

UDC 57.053

Проблема «начала» – формулировка и попытка анализа

В. А. Кордюм¹, Н. С. Шувалова²

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680

²ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины»
Ул. Вышгородская, 67, Киев, Украина, 04114

riyena@yandex.ru

На примере дыхания сформулирована и проанализирована проблема «начала». Под «началом» подразумевается система молекулярного датчика и подаваемого на него молекулярного сигнала, с которых начинается последовательная цепь (каскад) молекулярных преобразований, приводящих в конце всего процесса к изменению фенотипа. В качестве «начала» выбраны лучшие всего изученные (в роли датчика) первые участники событий – молекулярный кислород, семейства белков PHD и HIF и непосредственно взаимодействующие с ними молекулы. Указывается также на наличие дополнительных и альтернативных систем. Существенным моментом всей регуляции является отсутствие систем сигналинга на повышение (сверх необходимого, т. е. гипероксию) концентрации молекулярного кислорода в клетке.

Ключевые слова: белки PHD и HIF, система сигналинга, молекулярный кислород.

Введение. Изучение клетки на молекулярном уровне позволило в деталях увидеть весь состав клетки, все ее макро- и немакромолекулы и даже синтезировать полноразмерный геном [1]. Сложность живого оказалась в пока не поддающемся анализу пересечении путей метаболизма, сигналинга, вариантов самосборки и всего этого во взаимодействии в реальных временных, пространственных и динамичных процессах в масштабах клетки. Надо понять, как при сложнейших регуляторных, метаболических и иных цепях, каскадах, при их непрерывных лабильных пересечениях все не превращается немедленно в полный хаос, а функционирует с той точностью и всем «само...», при которых внешние воздействия, способные разрушить сталь и бетон, для клетки являются «необходимой средой обитания». Одной из наиболее продуктивных и уже во многом успешных попыток разобраться в этом послужила идея существования, а затем эксперимен-

тальной идентификации особых «ключевых точек», участков, где пересекаются многие пути регуляции, метаболизма и энергетики. Их изучение показало, что такие точки действительно есть, и они действительно в определенной мере «ключевые». На них результируют, через них проходят, их пересекают столько разных цепей и каскадов, что понять, почему такие «точки» в одних случаях что-то разрешают, в других – запрещают, а в третьих – вообще никак не регулируют, пока не удастся. Идет обычный для науки поиск. Но можно вопрос о том, что такое «ключевое?», поставить иначе. Искать не только, где все (многое) пересекается, а найти то, с чего все (многое) начинается. Не то, что служит коммутатором, многофункциональным переключателем. А то, что является первичным «включателем–выключателем», регулятором уровня, датчиком, сенсором. То, что определяет норму нарушения (патологию) и передает сигнал для поддержания уровня – нормального или патологического. В общей форме – это формулировка некоего положе-

