

ОГЛЯДИ

УДК 577.112

РОЛЬ ПРОТЕЇНІВ РОДИНИ HIF (HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR) В РЕГУЛЯЦІЇ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ВІДПОВІДЕЙ КЛІТИН НА ГІПОКСІЮ

А. А. САМОЙЛЕНКО

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: toljas@yahoo.com

Огляд присвячено висвітленню ролі протеїнів родини HIF (hypoxia-inducible factor) в регуляції експресії генів ссавців в умовах гіпоксії. Описано особливості будови α - та β -субодиниць HIF, механізми регуляції стабільності та активності HIF шляхом гідроксилювання. Особливу увагу приділено механізмам регуляції вмісту й транскрипційної активності HIF за допомогою фосфорилування та інших посттрансляційних модифікацій. Розглянуто роль гормонів, цитокінів й факторів росту у стимуляції HIF за умов нормоксії. Представлено відомості про гени-мішені дії HIF, а також промоторні й енхансерні послідовності, що беруть участь у регуляції експресії генів за різного внутрішньоклітинного вмісту кисню.

Ключові слова: гіпоксія, фактори, що стимулюються гіпоксією, гідроксилювання, фосфорилування.

Здатність аеробних організмів пристосуватись до змін в концентрації кисню є необхідною для їхнього виживання. Парціальний тиск кисню в тканинах вищий за фізіологічний (гіпероксія) призводить до пошкодження клітин через формування реактивних метаболітів кисню, в той час як тиск кисню нижчий за фізіологічний (гіпоксія) є небезпечним через те, що кисень, як кінцевий акцептор електронів, потрібний для функціонування мітохондрій, а також бере участь у багатьох процесах метаболізму [1]. Залежно від особливостей кровопостачання, в деяких органах та тканинах виникають градієнти концентрації кисню [2]. Вони формуються за фізіологічних умов у печінці та нирках, під час ембріогенезу, заживлення ран, а також при багатьох хворобах, зокрема онкологічних й серцево-судинних. Вважається, що внутрішньопухлинна гіпоксія є рушійною силою у прогресуванні раку, відіграючи ключову роль у процесах метастазування й ангиогенезу [3, 4].

Хоча в цілому за нестачі кисню синтез мРНК та протеїнів пригнічується, на даний момент вже описано більше 70 генів, експресія яких суттєво посилюється в умовах гіпоксії [5, 6]. Продукти цих генів або підвищують доступність кисню, посилюючи гематопоез (еритропоетин [7, 8]) чи ангиогенез (фактор

росту ендотеліальних клітин судин VEGF, vascular endothelial growth factor [9]), або забезпечують адаптацію до низьких концентрацій кисню (ензими гліколізу та транспортери глюкози [10, 11]). На молекулярному рівні ключову роль у пристосуванні клітин до низького вмісту кисню відіграють транскрипційні фактори, що стимулюються гіпоксією (HIF, hypoxia-inducible factors).

Структурні особливості будови протеїнів родини HIF

Починаючи з ідентифікації у 1992 р. протеїну HIF-1 [12], механізм регуляції експресії генів за дії низьких концентрацій кисню є предметом активного вивчення. На сьогодні цей механізм вже охарактеризований в загальних рисах. Промотори більшості генів, що індукуються гіпоксією, містять специфічну послідовність, відому як елемент відповіді на гіпоксію HRE (hypoxia response element) [11]. До цієї послідовності приєднуються протеїни з родини факторів, що стимулюються гіпоксією. Серед них найкраще охарактеризовано HIF-1, який є димером. До його складу входять субодиниця HIF-1 α (826 амінокислот у людини), рівень якої зростає в умовах гіпоксії, і субодиниця HIF-1 β (789 амінокислот у людини, також відома як ARNT, arylhydrocarbon receptor

nuclear translocator), яка експресується конститутивно (рис. 1) [3, 13]. Як α -, так і β -субодиниці HIF-1 належать до родини транскрипційних факторів bHLH-PAS, що містять домени «основна спіраль – петля – спіраль» (bHLH, basic helix-loop-helix) та PAS (Per-ARNT-Sim) [14]. За зв'язування з ДНК відповідає bHLH домен HIF-1 α (амінокислоти 17–70), в той час як для димеризації HIF-1 α є необхідними обидва домени, bHLH і PAS (амінокислоти 106–350). С-кінцева ділянка HIF-1 α містить два домени, що відіграють роль у трансактивації, а саме NAD (N-terminal activation domain, амінокислоти 531–575) та CAD (C-terminal activation domain, амінокислоти 786–826) [15, 16]. Послідовність ODDD (O₂-dependent degradation domain, амінокислоти 401–603), необхідна для кисеньзалежної деградації HIF-1 α , частково перекривається з доменом NAD [17]. Нарешті, молекула HIF-1 α містить інгібіторний домен (амінокислоти 576–785), делетування якого посилює транскрипційну активність в умовах нормоксії [15].

На відміну від HIF-1 α , субодиниця β містить лише один трансактивуючий домен (CAD), а також позбавлена послідовності ODDD, що й зумовлює незалежність експресії цієї субодиниці від внутрішньоклітинного вмісту кисню [14]. Універсальність значення HIF-1 для регулювання клітинної відповіді на гіпоксію підкреслює той факт, що у хребетних цей протеїн експресовано практично в усіх типах клітин. Відсутність як α -, так і β -субодиниці HIF-1 у мишей призводить до загибелі їх ще під час ембріонального розвитку [18–20].

Крім HIF-1 α , також описано дві інші α -субодиниці HIF, що є зв'язувальними партнерами ARNT, а саме HIF-2 α (відома також

як EPAS-1, endothelial PAS domain protein-1; MOP-2, member of the PAS superfamily-2; HRF, HIF-related factor і HLF, HIF-like factor) та HIF-3 α (відома також як MOP-7) [13, 21, 22]. Амінокислотні послідовності доменів bHLH та PAS протеїну HIF-2 α є високогомологічними (85 та 70%) відповідним послідовностям HIF-1 α . Також спостерігається значна (70%) гомологія між амінокислотними послідовностями ODDD протеїнів HIF-1 α та HIF-2 α [3]. На відміну від HIF-1 α , HIF-2 α експресується лише в клітинах окремих типів [23]. Третій представник родини HIF, HIF-3 α , містить домени bHLH-PAS та ODDD, гомологічні відповідним доменам HIF-1 α й HIF-2 α , проте позбавлений С-кінцевого трансактивуючого домену [22]. Подібно до HIF-2 α , експресія HIF-3 α не є універсальною. Хоча відомо, що HIF-3 α утворює гетеродимери з ARNT та може зв'язуватися з послідовностями елементів відповіді на гіпоксію *in vitro*, його роль *in vivo* ще не є цілком з'ясовано [24].

Для α -субодиниць HIF, в першу чергу для HIF-3 α , відомі численні ізоформи, що утворюються внаслідок альтернативного сплайсингу. Найвідомішою з них є протеїн IPAS (inhibitory domain PAS protein), вкорочена ізоформа субодиниці HIF-3 α , яка утворює гетеродимери з HIF-1 α і, таким чином, перешкоджає зв'язуванню останнього з ARNT [25].

