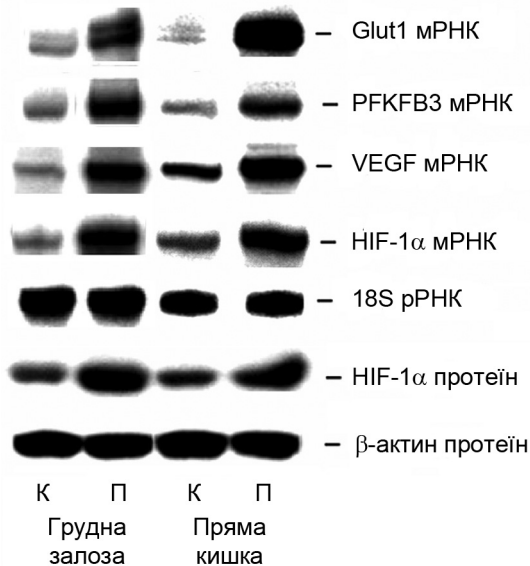
Недавно виявлена додаткова, нетранскрипційна роль HIF-сигнального шляху у появі та прогресії злоякісних пухлин шляхом взаємодії зі специфічним NOTCH-сигнальним шляхом та індукцією експресії транскрипційного фактора OCT4, що контролює утворення трансформованих поліпотентних стовбурових клітин, із яких можуть утворюватися різні форми злоякісних пухлин [84, 85]. Крім того, у Т-лімфомах із мутантним пухлино-супресорним протеїном p53 у результаті підвищення активності HIF змінюється стабільність активного NOTCH1 та експресія підпорядкованих NOTCH генів: *DTX1* та *NRARP* [86]. Виявлено також взаємодію HIF-сигнального шляху із c-MYC шляхом, причому виявлено різницю у функціях 1-ї та 2-ї альфа-субодиниць HIF [87]. До транскрипційних ефектів HIF-2 $\alpha$  належить індукція еритропоезу, ангіогенезу, проліферації та метастазування [85]. Взаємопов'язаність різних сигнальних шляхів між собою показана і в досліджах із вивчення залежності активності N-термінальної кінази c-Jun (JNK) і пов'язаних із нею JNKs та протеїнкіназ, що активуються за стресу (SAPKs), за умов гіпоксії з опосередкованою HIF утилізацією глюкози [88]. Крім того, активності як JNKs/SAPKs, так і позаклітинних кіназ, що регулюються сигналами (ERK1 і ERK 2, які ще називаються MAPK3 і MAPK1), є чутливими до HIF-1-залежних процесів у клітинах за умов гіпоксії, причому фосфорилування треоніну і тирозину в цих кіназах, як і їх активність, виявилися дефектними у нокаутних за HIF-1 альфа ембріональних фібробластах миші [88].

Встановлено, що активність транскрипційного фактора HIF-1 може збільшуватися за рахунок як стабілізації, так і посиленого синтезу альфа-субодиниці HIF-1, за умов надекспресії ацетилхолінового рецептора мускаринового типу, причому ці ефекти не проявляються у присутності інгібіторів сигнальних шляхів фосфатидилінозитол-3-кінази або тирозинкінази. Недавно було встановлено, що посттрансляційна модифікація анкіринових повторів у протеїнах фактором

IkB, який пригнічує HIF-аспарагінілгідролазу (FHN), може впливати на велику сітку процесів, що контролюються транскрипційними факторами NF-kB [89]. Це пов'язано з тим, що анкіринові повтори, які являють собою мотиви з 33 амінокислотних залишків, у тому числі залишків аспарагіну, містяться у великій кількості протеїнів і опосередковують білок-білкові взаємодії.

Окрім того, була виявлена індукуюча дія певних субодиниць NF-kB на експресію транскрипційного фактора HIF-1, а також модулююча дія оксиду азоту на деградацію альфа-субодиниці HIF-1 в умовах нормоксії шляхом пригнічення пролілгідроксилаз альфа-субодиниць HIF [90].