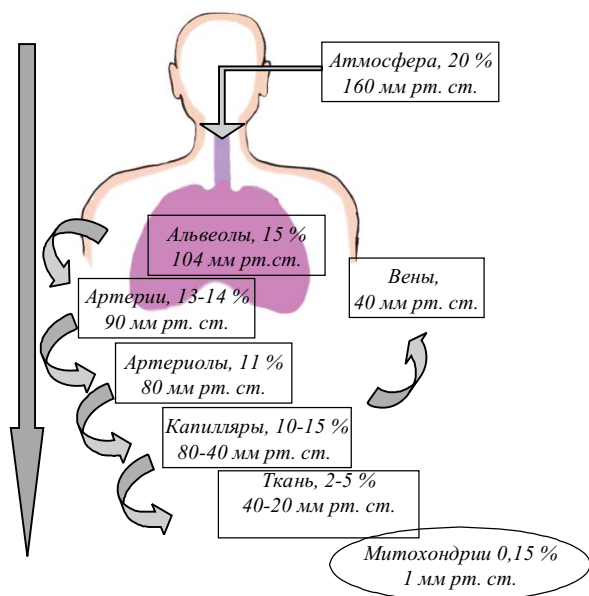


Рис. 1. Схема падения концентрации кислорода в организме

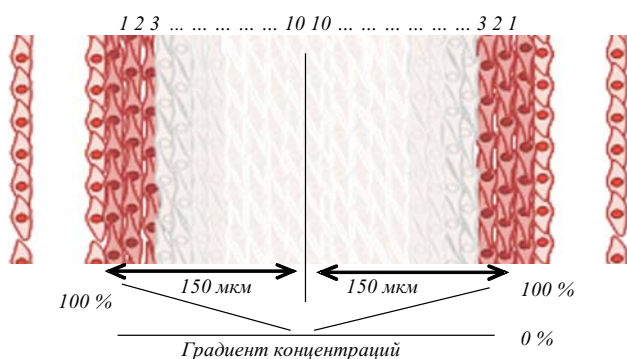


Рис. 2. Градиент концентраций кислорода вокруг капилляра

ния, согласно которому в живом есть «датчик уровня» какого-то продукта, метаболита, фактора, с чего начинается процесс. И выяснить, как он, датчик, воспринимает сигнал и что есть «уровень», который надо держать, и как он держится. Что есть «сигнал» и как он передается, куда, каким путем и что при этом происходит? Такая проблема и вопросы, возникающие при ее формулировке, требуют конкретизации на каком-то примере.

Конкретизация примера. В качестве примера выбран один из ключевых процессов – дыхание – многоуровневая система событий всех степеней сложности. Начинается оно с потребления кислорода. Дыхание изучено лучше других процессов. Но при его анализе с позиций не процесса как такового, а в связи со сформулированной проблемой «на-

чала», исключающей «всеобщность» и обеспечивающей строгую упорядоченность, позволяющую понять это «начало», все обстоит намного сложнее. У человека доставка кислорода из атмосферы к клеткам включает в себя ряд событий: прохождение кислорода (в составе атмосферы) по альвеолам, пассивная диффузия в легочные капилляры, связывание с гемоглобином, движение по сосудам, диффузия из микроциркуляторного русла через межклеточный матрикс и мембраны клеток, а внутри клеток – это события, связанные с поступлением кислорода к митохондриям. Содержание его по сравнению с атмосферным ($\approx 21\%$, 160 мм рт. ст.) постепенно снижается сначала в легких, потом, по мере прохождения крови по альвеолярным капиллярам, падает до 104 мм. рт. ст. (приблизительно 15%), усредненно в сосудах тканей достигает 20 мм. рт. ст. и уже в капиллярах остается на уровне (в среднем) 3%, хотя значения могут колебаться от 2 до 5% в зависимости от плотности расположения капилляров, уровня функциональной активности тканей и т. д. (рис. 1) [2]. Ткань – это сложная многоклеточная структура. И общее содержание в ней кислорода может представлять собой только усредненную (хотя и количественную) величину. Но даже в «общем» содержание кислорода по тканям существенно различается. Например, в сетчатке глаза оно составляет 25 мм. рт. ст., в селезенке крысы – 16 мм. рт. ст. (2%), в тимусе – 10 мм. рт. ст. (1,3%) [3]. Ткани мозга крысы характеризуются еще более низкими значениями – 4–8 мм. рт. ст. и т. д. [4]. И все это еще зависит от места измерения. Внутри тканей происходит дальнейшее перераспределение – между клетками, что обусловлено, в свою очередь, структурной организацией ткани. Расстояние между капиллярами в различных тканях, по данным разных авторов, колеблется в пределах 200–300 мкм. Это связано с тем, что на расстоянии 100–150 мкм от поверхности капилляра концентрация кислорода падает до нуля [4] (рис. 2). С учетом (очень условно и очень усредненно) распределения клеток (диаметра, поперечника оси между соседними капиллярами и т. д.) в зоне от стенки одного капилляра до другого находится 10–15 слоев клеток. Дальнейшие события разворачиваются уже внутри клетки – в цитоплазме, т. е. там, где и происходит потребление кислорода,