Крім ARNT, існують також дві інші β -субодиниці HIF – ARNT2 і ARNT3 (відома також як BMAL-1, brain and muscle ARNT-like protein-1; MOP-3) [13, 21, 26]. Амінокислотна послідовність ARNT2 на 57% ідентична послідовності ARNT [3]. Експресію цього протеїну виявлено лише в мозку та нирках [26]. Відповідно було показано, що ARNT2 бере

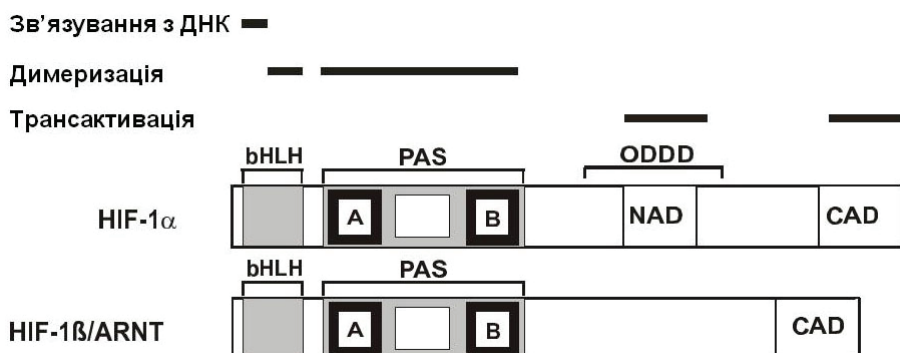


Рис. 1. Структура протеїнів HIF-1 α і HIF-1 β (ARNT). bHLH – домен «основна спіраль – петля – спіраль» (basic helix-loop-helix), PAS – домен Per-ARNT-Sim (показано A і B повтори), ODDD – домен, необхідний для кисеньзалежної деградації (O₂-dependent degradation domain), NAD і CAD – N- і C-кінцеві домени трансактивації (N- and C-terminal activation domains)

участь у регулюванні відповіді нейронів на гіпоксію. ARNT3 є необхідним для експресії генів, які забезпечують функціонування циркадних ритмів. Водночас, дані щодо того, чи відіграє ARNT3 роль у регулюванні клітинної відповіді на гіпоксію *in vivo*, є доволі суперечливими [21, 27].

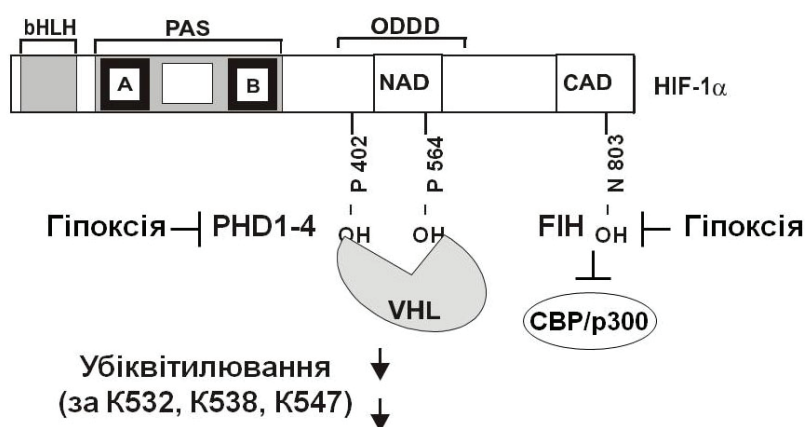
Регуляція стабільності та активності HIF шляхом гідроксидування

Внутрішньоклітинний вміст HIF-1 регулюється, головним чином, на посттрансляційному рівні [28, 29]. В умовах нормоксії синтез HIF- α відбувається, проте новоутворений протеїн дуже швидко деградує [30]. Це зумовлено тим, що у разі нормального внутрішньоклітинного вмісту кисню два залишки проліну (P402 та P564) в послідовності ODDD субодиниці HIF-1 α гідроксуються специфічними пролілгідроксилазами PHD1-4 (prolyl hydroxylase domain) [28, 31, 32] (рис. 2). Гідроксидування дає змогу протеїну VHL (von Hippel-Lindau tumor suppressor protein), що поряд з елонгінами B та C є компонентом убіквітин-лігазного комплексу E3, зв'язуватися з молекулою HIF-1 α та стимулювати її убіквітування за залишками лізину K532, K538, K547 [33, 34]. Гідроксидування кожного з двох залишків проліну за дії PHD є достатнім для приєднання VHL, тоді як мутація водночас обох залишків проліну (P402 та P564) значно збільшує стабільність HIF-1 α [35]. Так само стабілізує молекулу HIF-1 α мутація всіх трьох залишків лізину K532, K538 і K547. На заключ-

ному етапі поліубіквітильований HIF- α транслокується до 26S протеасом, де відбувається його подальша деградація [29]. В умовах гіпоксії проліл-гідроксилази інактивуються, що й призводить до стабілізації HIF-1 α . Уникнувши деградації у протеосомах, HIF-1 α нагромаджується, і, завдяки наявності у C-кінцевій та N-кінцевій частинах молекули двох сигналів ядерної локалізації, транслокується до ядра [36] й формує там комплекс з HIF-1 β . Утворений гетеродимер зв'язується з промоторними послідовностями HRE та індукує експресію відповідних генів.

Крім PHD, критичну роль у функціонуванні HIF відіграє аспарагінгідроксилаза FIH-1 (factor inhibiting HIF-1). За умов нормоксії цей ензим каталізує гідроксидування залишків аспарагіну (N803 в HIF-1 α та N847 в HIF-2 α) в домені CAD, що перешкоджає зв'язуванню активатора транскрипції CBP (cAMP-response element-binding protein)/p300 з α -субодиницями HIF [37]. За гіпоксії гідроксидування N803 не відбувається, що робить можливою взаємодію між доменами CAD HIF-1 α та CH1 (cysteine/histidine-rich domain 1) CBP/p300 [38]. Ця взаємодія є необхідною для повної активації HIF-1.

Як PHD, так і FIH належать до надродини 2-оксоглутаратзалежних діоксигеназ (EC 1.14.11.2) [39]. Їхніми субстратами є молекулярний кисень і проміжний продукт циклу Кребса 2-оксоглутарат, а кофакторами виступають залізо Fe²⁺ та аскорбат. Ці ензими каталізують реакцію, в якій один атом кисню включається



Деградація у протеосомах

Рис. 2. Регулювання стабільності та активності протеїну HIF-1 α шляхом гідроксидування. PHD – пролілгідроксилази (prolyl hydroxylase domain), FIH – аспарагінгідроксилаза (factor inhibiting HIF-1), VHL – компонент E3 убіквітин-лігазного комплексу (von Hippel-Lindau tumor suppressor protein), CBP/p300 – активатор транскрипції (cAMP-response element-binding protein/p300)

до залишку проліну чи аспарагіну, а інший — до 2-оксоглутарату, при цьому утворюються CO_2 та сукцинат. Оскільки афінність PHD до кисню є низькою (K_m приблизно 178 мм Hg), навіть порівняно незначне зниження внутрішньоклітинної концентрації кисню призводить до різького зниження швидкості реакції гідроксилування HIF-1 α за залишками проліну [31]. На відміну від PHD, K_m для FHN становить близько 64 мм Hg, таким чином, гідроксилування HIF-1 α за залишком аспарагіну припиняється за нижчих концентрацій кисню. Отже, повна активація HIF-1 α відбувається лише за умов суворої гіпоксії, коли реакції, каталізовані як PHD, так і FHN, не відбуваються через нестачу субстрату [6].

Залежність ензиматичної активності PHD1-4 і FHN від концентрації молекулярного кисню дає змогу розглядати ці білки як первинні сенсори внутрішньоклітинного вмісту кисню [31, 32, 37, 39]. Більш того, біологічні властивості PHD1-4 і FHN дають змогу пояснити механізм дії багатьох «міметиків» гіпоксії: хелаторів заліза, йонів двовалентних металів (Ni^{2+} , Mn^{2+} та Co^{2+}), що можуть заміщувати Fe^{2+} , а також аналогів 2-оксиглутарату, таких як диметилксигліцин. З іншого боку, наявні дані не пояснюють механізми дії деяких речовин, які можуть перешкоджати експресії генів, стимульованих гіпоксією. Це окис вуглецю (CO), що може зв'язуватися з гемом, та інгібітори синтезу гему, такі як сукцинілацетон [7, 40]. Тому існує погляд, що первинним сенсором кисню у клітині є гемвмісний протеїн, зокрема компонент дихального ланцюга мітохондрій [41, 42] або немітохондріальний протеїн, такий як NAPH оксидаза (Nox) [43, 44].