Недавно встановлено, що пухлинний супресор von Hippel-Lindau (VHL) регулює розщеплення HIF-1a та HIF-2a, зв'язуючись з ними для подальшої убіквітинації та протеасомної деградації, контролюючи таким чином активність транскрипційного фактора HIF та індукцію експресії багатьох генів, у тому числі і генів факторів росту й ангиогенезу [6, 91]. Більше того, у таких хребетних як амфібії та миші чутливим сенсором кисню може бути шкіра, що є важливим у розвитку адаптаційних процесів на системному рівні, причому ці процеси також опосередковуються транскрипційним фактором HIF і пухлинним супресором von Hippel-Lindau [92, 93]. Це було продемонстровано у досліджах з виключенням альфа-субодиниці HIF-1 або VHL у шкірі, що супроводжувалося пригніченням синтезу еритропоєтину в нирках у відповідь на гіпоксію. Більше того, було виявлено, що за відсутності протеїну VHL спостерігається HIF-залежна дегенерація та злоякісна трансформація серця, що вказує на багатогранність ефектів HIF-сигнального шляху та його залежність від протеїну VHL [94].



**Рис. 6.** Експресія мРНК GLUT1, PFKFB3, VEGF та HIF-1a, а також рівень протеїну HIF-1a у злоякісних пухлинах (П) та умовно нормальній тканині (К) грудної залози і прямої кишки онкологічно хворих пацієнтів [87]. Кількість мРНК та протеїну, яку вимірювали, стандартизували по 18 S рРНК та b-актину, відповідно

**Fig. 6.** The expression of mRNA of GLUT1, PFKFB3, VEGF and HIF-1a as well as HIF-1a protein level in breast and colon malignant tumors (П) and normal tissue counterparts (К) of cancer patients [87]. The measured mRNA and protein quantity were standardized using 18 S rRNA and b-actin, respectively

Відомо також, що стабільність і активність альфа-субодиниці HIF може регулюватися і незалежними від VHL шляхами, причому як за рахунок активації синтезу на рівні транскрипції та/чи трансляції, так і шляхом дестабілізації та ініціації убіквітинації й деградації. Такого типу регуляцію експресії HIF визначає низка факторів.

Так, кіназа 3 глікогенсинтетази може фосфорилювати HIF і опосередковувати його дестабілізацію, а N1-ацетилтрансфераза-1 спермідину/сперміну може зв'язуватися з HIF-1a і RACK1 [guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like-1] й ініціювати убіквітинацію та деградацію альфа-субодиниці HIF-1 [95]. У той же час, під впливом таких чинників як тимозин b4, ендотелін-1, трансглютамінази та фактори росту активація HIF-1a відбувається внаслідок стимуляції синтезу цього протеїну. Посилена експресія альфа-субодиниці транскрипційного фактора HIF спостерігається за умов активації PI3K або MAPK сигнальних шляхів, а також при активації онкогенів і порушенні функції пухлинних супресорів, причому значною мірою за рахунок посиленої трансляції мРНК HIF-1a [96–98]. У зв'язку з цим альфа-субодиниця HIF акумулюється у пухлинних клітинах навіть в умовах нормального рівня кисню після активації таких онкогенів як RAS, SRC або PI3K, а також у результаті втрати VHL або PTEN, причому є дані, що ROS, які генеруються мітохондріальним комплексом III, також необхідні для активації HIF. Звертає на себе увагу наявність зворотних зв'язків між активацією експресії гена ендотеліну-1 транскрипційним фактором HIF через специфічний HRE у промоторі й індукція альфа-субодиниці HIF ендотеліном-1 за умов гіпоксії [23, 97].

Існує припущення, що гіпоксія змінює структуру хроматину таким чином, що незважаючи на посилення експресії багатьох HIF-залежних генів, має місце пригнічення транскрипції й трансляції загалом, у тому числі на етапі елонгації через AMP-активовану протеїнкіназу або mTOR-залежне фосфорилювання кінази eEF2 [99].