составляющее примерно 2,5–0,5 %. Но и в цитоплазме существуют градиенты. В результате в митохондриях (т. е. там, где идет 90 % потребления всего кислорода, усваиваемого организмом) содержание кислорода составляет $\approx 0,15$ %. Но это все – если исходить из оптимальных условий. Такое распределение кислорода обусловлено многоуровневой регуляцией: состоянием и функционированием легких; количеством эритроцитов и содержанием в них гемоглобина; процессами освобождения кислорода из гемоглобина; очень непростой мембраной эритроцитов, отделяющей внутриэритроцитарные события от плазмы крови, куда непосредственно должен поступать из эритроцитов кислород; жидкой фазой крови, являющейся первым этапом непосредственной внеэритроцитарной передачи кислорода; стенкой капилляра – очень динамичной и необычной структурой; слоями клеток ткани. Концентрация кислорода в клетке – это та нулевая точка отсчета, с которой начинаются звенья, цепи, каскады, энергетика, метаболизм, регуляция, сигналинг и прочее, связанное с кислородом. Как же это происходит – переход от «нулевой точки отсчета» к «началу»?

Подход к решению. История изучения того, что постепенно стало отражением сегодняшнего уровня познания проблемы, очень интересна. Но она – предмет иного анализа или обзора. И чтобы упростить изложение, далее все будет рассмотрено не в хронологическом порядке, а в том виде, который максимально конкретно может проиллюстрировать «начало». «Начало» оказалось уже с самого начала необычным. Выше описана динамика снижения уровня кислорода по мере его продвижения к клеткам тканей. И то, что их достигает, оказывается настолько небольшим, что в природе, в естественных условиях, даже самых необычных и экстремальных, избытка кислорода на уровне клеток, его потребляющих, никогда не бывает. В атмосфере содержится ≈ 21 % кислорода. На весь организм млекопитающего, на все его органы, ткани и составляющие их клетки приходится только одна пара легких (поступление газов через кожу очень невелико). Газообмен идет с кровью, а насыщать надо гемоглобин, находящийся внутри эритроцитов. Кислород он отдает не весь (работают законы физхимии). Далее идут градиенты падения концентраций, описанные

выше. Кислородных подушек в природе не существует, кислородных палаток – тоже. Поэтому настраивать жизненные процессы на избыток кислорода млекопитающим никогда не надо было. И регуляция процессов на избыток кислорода в клетках млекопитающих отсутствует из-за эволюционной и экологической невостремованности. А вот недостаток кислорода возникает часто (норы, ямы, пещеры, неудобное положение тела, очень высокая физическая нагрузка, болезненные состояния, стрессы и пр.). В клетках млекопитающих центральным и основным непосредственным датчиком, сенсором, чувствительным элементом является фермент, получивший исторически название «пролилгидроксилазный домен» – PHD.

А субстратом его реакции является «фактор, индуцированный гипоксией» – HIF. С этой реакции (или ее отсутствия!) начинается длинная цепочка последующих молекулярных событий. Но первый этап – это наличие в области взаимодействия четырех ключевых компонентов: молекулы свободного кислорода – O_2 («точка отсчета»), молекулы 2-оксоглутарата (молекула из митохондрий, контролирующая процесс), молекулы PHD («сенсор», «датчик уровня») и молекулы HIF (первая молекула передачи «сигнала уровня»). Критичной для реакции является концентрация свободного кислорода, а дополнительным контролем – концентрация 2-оксоглутарата.