Інші механізми регулювання вмісту й активності HIF

Хоча посттрансляційна модифікація HIF-1 є, судячи з усього, основним чинником, який визначає внутрішньоклітинний вміст цього протеїну у разі гіпоксії, існують дані, що гіпоксія стимулює також експресію мРНК і протеїну α -субодиниць HIF як *in vitro*, так і *in vivo* [45–47]. З іншого боку, у багатьох експериментальних моделях не було виявлено змін у транскрипції генів α -субодиниць HIF залежно від внутрішньоклітинного вмісту кисню [48] або ці зміни мали місце лише за дії дуже сильного стимулу, наприклад, після повної окклюзії центральної мозкової артерії протягом 20 год [49]. Показано, наприклад, що у щурів *in vivo* з усіх α - та β -субодиниць HIF лише рівень HIF-3 α мРНК істотно зростає за дії гіпоксії [24].

Є численні повідомлення, що, крім гідроксилування, HIF-1 α зазнає також інших посттрансляційних модифікацій, зокрема фосфорилювання, ацетилювання, S-нітрозилування та SUMOїлювання. Ці модифікації роблять вагомий внесок як у регулювання активності HIF-1 в умовах гіпоксії, так і у підвищення базальної активності HIF-1 за нормоксії [50]. Крім модулювання транскрипційної активності, зазначені посттрансляційні модифікації впливають на стабільність, міжпротеїнові взаємодії та внутрішньоклітинну локалізацію HIF-1.

Хоча вважається, що для регулювання активності HIF-1 фосфорилювання є менш важливим, ніж для багатьох інших транскрипційних факторів, відомо, що цей протеїн є фосфорильованим за декількома сайтами, особливо розташованими в домені ODDD [14] (рис. 3). Серед кіназ, що беруть участь у фосфорилюванні HIF, найкраще вивчено роль ERK1/2 (p42/p44) [51]. Показано, що гіпоксія дещо підвищує активність ERK1/2 в багатьох, хоча не в усіх досліджених лініях клітин. Декілька дослідницьких груп продемонстрували фосфорилювання HIF-1 α та HIF-2 α за дії ERK1/2 як *in vitro*, так і *in vivo* [51]. З використанням методу мас-спектроскопії було показано, що фосфорилювання HIF-1 α у присутності ERK1/2 відбувається за двома залишками серину (S641 і S643). ERK1/2-стимульоване фосфорилювання призводить як до посилення транскрипційної активності HIF-1, зокрема, шляхом регулювання взаємодії HIF-1 з CBP/p300, так і до зростання його ядерної локалізації. Що стосується інших представників надродини MAP-кіназ, то безпосереднє фосфорилювання HIF-1 α за дії p38 α й p38 γ призводить до посилення трансактивуючої активності HIF-1 α [52, 53]. Існують також дані, що p38-опосередковане фосфорилювання HIF-1 α інгібує його деградацію у протеасомах [53]. Сайти фосфорилювання HIF-1 α за дії p38 знаходяться у складі інгібіторного домену, хоча відповідні залишки серину не були точно локалізовані [52]. В одному дослідженні було також показано роль c-JNK в активації HIF-1, хоча за іншими даними HIF-1 α не зазнає фосфорилювання за дії c-JNK [52, 54].

В той час як кінази надродини MAP переважно регулюють транскрипційну активність HIF-1 α , компоненти PI3K/Akt сигнального шляху впливають головним чином на синтез та стабільність HIF-1 α . Подібно до ERK1/2, активація PI3K/Akt в умовах гіпоксії відбувається залежно від типу клітин. Конститутивна ак-

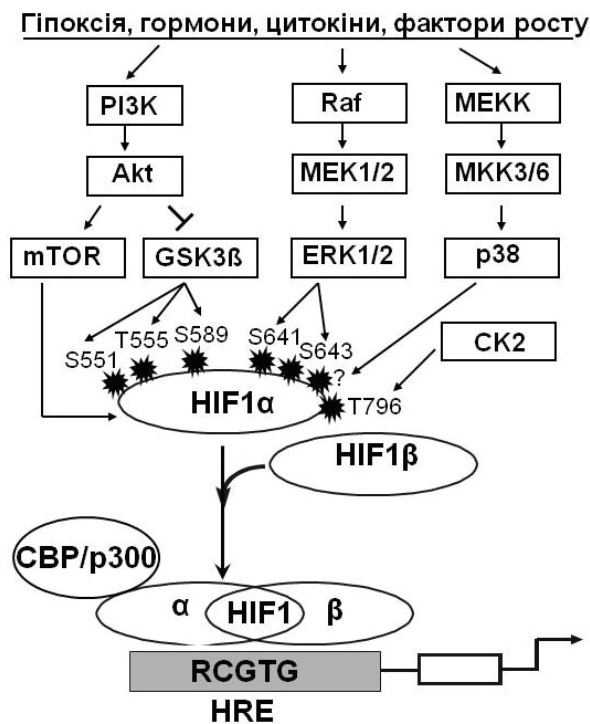


Рис. 3. Регулювання активності та стабільності протеїну HIF-1α шляхом фосфорилування. Кінази: PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), Akt/PKB (protein kinase B), mTOR (mammalian target of rapamycin), GSK3β (glycogen synthase kinase 3β), Raf, MEK1/2 (mitogen activated protein/ERK kinase), ERK1/2 (extracellular regulated kinase 1/2), MEKK (mitogen activated protein kinase kinase), MKK3/6 (mitogen activated protein kinase kinase 3/6), p38, CK2 (casein kinase 2). HRE – елемент відповіді на гіпоксію (hypoxia response element), що містить послідовність 5'-RCGTG-3' (R=A/G). (Модифіковано з [51])

тивація PI3K та Akt, а також втрата інгібітора цього сигнального шляху PTEN, посилюють активність HIF-1 як в умовах гіпоксії, так і нормоксії [51]. Вважається, що кіназа Akt не фосфорилує HIF-1α безпосередньо, а впливає на активність цього транскрипційного фактора через нижчерозташовані компоненти сигнального шляху, такі як mTOR (mammalian target of rapamycin), GSK-3β (glycogen synthase kinase-3) та HDM2 (human homologue of mouse double minute mdm2) [51]. Зокрема, сигналювання, опосередковане mTOR, регулює активність HIF-1α на рівні як трансляції, так і посттрансляційної деградації. Надекспресія GSK-3β в клітинах HepG2 знижує рівень HIF-1α, тоді як siRNA-опосередковане пригнічення експресії, а також інгібування активності GSK-3β при-

зводить до нагромадження HIF-1α [55]. Було продемонстровано, що GSK-3β безпосередньо фосфорилує HIF-1α за залишками S551, T555 та S589, розташованими в домені TAD-N [55, 56]. Фосфорилування HIF-1α за цими залишками знижує його стабільність незалежно від наявності VHL. Цікаво, що вплив гіпоксії на активність компонентів PI3K/Akt сигнального шляху має двостадійний характер. Короткотривала гіпоксія посилює активність PI3K/Akt та зумовлює нагромадження HIF-1α, тоді як довготривала гіпоксія посилює активність GSK-3β та дещо знижує рівні HIF-1α у клітинах HepG2 [57].