Таким чином, адаптація організму до умов гіпоксії значною мірою ініціюється унікальним сенсорним механізмом контролю рівня кисню, що міститься у кожній клітині тіла і змінює характер перебігу багатьох біохімічних процесів, посилюючи експресію великої кількості генів. На клітинному рівні сенсорами кисню є пролілігидроксилази альфа-субодиниць HIF, які ініціюють поліубіквітинацію та протеасомну деградацію цих субодиниць за участі протеїну VHL. Разом з тим, активація HIF-1a спостерігається не лише за гіпоксії; вона може бути результатом активації факторів росту і деяких онкогенів, що свідчить про ключову роль транскрипційного комплексу HIF у реалізації адаптаційних процесів до гіпоксії на молекулярному рівні широкого кола фізіологічних і патофізіологічних процесів від ембріонального розвитку до злоякісних пухлин

**Заклучна частина.** Гіпоксія є одним із потужних факторів впливу на різні сторони метаболізму як у нормальних умовах, так і за різних патофізіологічних станів, у тому числі й за злоякісного росту, шляхом активації транскрипційного фактора HIF та опосередкованої ним індукції експресії великої кількості генів. Транскрипційний фактор HIF являє собою комплекс різних за своїми властивостями субодиниць, із яких лише одна є залежною від гіпоксії і представлена групою подібних за структурою протеїнів, але різних за своїми функціональними характеристиками. Експресія генів альфа-субодиниць HIF виражено активується за умов гіпоксії та у злоякісних пухлинах і має тканинспецифічний характер регуляції, що сприяє забезпеченню клітин організму енергією в умовах зниження рівня кисню чи його використання та їх адаптації до гіпоксії шляхом вираженого посилення гліколітичного шляху метаболізму глюкози. Механізми індукції експресії альфа-субодиниць HIF за гіпоксії та у злоякісних пухлинах є різними. За умов зниження рівня кисню відбувається стабілізація альфа-субодиниць HIF у результаті блокади активності

специфічних для цих субодниць HIF пролілгідроксилаз, що відповідають за ініціацію їх убіквітінації та протеасомної деградації. У той же час у злоякісних пухлинах активація HIF відбувається переважно не за рахунок стабілізації альфа-субодниць, а за рахунок індукції їх синтезу на рівні транскрипції та трансляції під впливом різних факторів, зокрема факторів росту. Разом з тим, спектр HIF-залежних метаболічних процесів, що активуються за умов гіпоксії та у злоякісних пухлинах, є подібним і виражається, зокрема, у посиленні гліколізу та проліферативних процесів через зміни в експресії великої групи генів, відповідальних за їх регуляцію.

1. *Brahimi-Horn M.C., Berra E., Pouyssegur J.* Hypoxia: the tumor's gateway to progression along the angiogenic pathway. **Trends in Cellular Biology**, 2001; 11: 32–36.
2. *Bertout J.A., Patel S.A., Simon M.C.* The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer. **Nature Reviews Cancer**, 2008; 8(12): 967–975.
3. *Brahimi-Horn M.C., Chiche J., Pouyssegur J.* Hypoxia and cancer. **Journal of Molecular Medicine**, 2007; 85(12): 1301–1307.
4. *Hopfl G., Ogunshola O., Gassmann M.* HIFs and tumors – causes and consequences. **American Journal Physiology**, 2004; 286(4): R608–R623.
5. *Arsham A.M., Plas D.R., Thompson C.B., Simon M.C.* Akt and hypoxia-inducible factor-1 independently enhance tumor growth and angiogenesis. **Cancer Research**, 2004; 64: 3500–3507.
6. *Rankin E.B., Giaccia A.J.* The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. **Cellular Death Differentiation**, 2008; 15(4): 678–685.
7. *Brahimi-Horn M.C., Chiche J., Pouyssegur J.* Hypoxia signalling controls metabolic demand. **Current Opinions in Cellular Biology**, 2007; 19(2): 223–229.
8. *Vaupel P., Hockel M., Mayer A.* Detection and characterization of tumor hypoxia using pO<sub>2</sub> histography. **Antioxidants & Redox Signaling**, 2007; 9(8): 1221–1235.
9. *Greijer A.E., van der Groep P., Kemming D.* et al. Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). **Journal of Pathology**, 2005; 206(3): 291–304.
10. *Minchenko D.O., Kubajchuk K.I., Hubenia O.V.* et al. The effect of hypoxia and ischemic condition on the expression of VEGF genes in glioma U87 cells is dependent from *ERN1* knock-down. **Advances in Biological Chemistry**, 2011; 2(2): 198–206.
11. *Kappler M., Taubert H., Schubert J.* et al. The real face of HIF1 $\alpha$  in the tumor process. **Cell Cycle**, 2012; 11(21): 3932–3936.
12. *Stoeltzing O., McCarty M.F., Wey J.S.* et al. Role of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in gastric cancer cell growth, angiogenesis, and vessel maturation. **Journal of National Cancer Institute**, 2004; 96(12): 946–956.
13. *Rankin E.B., Giaccia A.J.* The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. **Cell Death and Differentiation**, 2008; 15(4): 678–685.
14. *Chen Y., Zhang J.L., Pan Y.* et al. Over-Expression of Semaphorin4D, Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ ; and Vascular Endothelial Growth Factor Is Related to Poor Prognosis in Ovarian Epithelial Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, 2012; 13(10): 13264–13274.
15. *Bertout J.A., Majmundar A.J., Gordan J.D.* et al. HIF2 $\alpha$  inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, 2009; 106(34): 14391–14396.
16. *Ratcliffe P.J., O'Rourke J.F., Maxwell P.H., Pugh C.W.* Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. **Journal of Experimental Biology**, 1998; 201: 1153–1162.