PHD принадлежит к семейству 2-оксоглутарат-зависимых гидроксилаз, содержащих негемовое железо в каталитическом центре [5]. Его схематическая структура представлена на рис. 3. PHD2 состоит из 462 аминокислотных остатков (а. о.). Вторичная структура, возможно, содержит два структурных домена [6]. N-концевой домен (а. о. 21–58) гомологичен домену MYND. Вероятно, он ингибирует каталитическую активность C-концевого домена, удаление которого повышает активность PHD2. Другие белки с доменом MYND являются репрессорами транскрипции [7]. Каталитический C-концевой домен (181–426) гомологичен 2-оксоглутарат-зависимым диоксигеназам. Он содержит двойную складку DSBH. Кристаллизация полноразмерного PHD оказалась неудачной и были созданы «урезанные» с N-конца конструкции, способные к катализу

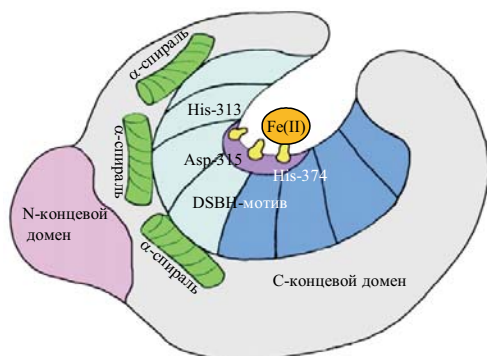


Рис. 3. Структура PHD2 (по данным [6])

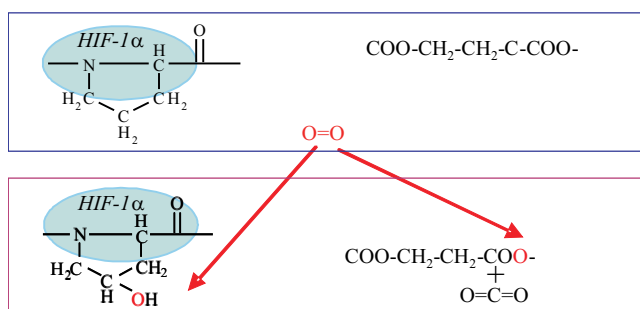


Рис. 4. Общая схема реакции гидроксилирования HIF-1α

(PHD2 – 181–426, PHD2 – 181–417 а. о.). PHD2 кристаллизуется как тример, что является уникальным случаем среди 2-оксоглутарат-зависимых диоксигеназ. DSBH (double-stranded β -helix) – двойная β -складка 2-оксоглутарат-зависимых диоксигеназ состоит из восьми β -цепей (I–VIII). В цепи II находятся два из трех координирующих Fe(II) а. о. Большой лист β -складки сформирован цепями I (β 4), VIII (β 10), III (β 5) и VI (β 8). Меньший лист состоит из цепей II, VII (β 9), IV (β 6) и V (β 7). Три α -спирали (α 1– α 3) находятся возле большого листа и стабилизируют DSBH. Гидрофобные остатки локализованы в основном в малом листе и, возможно, участвуют во взаимодействии PHD2 с HIF-1 α или другими белками. Активный сайт фермента размещается между большим и малым листами DSBH, формируя относительно глубокий карман по сравнению с таковым других 2-оксоглутарат-зависимых диоксигеназ. В нем остатками His-313, Asp-315, His-374 координируется Fe(II), 2-оксоглутарат и молекула воды. Активный сайт «выстелен» преимущественно гидрофобными остатками (кроме связывающих Fe(II) и 2-оксоглутарат). Это может отображать необходимость защиты фермента от потенциальных оксидативных повреждений, поскольку гидрофобные участки менее подвержены окислению реактивными формами кислорода.

тивных повреждений, поскольку гидрофобные участки менее подвержены окислению реактивными формами кислорода.

Пролилгидроксилазы узнают консервативные последовательности Leu-Xaa-Xaa-Leu-Ala-Pro, которых в молекуле HIF-1 α находится две. Домены, содержащие одну из таких последовательностей (LXXLAP-мотив), называют N-ODD и C-ODD (N- и C-terminal ODD – oxygen-dependent degradation domains) соответственно [8].