Важливим регулятором транскрипційної активності HIF-1α, що не впливає на його стабілізацію в умовах гіпоксії, є CK2 (casein kinase 2). Вважається, що фосфорилування HIF-1α за дії CK2 за залишком треоніну T796 у домені CAD інгібує його гідроксилювання за дії Fln-1, тим самим стимулюючи зв'язування CBP/p300 та активацію HIF-1 [58]. Існують певні дані про роль інших кіназ, а саме PKA, PKCζ та AMPK (AMP-activated kinase), у регулюванні експресії генів за участю HIF-1α, проте відповідні сайти фосфорилування в молекулі HIF-1α, а також інші деталі щодо механізму їхньої дії, залишаються невідомими [51].

Дещо суперечливими є дані щодо внеску ацетилювання, S-нітрозилування та SUMOїлювання в регулюванні активності HIF-1α [50, 59]. Опубліковано, що HIF-1α за дії ARD1 зазнає ацетилювання за залишком лізину K532 в ODDD, що супроводжується убіквітилюванням та наступною деградацією протеїну [60]. Проте подальші дослідження заперечили як регуляторний вплив ацетилювання HIF-1α, так і пригнічення експресії ARD1 за гіпоксії, хоча й підтвердили специфічний характер зв'язування між ARD1 та HIF-1α [61, 62]. Було показано, що в молекулі HIF-1α відбувається S-нітрозилування тіолової групи цистеїну C800 за дії оксиду азоту [63], але в різних дослідженнях ця модифікація призводила як до посилення його взаємодії з CBP/p300 та зростання транскрипційної активності [63], так і до послаблення зв'язування CBP/p300 з HIF-1α [64]. Кілька дослідницьких груп продемонстрували факт SUMOїлювання HIF-1α, проте функціональне значення цієї модифікації не є цілком зрозумілим. В одних дослідженнях SUMOїлювання призводило до посилення стабільності й транскрипційної активності HIF-1α [65, 66], тоді як в інших – до зниження активності й посилення VHL-опосередкованого убіквітилювання [67].

Багато компонентів внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, включаючи p53, Ras, v-Src та c-Myc, можуть впливати на стабілізацію та/або активність HIF-1 [50]. Дослідження останніх років ще більш розширили перелік внутрішньоклітинних молекул, що впливають на функціонування HIF-1, долучивши до нього, зокрема, декілька адаптерних/риштувальних протеїнів. Наприклад, Morig1 (MARK organizer 1) є риштувальним протеїном, що зв'язує PHD3 *in vitro* та *in vivo*. Відповідно Morig1 пригнічує HIF-залежну репортерну активність, тоді як пригнічення експресії Morig1 значно посилює активність HIF-1 [68]. Дані щодо надекспресії адаптерного протеїну Shc *in vitro* свідчать про його роль в індукованій гіпоксією стабілізації HIF-1 [69]. Нарешті, було показано, що надекспресія адаптерного/риштувального протеїну Ruk/CIN85 підвищує стабільність HIF-1 α , ймовірно, впливаючи на його гідроксилування за залишком проліну [70].

Як вміст протеїну HIF- α , так і його транскрипційна активність можуть посилюватися в умовах нормоксії у відповідь на дію численних стимулів. Фактори росту, в тому числі EGF (epidermal growth factor), інсулін, IGF-1/2 (insulin-like growth factors 1/2) та ангіотензин II, й цитокіни, такі як TNF- α (tumor necrosis factor α) й інтерлейкін-1 β (IL-1 β), впливають на функціонування HIF-1 α шляхом посилення його експресії в умовах нормоксії до рівня, за якого кисеньзалежні механізми деградації втрачають свою ефективність, або пригнічуючи активність PHD та FIH-1 [71]. На відміну від гіпоксії, перелічені фактори залежно від типу клітин можуть по-різному впливати чи взагалі не можуть впливати на HIF-1 α . Основними внутрішньоклітинними сигнальними шляхами, що визначають експресію та активність HIF-1 α за дії цитокінів та факторів росту, є PI3K/Akt й MAPK [51, 71]. Активація цих сигнальних шляхів спричиняє, зокрема, фосфорилування транскрипційних факторів, таких як 4E-BP1 і p70S6K, що регулюють експресію HIF-1 α . Крім того, важливу роль у регулюванні експресії HIF-1 α за дії HGF (hepatocyte growth factor), IL-1 β та TNF- α відіграє активування NF- κ B. Як правило, цитокіни та фактори росту самі по собі спричиняють значно слабшу індукцію HIF-1 α порівняно з гіпоксією, проте вони можуть істотно підсилювати ефект гіпоксії на експресію багатьох генів.

Послідовності, що беруть участь у регулюванні експресії генів в умовах гіпоксії

Ще у 1995 р. на основі аналізу відомих на той час 12 різних промоторних елементів відповіді на гіпоксію (HRE) було запропоновано консенсусну послідовність 5'-BACGTSSK-3' (B=G/C/T; S=G/C; K=G/T) [72]. Пізніше стало зрозумілим, що HRE можуть міститися у промоторах або енхансерах відповідних генів та складаються з «ядра», тобто послідовності 5'-RCGTG-3' (R=A/G), та дуже варіабельних фланкуючих елементів [73]. У той час як дослідження останнього десятиліття суттєво покращили розуміння основних механізмів, що регулюють активність та стабільність HIF-1, функціональне значення структурних особливостей HRE залишається малозрозумілим [5]. Перш за все, далеко не всі послідовності 5'-RCGTG-3', що входять до складу регуляторних ділянок генів, можуть слугувати елементами відповіді на гіпоксію. Крім того, ендегенні HRE, що входять до складу різних генів, можуть значніше відрізнятися один від одного, ніж це є характерним для більшості сайтів зв'язування інших транскрипційних факторів. Оскільки мультимери HRE стимулюють експресію репортерних генів, було виявлено, що окремі ендегенні послідовності HRE відрізняються за здатністю підвищувати експресію генів в умовах гіпоксії [74]. Ймовірно, що фланкуючі послідовності HRE відіграють певну «допоміжну» функцію, оскільки аналіз функціонально активних HRE показав, що крім нуклеотидів «ядра» деякі нуклеотидні позиції у фланкуючих послідовностях розподілені не випадково [73]. Інший механізм полягає в тому, що стан метилювання динуклеотиду CpG у складі «ядра» впливає на здатність HRE зв'язувати HIF-1, що було показано для гена еритропоєтину [75].

Хоча гіпоксія активує HIF-1 практично в усіх органах та тканинах, експресія «генів-мішеней» регулюється залежно від типу клітин. Це можливо завдяки тому, що специфічна взаємодія HIF-1 з іншими транскрипційними факторами визначає набір генів, експресія яких стимулюється за дії гіпоксії в кожному окремому типі клітин. Транскрипційні фактори, що зв'язуються з послідовностями, які безпосередньо прилягають до «ядра» HRE, та можуть модулювати кисеньзалежну експресію генів, самі не обов'язково є індукованими гі-

поксією. Було показано, що HIF взаємодіє з низкою транскрипційних факторів, зокрема ATF-1 та CREB-1 в промоторі лактатдегідрогенази А, факторами, що зв'язують AP-1, у промоторі VEGF, HNF-4 (hepatic nuclear factor 4) в енхансері еритропоетину та SP1 у промоторі CA9 [5]. Для повної індукції експресії деяких генів за дії гіпоксії крім HRE потрібна послідовність HAS (HIF-1 ancillary sequence), регуляторний елемент, розташований на відстані 8–9 пар нуклеотидів від «ядра» HRE [76]. Послідовність HAS є неповним інвертованим повтором послідовності HRE та зв'язує протеїнові комплекси, відмінні від HIF-1.