17. *Uchida T., Rossignol F., Matthay M.A.* et al. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor HIF-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. **The Journal of Biological Chemistry**, 2004; 279(15): 14871–14878.
18. *Stroka D.M., Burkhardt T., Desbaillets I.* et al. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. **FASEB Journal**, 2001; 15(13): 2445–2453.
19. *Bilton R., Booker G.W.* The subtle side to hypoxia inducible factor (HIF $\alpha$ ) regulation. **European Journal of Biochemistry**, 2003; 270: 791–798.
20. *Cheng J.C., Klausen C., Leung P.C.* Hypoxia-inducible factor 1 alpha mediates epidermal growth factor-induced down-regulation of E-cadherin expression and cell invasion in human ovarian cancer cells. **Cancer Letters**, 2013; 329(2): 197–206.
21. *Kenneth N. S., Rocha S.* Regulation of gene expression by hypoxia. **Biochemical Journal**, 2008; 414: 19–29.
22. *Semenza G.L., Jiang B.-H., Leung S.W.* et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1 and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for HIF-1. **The Journal of Biological Chemistry**, 1996; 271(51): 32529–32537.
23. *Minchenko A., Caro J.* Regulation of endothelin-1 gene expression in human microvascular endothelial cells by hypoxia and cobalt: Role of hypoxia responsive element. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2000; 208(1): 53–62.
24. *Lee J.-W., Bae S.-H., Jeong J.-W.* et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) $\alpha$ : its protein stability and biological functions. **Experimental and Molecular Medicine**, 2004; 36(1): 1–12.
25. *Ke Q., Costa M.* Hypoxia-inducible-factor-1 (HIF-1). **Molecular Pharmacology**, 2006; 70(5): 1469–1480.
26. *Koh M.Y., Spivak-Kroizman T.R., Powis G.* HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. **Trends in Biochemical Sciences**, 2008; 33(11): 526–533.
27. *Chun Y.S., Choi E., Yeo E.J.* et al. A new HIF-1alpha variant induced by zinc ion suppresses HIF-1-mediated hypoxic responses. **Journal of Cell Science**, 2001; 114: 4051–4061.
28. *Chun Y.S., Choi E., Kim T.Y.* et al. A dominant-negative isoform lacking exons 11 and 12 of the human hypoxia-inducible-factor-1alpha gene. **Biochemical Journal**, 2002; 362: 71–79.
29. *Chun Y.S., Lee K.H., Choi E.* et al. Phorbol ester stimulates the nonhypoxic induction of a novel hypoxia-inducible-factor 1alpha isoform: implications for tumor promotion. **Cancer Research**, 2003; 63: 8700–8707.
30. *Semenza G.L.* Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease. **Respiratory Research**, 2000; 1: 159–162.
31. *Kaur B., Khwaja F.W., Severson E.A.* et al. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. **Neuro-Oncology**, 2005; 7(2): 134–153.
32. *Makino Y., Cao R.H., Svensson K.* et al. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. **Nature (London)**, 2001; 414: 550–554.
33. *Makino Y., Kanopka A., Wilson W.J.* et al. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus. **The Journal of Biological Chemistry**, 2002; 277: 32405–32408.
34. *Depping R., Hagele S., Wagner K.F.* et al. A dominant-negative isoform of hypoxia-inducible factor-1 alpha specifically expressed in human testis. **Biology of Reproduction**, 2004; 71(1): 331–339.
35. *Wiesener M.S., Jurgensen J.S., Rosenberger C.* et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. **FASEB Journal**, 2003; 17(2): 271–273.
36. *Hu C.J., Wang L.Y., Chodosh L.A.* et al. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1a) and HIF-2a in hypoxic gene regulation. **Molecular and Cellular Biology**, 2003; 24: 936–9374.