Послідовність HRE може бути частиною паліндромної послідовності 5'-CACGTG-3' («E-бокс»), яку впізнають фактори транскрипції, що містять домен bHLH-zip (лейцинова застібка), такі як c-Myc, Max чи USF (upstream stimulatory factors) [77]. Завдяки цьому між HIF-1 і протеїнами родини bHLH-zip можливе змагання за зв'язування з тими самими промоторними послідовностями, що може призводити до пригнічення кисеньзалежного стимулювання експресії відповідних генів [78]. Наприклад, таке змагання між факторами HIF-1 і c-Myc відповідає за регуляцію експресії гена α -фетопротеїну в умовах гіпоксії [79]. Також було встановлено, що конкуренція між USF-2 й HIF-1 α за зв'язування з суміжними HRE у промоторі PAI-1 може відігравати роль у модулюванні експресії гена PAI-1 за різних концентрацій кисню [80].

Гени, експресія яких змінюється за умов гіпоксії

Список відомих генів, експресія яких активується за дії HIF-1, постійно збільшується, і серед них можна виділити декілька груп залежно від їхньої ролі в процесах захисту клітин від нестачі кисню [5, 13, 81] (таблиця). Продукти генів однієї групи підвищують доступність кисню, посилюючи гематопоез чи впливаючи на формування та функціонування кровоносної системи. Класичним представником цієї групи є еритропоетин [7, 8] – протеїн, що стимулює проліферацію клітин-попередників еритроїдного ряду та дозрівання еритроцитів. Крім еритропоетину, HIF-1 стимулює експресію протеїнів, що беруть участь у транспортуванні та обміні заліза (трансферин, рецептор трансферину), що також призводить до посилення еритропоезу [82]. Більш того, продукти генів, які індукуються за дії HIF-1, стимулюють ангиогенез (VEGF [9] та його рецептор Flt-1 [83]), регулюють фібриноліз (на-

приклад, інгібітор активатора плазміногену-1 [80, 84]) та процеси розширення й звуження судин (наприклад, індукцибельна NO-синтаза, inducible nitric oxide synthase [85]).

До іншої групи генів, експресія яких індукується за дії гіпоксії, належать гени, продукти яких беруть участь в енергетичному обміні. Це, перш за все, ензими гліколізу та деякі транспортери глюкози [10, 11, 86]. Їхня скоординована дія спричинює посилене надходження глюкози до клітин та перехід до гліколізу як головного джерела енергії у клітині. Ще одну групу становлять гени, продукти яких регулюють проліферацію та виживання клітин, зокрема інсуліноподібний фактор росту-2 (IGF-2, insulin-like growth factor 2), антиапоптотичний протеїн bcl-2 та протеїн-онкосупресор p53 [5, 13]. Гени, експресія яких індукується в умовах гіпоксії, відіграють роль також в інших внутрішньоклітинних процесах, наприклад, в регуляції гомеостазу pH (карбоангідраза-9) та метаболізмі ксенобіотиків (протеїн, що зумовлює множинну резистентність до лікарських препаратів MDR1, multidrug resistance 1) [6, 13]. Нарешті, HIF-1 активує експресію деяких транскрипційних факторів (DEC 1 і 2, ETS-1), які роблять внесок у посилення експресії інших генів в умовах гіпоксії [5].

Відомо, що в умовах «суворої» гіпоксії (менше 1% $O_2 \cong 7$ мм Hg) має місце неспецифічне пригнічення експресії більшості генів за допомогою механізму, що включає активування кінази PERK (protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase) та фосфорилування фактора ініціації трансляції eIF2 α [87]. Водночас, у разі «помірної» гіпоксії (більше 1% O_2) на фоні незмінної експресії переважної більшості генів існують гени, експресія яких є або вищою, або нижчою порівняно з такою в умовах нормоксії [88]. До генів, експресія яких є активованою в умовах нормоксії порівняно з «помірною» гіпоксією, належать, зокрема, гени активаторів плазміногену, гепцидину та транспортеру глюкози GLUT-2 [89–91]. Ще «м'якші» умови гіпоксії (близько 8% O_2) спостерігаються, зокрема, за фізіологічних умов у печінці та нирках. Зручним експериментальним об'єктом дослідження ефектів «м'якої» гіпоксії на експресію генів є клітини печінки, оскільки специфічні особливості кровопостачання цього органу призводять до формування в ньому градієнта концентрації кисню. Тиск кисню в гепатоцитах, розташованих вздовж печінкової синусоїди, змінюється в межах від 60–65 мм Hg (перипортальна зона біля закінчень ворітної вени та печінкової ар-

Деякі гени, експресія яких змінюється залежно від вмісту кисню

| Процеси | Гени, експресія яких індуквана за умов гіпоксії | Гени, експресія яких пригнічена за умов гіпоксії |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Гематопоез | Еритропоетин | |
| Ангіогенез | Фактор росту ендотеліальних клітин судин (VEGF) Flt-1 (рецептор VEGF) Ангіопоетини | |
| Транспорт та обмін заліза | Трансферин Рецептор трансферину | Гепцидин |
| Фібриноліз | Інгібітор активатора плазміногену-1 (PAI-1) | Активатори плазміногену |
| Розширення/ звуження судин | Індуцибельна NO синтаза (iNOS) | |
| Метаболізм вуглеводів | Транспортер глюкози-1 (GLUT-1) Транспортер глюкози-3 (GLUT-3) Альдолаза А Глюкокіназа (GK) Фосфогліцераткіназа-1 (PGK-1) Піруваткіназа L (PK _L) Піруваткіназа M (PK _M) 6-фосфофрукто-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатаза (PFKFB-1-4) | Фосфоенолпіруваткарбоккіназа-1 (PCK-1) Транспортер глюкози-2 (GLUT-2) |
| Метаболізм амінокислот | | Сериндегідратаза Тирозинамінотрансфераза |
| Проліферація та виживання | Інсуліноподібний фактор росту-2 (IGF-2) p53 bcl-2 | Рецептори, що активуються проліфераторами пероксисом (PPAR) |
| Антиоксидантний захист | | Глутатіонпероксидаза Каталаза Супероксиддисмутизи |
| Інші процеси | Карбоангідраза 9 Протеїн, що зумовлює множинну резистентність до лікарських препаратів (Multidrug resistance 1, MDR1) | |

терії; умови нормоксії) до 30–35 мм Hg (перивенозна зона біля закінчень центральної вени; умови «м'якої» гіпоксії) [2]. Різні концентрації кисню є одним із ключових факторів, відповідальних за відмінності в експресії низки генів, що кодують ензими, рецептори чи молекули транспортерів, між гепатоцитами, розташованими в перипортальній і перивенозній зонах [2]. Наприклад, ензими, що контролю-

ють гліколіз, такі як глюкокіназа і піруваткіназа (ПК), а також всі три α -субодиниці HIF експресуються переважно в перивенозній зоні [2, 92], тоді як ферменти гліоконеогенезу (наприклад, фосфоенолпіруваткарбоккіназа-1 PCK-1, phosphoenolpyruvate carboxykinase-1), амінокислотного метаболізму (тирозинамінотрансфераза TAT, tyrosine aminotransferase; сериндегідратаза SerDH, serine dehydratase) та

ключовий ензим уреазенезу карбамоїлфосфатсинтетаза (CPS, carbamoylphosphate synthetase) сильніше експресовані в перипортальній зоні [2].

Стимуляція експресії генів у перивенозній зоні печінкової синусоїди, для якої є характерними умови гіпоксії, пояснюється головним чином дією HIF-1. Водночас, механізми вибіркової стимуляції експресії генів у перипортальній зоні синусоїди, тобто посилення експресії в умовах нормоксії порівняно з гіпоксією, є практично невідомими. Описано одиничні випадки прямого або опосередкованого інгібування експресії генів за дії HIF-1, зі зняттям цього інгібування за нормоксії [93, 94]. Зокрема, зв'язування HIF-1 α з послідовністю HRE у промоторі рецептора, активованого проліфератором пероксисом- α (PPAR- α , peroxisome proliferator-activated receptor- α), призводить до пригнічення його експресії в умовах м'якої гіпоксії (8% O₂) порівняно з нормоксією (21% O₂) [93]. Ще одним механізмом пригнічення експресії генів під дією кисню є конкуренція між HIF-1 та транскрипційним фактором Мус за зв'язування з одними й тими ж промоторними послідовностями, що може призводити до HIF-залежного пригнічення експресії Мус-стимульованих генів [95]. З іншого боку, у промоторах багатьох генів, індукованих нормоксією, не виявлено функціональних сайтів зв'язування HIF-1, тому безпосередня участь HIF-1 в регулюванні їхньої експресії здається малоімовірною. Існують дослідження, які вказують на роль промоторних послідовностей, відмінних від HRE, у стимуляції експресії генів в умовах нормоксії порівняно з гіпоксією. Зокрема, показано, що декілька гомологічних між собою послідовностей у промоторах генів фосфоенолпіруваткарбоксикінази-1 (5'-TTAGGTCAG-3') та сериндегідратази (5'-TGAGGACAG-3' й 5'-TTATGTGAG-3'), які отримали назву елементів відповіді на нормоксію (normoxia responsive element, NRE), відповідають за посилену експресію цих генів за нормоксії в первинних гепатоцитах щура, клітинах HeLa і HepG2 [96, 97]. Описано також два елементи відповіді на кисень (oxygen responsive elements, ORE), що відповідають за індукцію гена глутатіонпероксидази за нормоксії (5'-CCTCAAAGAAAGT-3' та 5'-CCTCTGAGAAAAA-3') в кардіоміоцитах людини [98]. Транскрипційним фактором, який зв'язується з послідовностями ORE, є антиген Ku [99]. Послідовності NRE не є гомологічними до ORE й тому, судячи з усього, зв'язують інші регуляторні протеїни. Таким чином, ще не ві-

домо, чи існує загальний механізм підсилення експресії генів в умовах нормоксії, подібний до механізму, описаного для гіпоксії.

Для ішемічних захворювань серця та мозку, а також багатьох онкологічних захворювань характерним є знижене постачання кисню до тканин. Відомо, що 50–60% солідних пухлин людини містять ділянки, які зазнають гіпоксії або аноксії. Причиною цього є як зростання об'єму пухлини, що збільшує відстань до кровоносних судин, так і посилена метаболічна активність ракових клітин [6]. Рівні як HIF-1 α , так й HIF-2 α підвищені в багатьох типах пухлин людини, при цьому вони корелюють з поганим прогнозом перебігу захворювання. В пухлинах має місце як активація HIF за дії внутрішньопухлинної гіпоксії, так і посилення стабільності чи активності HIF в умовах нормоксії внаслідок генетичних змін. Наприклад, зумовлена мутаціями інактивація протеїну VHL, що супроводжується стабілізацією HIF, призводить до розвитку хвороби Гіппеля-Ліндау (von Hippel Lindau, VHL), яка характеризується утворенням високоваскуляризованих пухлин.

HIF стимулює декілька адаптивних процесів, які посилюють ріст пухлин та їхню здатність до інвазії й метастазування [3, 4]. Значно рідшими є випадки, при яких HIF пригнічує ріст пухлин [100]. Вважається, що HIF може мати антипухлинні властивості завдяки зниженню проліферації та посиленню апоптозу, хоча ці ефекти спостерігаються на фоні посиленого ангиогенезу [3]. Протягом останніх років розроблено декілька потенційних лікарських препаратів, таких як низькомолекулярні інгібітори HIF-1, що можуть пригнічувати ріст пухлин, впливаючи на HIF-залежну регуляцію експресії генів [4]. Більш того, показано, що пригнічення HIF-1 посилює чутливість ракових клітин до радіотерапії [4]. Подальші дослідження необхідні для того, щоб визначити, які саме пухлини найкраще відповідають на дію речовин, що пригнічують HIF, а також для розробки комплексних підходів до антипухлинної терапії з використанням інгібіторів HIF.

Висновки

Транскрипційні фактори родини HIF відіграють центральну роль у клітинній відповіді на гіпоксію і тому є необхідними для виживання практично всіх типів клітин вищих тваринних організмів від *Caenorhabditis elegans* до *Homo sapiens*. Хоча існують дані, що гіпоксія стимулює експресію α -субодиниць HIF,

внутрішньоклітинний вміст HIF регулюється головним чином на посттрансляційному рівні шляхом стабілізації протеїну. В умовах нормоксії новосинтезовані α -субодиниці HIF швидко деградують через дію ензимів, що забезпечують їхнє гідроксилування за залишками проліну та наступне убіквітилювання. Коли внутрішньоклітинний вміст кисню знижується, процеси гідроксилування пригнічуються, α -субодиниці HIF нагромаджуються у клітині, транслокуються до ядра й формують там комплекси з β -субодиницями, що конститутивно експресуються у клітині. Крім механізму, що зумовлює деградацію HIF α в умовах нормоксії, існує також інший механізм, який посилює його транскрипційну активність за гіпоксії. Він полягає у зв'язуванні активатора транскрипції p300/CBP з α -субодиницями HIF. В умовах нормоксії це зв'язування не відбувається через кисеньзалежне гідроксилування певних залишків аспарагіну, що розташовані в α -субодиницях HIF.

Хоча гіпоксія вважається головним фактором, що визначає функціонування HIF, багато «негіпоксичних» стимулів та внутрішньоклітинних сигнальних шляхів можуть впливати, прямо або опосередковано, на його транскрипційну активність, стабільність, міжпротеїнові взаємодії та внутрішньоклітинну локалізацію. Існують численні дані, що за дії гіпоксії та багатьох інших факторів HIF-1 α зазнає різноманітних посттрансляційних модифікацій, зокрема фосфорилування, ацетилювання, S-нітрозилювання та SUMOїлювання. Водночас ці повідомлення часто є суперечливими, і, за винятком гідроксилування залишків проліну та аспарагіну, серед посттрансляційних модифікацій найкраще вивчено внесок фосфорилування HIF-1 α за дії компонентів MAPK та PI3K/Akt сигнальних шляхів.

Активний димер HIF зв'язується з послідовностями HRE у промоторах або енансерах генів, що індукуються гіпоксією. Функціональне значення структурних характеристик HRE, а також особливості взаємодії HIF-1 з іншими транскрипційними факторами все ще залишаються недостатньо вивченими. Так само малозрозумілою є роль таких промоторних послідовностей як ORE та NRE в регулюванні експресії генів у разі «м'якої» гіпоксії порівняно з нормоксією.

Продукти генів, експресія яких стимулюється в умовах гіпоксії, беруть участь у регулюванні гематопоезу, ангиогенезу, фібринолізу, гліколізу та багатьох інших процесів. Посилення експресії тих чи інших генів за дії HIF може мати як позитивне, так і негатив-

не значення для цілого організму, залежно від конкретних умов. Зокрема, розробка фармакологічних підходів до пригнічення активності HIF може мати терапевтичне значення в лікуванні онкологічних захворювань.

РОЛЬ ПРОТЕИНОВ СЕМЕЙСТВА HIF (HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR) В РЕГУЛЯЦИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОТВЕТОВ КЛЕТКИ НА ГИПОКСИЮ

A. A. Samoylenko

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: toljas@yahoo.com

Обзор посвящен описанию роли протеинов семейства HIF (hypoxia-inducible factor) в регулировании экспрессии генов млекопитающих в условиях гипоксии. Описаны особенности строения α - и β -субъединиц HIF, механизмы регулирования стабильности и активности HIF путем гидроксирования. Особое внимание уделено механизмам регулирования содержания и транскрипционной активности HIF при помощи фосфорилирования и других посттрансляционных модификаций. Рассмотрена роль гормонов, цитокинов и факторов роста в стимулировании HIF в условиях нормоксии. Представлены данные о генах-мишенях действия HIF, а также о промоторных и энхансерных последовательностях, которые принимают участие в регулировании экспрессии генов при различном внутриклеточном содержании кислорода.