37. *Sowter H.M., Raval R.R., Moore J.W.* et al. Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1alpha versus Hif-2alpha in regulation of the transcriptional response to hypoxia. **Cancer Research**, 2003; 63(19): 6130–6134.
38. *Uchida T., Rossignol F., Matthay M.A.* et al. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor HIF-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. **The Journal of Biological Chemistry**, 2004; 279(15):14871–14878.
39. *Lando D., Peet D.J., Whelan D.A.* et al. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: a hypoxic switch. **Science**, 2002; 295: 858–861.
40. *Ivan M., Haberberger T., Gervasi D.C.* et al. Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, 2002; 99(21): 13459–13464.
41. *Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.M.* et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub> – regulated prolyl hydroxylation. **Science**, 2001; 292: 468–471.
42. *Srinivas V., Leshchinsky I., Sang N.* et al. Oxygen sensing and HIF-1 activation does not require an active mitochondrial respiratory chain electron-transfer pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, 2001; 276(25): 21995–21998.
43. *Minchenko A. G., Leshchinsky I., Opentanova I. L.* et al. Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene. **The Journal of Biological Chemistry**, 2002; 277(8): 6183–6187.
44. *Minchenko O.H., Opentanova I.L., Minchenko D.O.* et al. Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation. **FEBS Letters**, 2004; 576(1): 14–20.
45. *Bobarykina A.Y., Мінченко Д.О., Опентанова І.Л.* et al. Hypoxic regulation of PFKFB-3 and PFKFB-4 gene expression in gastric and pancreatic cancer cell lines and expression of PFKFB genes in gastric cancers. **Acta Biochimica Polonica**, 2006; 53(4): 789–799.
46. *Бобарикіна А.Ю., Мінченко Д.О., Опентанова І.Л.* та ін. Експресія мРНК HIF-1α, HIF-2α та VHL у різних лініях клітин при гіпоксії. **Український біохімічний журнал**, 2006; 78(2): 62–72.
47. *Mahon P.C., Hirota K., Semenza G.L.* FIH 1: a novel protein that interacts with HIF-1α and VHL to mediate repression of HIF 1 transcriptional activity. **Genes & Development**, 2001; 15: 2675–2686.
48. *Masson N., Ratcliffe P.J.* HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in biological response to intracellular O<sub>2</sub> levels. **Journal of Cell Science**, 2003; 116: 3041– 3049.
49. *Hewitson K.S., McNeill L.A., Riordan M.V.* Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. **The Journal of Biological Chemistry**, 2002; 277: 26351– 26355.
50. *Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.M.* et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub> – regulated prolyl hydroxylation. **Science**, 2001; 292: 468–471.
51. *Ivan M., Kondo Z.K., Yang H.F.* et al. HIF-1α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. **Science**, 2001; 292: 464–468.
53. *Appelhoff R.J., Tian Y-M., Raval R.R.* Differential function of the prolyl hydroxylase PHD1, PHD2 and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. **The Journal of Biological Chemistry**, 2004; 279(37): 38458–38465.
53. *Raur B.H., Durar V., Gottlieb E.* Prolyl hydroxylases as regulators of cell metabolism. **Biochemical Society Transactions**, 2009; 37: 291–294.
54. *Kaelin W.G.Jr.* The von Hippel-Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2005; 338(1): 627–638.
55. *Min J.-H., Yang H., Ivan M., Gertler F.* Structure of a HIF-1α-pVHL complex: hydroxyprolylne recognition in signalling. **Science**, 2002; 296: 1886–1889.