Ключевые слова: гипоксия, факторы, индуцируемые гипоксией, гидроксирование, фосфорилирование.

THE ROLE OF HYPOXIA-INDUCIBLE PROTEIN FAMILY (HIF) IN THE REGULATION OF CELLS PHYSIOLOGIC RESPONSES TO HYPOXIA

A. A. Samoylenko

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: toljas@yahoo.com

Summary

The review is devoted to the role of hypoxia-inducible factors (HIF) in the regulation of oxygen-dependent gene signalling. Structural features of HIF α and β subunits as well as involvement of hydroxylation in the regulation of HIF stability and activity are described. Special attention is given to

the role of phosphorylation and other post-translational modifications in the regulation of HIF expression and activity. The survey considers the involvement of hormones, cytokines and growth factors in HIF stimulation under normoxia. HIF target genes and promotor/enhancer sequences, responsible for oxygen-dependent gene regulation, are also described.

Key words: hypoxia, hypoxia inducible factors, hydroxylation, phosphorylation.

1. *Bunn H. F., Poyton R. O.* // *Physiol. Rev.* – 1996. – **76**, N 3. – P. 839–885.
2. *Jungermann K., Kietzmann T.* // *Hepatology.* – 2000. – **31**, N 2. – P. 255–260.
3. *Rankin E. B., Giaccia A. J.* // *Cell Death Differ.* – 2008. – **15**, N 4. – P. 678–685.
4. *Semenza G. L.* // *Oncogene.* – 2010. – **29**, N 5. – P. 625–634.
5. *Kaluz S., Kaluzová M., Stanbridge E. J.* // *Clin. Chim. Acta.* – 2008. – **395**, N 1–2. – P. 6–13.
6. *Brahimi-Horn C., Pouyssegur J.* // *J. Cell Sci.* – 2009. – **122**, N 8. – P. 1055–1057.
7. *Goldberg M. A., Dunning S. P., Bunn H. F.* // *Science.* – 1988. – **242**, N 4884. – P. 1412–1415.
8. *Jiang B. H., Rue E., Wang G. L. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 1996. – **271**, N 30. – P. 17771–17778.
9. *Forsythe J. A., Jiang B. H., Iyer N. V. et al.* // *Mol. Cell. Biol.* – 1996. – **16**, N 9. – P. 4604–4613.
10. *Loike J. D., Cao L., Brett J. et al.* // *Am. J. Physiol.* – 1992. – **263**, N 2 Pt. 1 – P. 326–333.
11. *Semenza G. L., Jiang B. H., Leung S. W. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 1996. – **271**, N 51. – P. 32529–32537.
12. *Semenza G. L., Wang G. L.* // *Mol. Cell. Biol.* – 1992. – **12**, N 12. – P. 5447–5454.
13. *Zagyrska A., Dulak J.* // *Acta Biochim. Pol.* – 2004. – **51**, N 3. – P. 563–585.
14. *Wang G. L., Jiang B. H., Rue E. A., Semenza G. L.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – **92**, N 12. – P. 5510–5514.
15. *Jiang B. H., Zheng J. Z., Leung S. W. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**, N 31. – P. 19253–19260.
16. *Pugh C. W., O'Rourke J. F., Nagao M. et al.* // *Ibid.* – N 17. – P. 11205–11214.
17. *Ema M., Hirota K., Mimura J. et al.* // *EMBO J.* – 1999. – **18**, N 7. – P. 1905–1914.
18. *Maltepe E., Schmidt J. V., Baunoch D. et al.* // *Nature.* – 1997. – **386**, N 6623. – P. 403–407.
19. *Kozak K. R., Abbott B., Hankinson O.* // *Dev. Biol.* – 1997. – **191**, N 2. – P. 297–305.
20. *Kotch L. E., Iyer N. V., Laughner E., Semenza G. L.* // *Dev. Biol.* – 1999. – **209**, N 2. – P. 254–267.
21. *Hogenesch J. B., Chan W. K., Jackiw V. H. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**, N 13. – P. 8581–8593.
22. *Gu Y. Z., Moran S. M., Hogenesch J. B. et al.* // *Gene Expr.* – 1998. – **7**, N 3. – P. 205–213.
23. *Compernelle V., Brusselmans K., Acker T. et al.* // *Nat. Med.* – 2002. – **8**, N 7. – P. 702–710.
24. *Heidbreder M., Fröhlich F., Jöhren O. et al.* // *FASEB J.* – 2003. – **17**, N 11. – P. 1541–1543.
25. *Makino Y., Cao R., Svensson K. et al.* // *Nature.* – 2001. – **414**, N 6863. – P. 550–554.
26. *Hirose K., Morita M., Ema M. et al.* // *Mol. Cell. Biol.* – 1996. – **16**, N 4. – P. 1706–1713.
27. *Cowden K. D., Simon M. C.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – **290**, N 4. – P. 1228–1236.
28. *Semenza G. L.* // *Exp. Physiol.* – 2006. – **91**, N 5. – P. 803–806.
29. *Maxwell P. H., Wiesener M. S., Chang G. W. et al.* // *Nature.* – 1999. – **399**, N 6733. – P. 271–275.
30. *Jewell U. R., Kvietikova I., Scheid A. et al.* // *FASEB J.* – 2001. – **15**, N 7. – P. 1312–1314.
31. *Epstein A. C., Gleadle J. M., McNeill L. A. et al.* // *Cell.* – 2001. – **107**, N 1. – P. 43–54.
32. *Bruick R. K., Mcknight S. L.* // *Science.* – 2001. – **294**, N 5545. – P. 1337–1340.
33. *Jaakkola P., Mole D. R., Tian Y. M. et al.* // *Ibid.* – **292**, N 5516. – P. 468–472.
34. *Ivan M., Kondo K., Yang H. et al.* // *Ibid.* – P. 464–468.
35. *Masson N., Willam C., Maxwell P. H. et al.* // *EMBO J.* – 2001. – **20**, N 18. – P. 5197–5206.
36. *Kallio P. J., Okamoto K., O'Brien S. et al.* // *EMBO J.* – 1998. – **17**, N 22. – P. 6573–6586.
37. *Lando D., Peet D. J., Gorman J. J. et al.* // *Genes Dev.* – 2002. – **16**, N 12. – P. 1466–1471.
38. *Freedman S. J., Sun Z. Y., Poy F. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – **99**, N 8. – P. 5367–5372.
39. *Hewitson K. S., McNeill L. A., Riordan M. V. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, N 29. – P. 26351–26355.
40. *Kietzmann T., Roth U., Freimann S., Jungermann K.* // *Biochem. J.* – 1997. – **321**, N 1. – P. 17–20.
41. *Wilson D. F., Mokashi A., Chugh D. et al.* // *FEBS Lett.* – 1994. – **351**, N 3. – P. 370–374.