56. Lancaster D.E., McNeill L.A., McDonough M.A. et al. Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. **Biochemical Journal**, 2004; 383: 429–437.
57. Lee C., Kim S.J., Jeong D.G. et al. Structure of human FIH-1 reveals a unique active site pocket and interaction sites for HIF-1 and von Hippel-Lindau. **The Journal of Biological Chemistry**, 2003; 278(9): 7558–7563.
58. Taylor M.S. Characterization and comparative analysis of the EGLN gene family. **Gene**, 2001; 275: 125–132.
59. Elkins J.M., Hewitson K.S., McNeil L.A. et al. Structure of factor inhibiting hypoxia-inducible factors (HIF) reveals mechanism of oxidative modification of HIF-1. **The Journal of Biological Chemistry**, 2003; 278: 1802–1806.
60. Dann C.E.III., Bruick R.K., Deisenhofer J. Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1: an asparaginyl hydroxylase involved in the hypoxic response pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, 2002; 99: 15351–15356.
61. Schofield C.J., Ratcliffe P.J. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2004; 5: 343–354.
62. Peyssonnaud C., Nizet V., Johnson R.S. Role of the hypoxia inducible factors HIF in iron metabolism. **Cell Cycle**, 2008; 7(1): 28–32.
63. Peyssonnaud C., Zinkernagel A.S., Schuepbach R.A. et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). **Journal of Clinical Investigations**, 2007; 117(7): 1926–1932.
64. Bentovim L., Amarilio R., Zelzer E. HIF1 $\alpha$  is a central regulator of collagen hydroxylation and secretion under hypoxia during bone development. **Development**, 2012; 139(23): 4473–4483.
65. Cicchillitti L., Di Stefano V., Isaia E. et al. Hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  induces miR-210 in normoxic differentiating myoblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, 2012; 287(53): 44761–44771.
66. Ratcliffe P.J., O'Rourke J.F., Maxwell P.H., Pugh C.W. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. **Journal of Experimental Biology**, 1998; 201: 1153–1162.
67. Minchenko O., Opentanova I., Caro J. Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression *in vivo*. **FEBS Letters**, 2003; 554(3): 264–270.
68. Minchenko A., Bauer T., Salceda S., Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression *in vitro* and *in vivo*. **Laboratory Investigation**, 1994; 71(3): 374–379.
69. Mueller M.D., Vigne J.-L., Minchenko A.G. et al. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors “a” and “b”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, 2000; 97(20): 10972–10977.
70. Aversa C.R., Oparil S., Caro J. et al. Hypoxia stimulates human preproendothelin-1 promoter activity in transgenic mice. **American Journal Physiology**, 1997; 273 (4 Pt 1): L848–L855.
71. Minchenko O.H., Ochiai A., Opentanova I.L. et al. Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors. **Biochimie**, 2005; 87(11): 1005–1010.
72. Erpolat O.P., Gocun P.U., Akmansu M. et al. Hypoxia-related molecules HIF-1 $\alpha$ , CA9, and osteopontin: Predictors of survival in patients with high-grade glioma. **Strahlenther Onkologie**, 2013; 189(2): 147–154.
73. Weidemann A., Johnson R.S. Biology of HIF-1 $\alpha$ . **Cell Death & Differentiation**, 2008; 15(4): 621–627.
74. He Y., Kim H., Ryu T. et al.  $\delta$ -catenin overexpression promotes angiogenic potential of CWR22Rv-1 prostate cancer cells via HIF-1 $\alpha$  and VEGF. **FEBS Letters**, 2013; 587(2): 193–199.