42. Baysal B. E., Ferrell R. E., Willett-Brozick J. E. et al. // *Science*. – 2000. – **287**, N 5454. – P. 848–851.
43. Cross A. R., Henderson L., Jones O. T. et al. // *Biochem. J.* – 1990. – **272**, N 3. – P. 743–747.
44. Fu X. W., Wang D., Nurse C. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2000. – **97**, N 8. – P. 4374–4379.
45. Wiener C. M., Booth G., Semenza G. L. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – **225**, N 2. – P. 485–488.
46. Gorlach A., Camenisch G., Kvietikova I. et al. // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2000. – **1493**, N 1–2. – P. 125–134.
47. Pascual O., Denavit-Saubie M., Dumas S. et al. // *Eur. J. Neurosci.* – 2001. – **14**, N 12. – P. 1981–1991.
48. Gross J., Rheinlander C., Fuchs J. et al. // *Hear. Res.* – 2003. – **183**, N 1–2. – P. 73–83.
49. Bergeron M., Yu A. Y., Solway K. E. et al. // *Eur. J. Neurosci.* – 1999. – **11**, N 12. – P. 4159–4170.
50. Webb J. D., Coleman M. L., Pugh C. W. // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2009. – **66**, N 22. – P. 3539–3554.
51. Dimova E. Y., Michiels C., Kietzmann T. // *Curr. Pharm. Des.* – 2009. – **15**, N 33. – P. 3867–3877.
52. Sodhi A., Montaner S., Patel V. et al. // *Cancer Res.* – 2000. – **60**, N 17. – P. 4873–4880.
53. Kwon S. J., Song J. J., Lee Y. J. // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – **11**, N 21. – P. 7607–7613.
54. Richard D. E., Berra E., Gothie E. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1999. – **274**, N 46. – P. 32631–32637.
55. Flugel D., Gorlach A., Michiels C., Kietzmann T. // *Mol. Cell. Biol.* – 2007. – **27**, N 9. – P. 3253–3265.
56. Sodhi A., Montaner S., Miyazaki H., Gutkind J. S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – **287**, N 1. – P. 292–300.
57. Mottet D., Dumont V., Deccache Y. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**, N 33. – P. 31277–31285.
58. Gradin K., Takasaki C., Fujii-Kuriyama Y., Sogawa K. // *Ibid.* – 2002. – **277**, N 26. – P. 23508–23514.
59. Lisy K., Peet D. J. // *Cell Death Differ.* – 2008. – **15**, N 4. – P. 642–649.
60. Jeong J. W., Bae M. K., Ahn M. Y. et al. // *Cell*. – 2002. – **111**, N 5. – P. 709–720.
61. Bilton R., Mazure N., Trottier E. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – **280**, N 35. – P. 31132–31140.
62. Arnesen T., Kong X., Evjenth R. et al. // *FEBS Lett.* – 2005. – **579**, N 28. – P. 6428–6432.
63. Yasinska I. M., Sumbayev V. V. // *Ibid.* – 2003. – **549**, N 1–3. – P. 105–109.
64. Cho H., Ahn D. R., Park H., Yang E. G. // *FEBS Lett.* – 2007. – **581**, N 8. – P. 1542–1548.
65. Bae S. H., Jeong J. W., Park J. A. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – **324**, N 1. – P. 394–400.
66. Carbia-Nagashima A., Gerez J., Perez-Castro C. et al. // *Cell*. – 2007. – **131**, N 2. – P. 309–323.
67. Berta M. A., Mazure N., Hattab M. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – **360**, N 3. – P. 646–652.
68. Hopfer U., Hopfer H., Jablonski K. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**, N 13. – P. 8645–8655.
69. Jung F., Haendeler J., Hoffmann J. et al. // *Circ. Res.* – 2002. – **91**, N 1. – P. 38–45.
70. Samoylenko A., Dimova E. Y., Kozłova N. et al. // *Thromb. Haem.* – 2010. – **103**, N 5. – P. 901–909.
71. Zhou J., Brüne B. // *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* – 2006. – **4**, N 3. – P. 189–197.
72. Kvietikova I., Wenger R. H., Marti H. H., Gassmann M. // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – **23**, N 22. – P. 4542–4550.
73. Wenger R. H., Stiehl D. P., Camenisch G. // *Sci. STKE*. – 2005. – **306**. – Re12.
74. Boast K., Binley K., Iqbal S. et al. // *Hum. Gene Ther.* – 1999. – **10**, N 13. – P. 2197–2208.
75. Wenger R. H., Kvietikova I., Rolfs A. et al. // *Eur. J. Biochem.* – 1998. – **253**, N 3. – P. 771–778.
76. Kimura H., Weisz A., Ogura T. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**, N 3. – P. 2292–2298.
77. Corre S., Galibert M. D. // *Pigment Cell Res.* – 2005. – **18**, N 5. – P. 337–348.
78. Swanson H. I., Yang J. H. // *Nucleic Acids Res.* – 1999. – **27**, N 15. – P. 3205–3212.
79. Mazure N. M., Chauvet C., Bois-Joyeux B. et al. // *Cancer Res.* – 2002. – **62**, N 4. – P. 1158–1165.
80. Samoylenko A., Roth U., Jungermann K., Kietzmann T. // *Blood*. – 2001. – **97**, N 9. – P. 2657–2666.
81. Weidemann A., Johnson R. S. // *Cell Death Differ.* – 2008. – **15**, N 4. – P. 621–627.
82. Rolfs A., Kvietikova I., Gassmann M., Wenger R. H. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**, N 32. – P. 20055–20062.

83. Gerber H. P., Condorelli F., Park J., Ferrara N. // *Ibid.* – N 38. – P. 23659–23667.
84. Kietzmann T., Roth U., Jungermann K. // *Blood.* – 1999. – **94**, N 12. – P. 4177–4185.
85. Melillo G., Musso T., Sica A. et al. // *J. Exp. Med.* – 1995. – **182**, N 6. – P. 1683–1693.
86. Minchenko O., Opentanova I., Caro J. // *FEBS Lett.* – 2003. – **554**, N 3. – P. 264–270.
87. Koumenis C., Naczki C., Koritzinsky M. et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 2002. – **22**, N 21. – P. 7405–7416.
88. Manalo D. J., Rowan A., Lavoie T. et al. // *Blood.* – 2005. – **105**, N 2. – P. 659–669.
89. Pinsky D. J., Liao H., Lawson C. A. et al. // *J. Clin. Invest.* – 1998. – **102**, N 5. – P. 919–928.
90. Park S. K., Haase V. H., Johnson R. S. // *Int. J. Oncol.* – 2007. – **30**, N 2. – P. 341–348.
91. Braliou G. G., Falzacappa M. V. V., Chachami G. et al. // *J. Hepatol.* – 2008. – **48**, N 5. – P. 801–810.
92. Kietzmann T., Cornesse Y., Brechtel K. et al. // *Biochem. J.* – 2001. – **354**, N 3. – P. 531–537.
93. Narravula S., Colgan S. P. // *J. Immunol.* – 2001. – **166**, N 12. – P. 7543–7548.
94. Yun Z., Maecker H. L., Johnson R. S., Giaccia A. J. // *Dev. Cell.* – 2002. – **2**, N 3. – P. 331–341.
95. Koshiji M., Kageyama Y., Pete E. A. et al. // *EMBO J.* – 2004. – **23**, N 9. – P. 1949–1956.
96. Bratke J., Kietzmann T., Jungermann K. // *Biochem. J.* – 1999. – **339**, N 3. – P. 563–569.
97. Самойленко А. А., Теплюк Н. М., Оболенська М. Ю., Кітцманн Т. // *Біополімери і клітина.* – 2007. – **23**, N 5. – С. 391–397.
98. Cowan D. B., Weisel R. D., Williams W. G., Mickle D. A. // *J. Biol. Chem.* – 1993. – **268**, N 36. – P. 26904–26910.
99. Merante F., Altamentova S. M., Mickle D. A. et al. // *Mol. Cell. Biochem.* – 2002. – **229**, N 1–2. – P. 73–83.
100. Carmeliet P., Dor Y., Herbert J. M. et al. // *Nature.* – 1998. – **394**, N 6692. – P. 485–490.

Отримано 21.05.2010