75. Denko N.C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. **Nature Reviews Cancer**, 2008; 8: 705–713.
76. Rankin E.B., Rha J., Unger T.L. et al. Hypoxia-inducible factor-2 regulates vascular tumorigenesis in mice. **Oncogene**, 2008; 27(40): 5354–5358.
77. Azar R., Lasfargues C., Bousquet C., Pyronnet S. Contribution of HIF-1 $\alpha$  in 4E-BP1 Gene Expression. **Molecular Cancer Research**, 2013; 11(1): 54–61.
78. Johnson A.B., Denko N., Barton M.C. Hypoxia induces a novel signature of chromatin modifications and global repression of transcription. **Mutation Research**, 2008; 640: 174–179.
79. Carmeliet P., Dor Y., Herbert J.M. et al. Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. **Nature**, 1998; 394(6692): 485–490.
80. Semenza G.L. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. **Drug Discovery Today**, 2007; 12: 853–859.
81. Chen J., Zhao S., Nakada K. et al. Dominant-negative hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  reduces tumorigenicity of pancreatic cancer cells through the suppression of glucose metabolism. **American Journal of Pathology**, 2003; 162(4): 1283–1291.
82. Shojaei F., Ferrara N. Antiangiogenic therapy for cancer: an update. **Cancer Journal**, 2007; 13(6): 345–348.
83. Minchenko D.O., Bobarykina A.Y., Ratushna O.O. et al. Dominant-negative constructs of human 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 and -4: effect on the expression of endogenous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase mRNA. **Bio-technology**, 2008; 1(4): 49–56.
84. Zheng X., Linke S., Dias J.M. et al. Interaction with factor inhibiting HIF-1 defines an additional mode of cross-coupling between the Notch and hypoxia signaling pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, 2008; 105: 3368–3373.
85. Patel S.A., Simon M.C. Biology of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  in development and disease. **Cell Death & Differentiation**, 2008; 15(4): 628–634.
86. Bertout J.A., Patel S. A., Fryer B.H. et al. Heterozygosity for hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  decreases the incidence of thymic lymphomas in a p53 mutant mouse model. **Cancer Research**, 2009; 69: 3213–3220.
87. Chen C., Cai S., Wang G. et al. c-Myc enhances colon cancer cell-mediated angiogenesis through the regulation of HIF-1 $\alpha$ . **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2013; 430(2): 505–511.
88. Laderoute K.R., Calaoagan J.M., Knapp M., Johnson R.S. Glucose utilization is essential for hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$ -dependent phosphorylation of c-Jun. **Molecular and Cellular Biology**, 2004; 24(10): 4128–4137.
89. Cockman M.E., Lancaster D.E., Stolze I.P. et al. Posttranslational hydroxylation of ankyrin repeats in I $\kappa$ B proteins by the hypoxia-inducible factor (HIF) asparaginyl hydroxylase, factor inhibiting HIF (FIH). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, 2006; 103: 14767–14772.
90. Van Uden P., Kenneth N.S., Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by NF- $\kappa$ B. **Biochemical Journal**, 2008; 381: 477–484.
91. Kaelin W.G. Jr. The von Hippel–Lindau tumour suppressor protein: O<sub>2</sub> sensing and cancer. **Nature Reviews Cancer**, 2008; 8: 865–872.
92. Boutin A.T., Weidemann A., Fu Z. et al. Epidermal sensing of oxygen is essential for systemic hypoxic response. **Cell**, 2008; 133(2): 223–234.
93. Kapitsinou P.P., Haase V.H. The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice. **Cell Death & Differentiation**, 2008; 15(4): 650–659.
94. Lei L., Mason S., Liu D. Hypoxia-inducible factor-dependent degeneration, failure, and malignant transformation of the heart in the absence of the von Hippel–Lindau protein. **Molecular and Cellular Biology**, 2008; 28(11): 3790–3803.



95. Baek J.H., Liu Y.V., McDonald K.R. et al. Spermidine/spermine N1-acetyltransferase-1 binds to hypoxia-inducible factor-1a (HIF-1a) and RACK1 and promotes ubiquitination and degradation of HIF-1a. **The Journal of Biological Chemistry**, 2007; 282: 33358–33366.
96. Ock M.S., Song K.S., Kleinman H., Cha H.J. Thymosin  $\beta$ 4 stabilizes hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protein in an oxygen-independent manner. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2012; 1269: 79–83.
97. Li M., Liu Y., Jin F. et al. Endothelin-1 induces hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  expression in pulmonary artery smooth muscle cells. **FEBS Letters**, 2012; 586(21): 3888–3893.
98. Kumar S., Mehta K. Tissue transglutaminase constitutively activates HIF-1 $\alpha$  promoter and nuclear factor- $\kappa$ B via a non-canonical pathway. **PLoS One**, 2012; 7(11): e49321.
99. Wouters B.G., Koritzinsky M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. **Nature Reviews Cancer**, 2008; 8: 851–762.

---

## MOLECULAR MECHANISMS OF REGULATION OF GENE EXPRESSION AT HYPOXIA

**D. O. Minchenko<sup>1,2</sup>, O. V. Hubenia<sup>1,3</sup>, K. I. Kubaichuk<sup>1</sup>,  
T. V. Bakalets<sup>1</sup>, Y. A. Harmash<sup>1</sup>, I. V. Kryvdiuk<sup>1</sup>, R. Yu. Marunych<sup>1</sup>,  
B. M. Terletsyky<sup>1</sup>, R. V. Sulik<sup>3</sup>, N. K. Murashko<sup>3</sup>, O. H. Minchenko<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, 9, Leontovych St., Kyiv 01601, Ukraine*

<sup>2</sup>*O.O. Bohomoletz National Medical University, 13, Shevchenko Blvd., Kyiv 01601, Ukraine*

<sup>3</sup>*Shupik National Medical Academy of Post-Graduate Education  
9, Dorogozhytska St., Kyiv 04112, Ukraine  
e-mail: ominchenko@yahoo.com*

Hypoxia is one of powerful inducers of expression of a large group of genes, including genes which control glycolysis, angiogenesis and proliferation supporting cell surviving at low oxygen condition. However, in tumor cells hypoxia was observed at normal oxygen tension condition as a result of its decreased utilization. Moreover, hypoxia is an obligate component of malignant tumor growth and substantially controls glycolysis, angiogenesis and proliferation processes. Data concerning molecular mechanisms of activation of hypoxia inducible transcription factor HIF in cells at hypoxia and in malignant tumors, as well as its role of in the regulation of gene expressions have been analyzed. The mechanisms of interaction of the transcription factor HIF with specific hypoxic regulatory elements in the promoter region of genes activated by hypoxia were examined.

**Keywords:** hypoxia, molecular mechanisms, regulation of gene expression, HIF, malignant tumors.

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРИ ГИПОКСИИ

*Д. А. Минченко<sup>1,2</sup>, Е. В. Губеня<sup>1,3</sup>, Е. И. Кубайчук<sup>1</sup>,  
Т. В. Бакалец<sup>1</sup>, Я. А. Гармаш<sup>1</sup>, И. В. Кривдюк<sup>1</sup>, Р. Ю. Марунич<sup>1</sup>,  
Б. М. Терлецкий<sup>1</sup>, Р. В. Сулик<sup>3</sup>, Н. К. Мурашко, А. Г. Минченко<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины  
ул. Леонтовича, 9, Киев 01601, Украина*

*<sup>2</sup>Национальный медицинский университет им. А. А. Богомольца,  
бульв. Шевченко, 13, Киев 01601, Украина*

*<sup>3</sup>Национальная медицинская академия последипломного образования им. П. Л. Шупика  
ул. Дорогожицкая, 9, Киев 01601, Украина*

Гипоксия является одним из мощных индукторов экспрессии большой группы генов, в том числе генов, контролирующих гликолиз, ангиогенез и процессы пролиферации, что содействует выживанию клеток в условиях сниженного уровня кислорода. Но гипоксия, наблюдаемая в клетках злокачественных опухолей, происходит в условиях нормального парциального давления кислорода вследствие сниженного его потребления. Более того, гипоксия является обязательным компонентом процессов злокачественного роста и в значительной степени контролирует процессы гликолиза, ангиогенеза и пролиферации. Анализируются данные о молекулярных механизмах индукции зависимого от гипоксии транскрипционного фактора HIF в клетках при гипоксии и в злокачественных опухолях, а также его роль в регуляции экспрессии генов, механизмы взаимодействия этого транскрипционного фактора со специфическими регуляторными последовательностями промоторов генов, активирующихся при гипоксии.

**Ключевые слова:** гипоксия, молекулярные механизмы регуляции, экспрессия генов, HIF, злокачественные опухоли.

Одержано: 31.01.2013