В общем виде реакция приводит к тому, что один атом молекулы кислорода соединяется с 2-оксоглутаратом, приводя к образованию CO₂ и сукцината, а второй – формирует гидроксильную группу пролинового остатка HIF. В таком общем виде это представлено на рис. 4. Но тонкости процесса как сенсорного по отношению к концентрации кислорода в клетке заключаются в особенностях промежуточных этапов реакций. Механизм катализа состоит из двух фаз. В первой образуются гидроксильные соединения. В результате этих процессов конформация молекулы PHD меняется таким образом, что приобретает способность осуществить вторую фазу. Во время второй фазы образовавшиеся гидроксильные соединения взаимодействуют с HIF-1 α , гидроксилируя хотя бы один из содержащихся в нем в положении 402 или 564 пролиновых остатков с параллельным формированием 4-гидроксипролина [5] (рис. 5). Чтобы реакция шла, нужно наличие в активном центре PHD свободного кислорода и 2-оксоглутарата [9]. Они поступают в активный центр вероятностно, в зависимости от концентрации в цитоплазме клеток. И обе эти молекулы являются своеобразным составным «суммарным» косенсором на содержание кислорода. В отношении свободного кислорода это понятно (он и есть сенсор «конститутивный»). Что же касается 2-оксоглутарата, то он «косенсор» на концентрацию кислорода, функциональный, сигнализирующий о его уровне в митохондриях и контролирующий реакцию [5]. Это реализуется условиями его синтеза. Он (в основном) является промежуточным метаболитом цикла трикарбоновых кислот (цикла Кребса). Этап преобразования 2-оксоглутарата в следующий продукт цикла – сукцинат выполняется реакцией оксидативного декарбоксилирования, непосредственно связанного

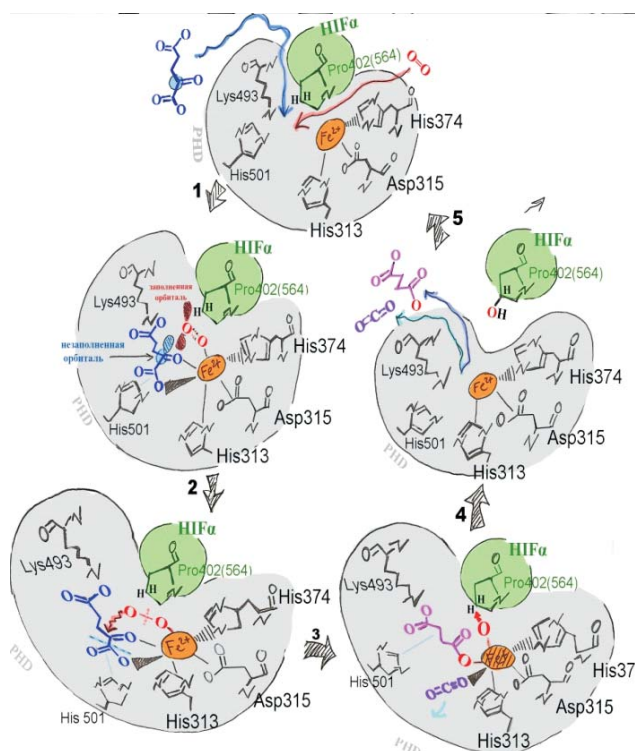


Рис. 5. Механизм реакции гидроксилирования HIF-1 α : 1 – участники реакции: PHD, HIF- α (в данном случае α -субъединица HIF-1 или HIF-2), кислород, 2-оксоглутарат до начала реакции; «стартовое» состояние, ничто не функционирует; 2 – начало реакции (реакция имеет две фазы: образование гидроксилирующих соединений и последующая их утилизация с формированием 4-гидроксипролина на HIF-1 α – первая фаза начинается с образования гидроксилирующего соединения: одна из заполненных орбиталей кислорода взаимодействует с незаполненной орбиталью C₂ оксоглутарата (2-го атома углерода), связанного с Fe²⁺); 3 – нуклеофильное замещение: атака C₂ кислородом в результате вызывает образование тетраэдрическое промежуточного соединения; молекула кислорода теряет двойную связь; 4 – гидроксилирование пролина; освобождение CO₂ совпадает с формированием сукцината и иона железа (+4), гидроксилирующего пролиновый остаток в HIF-1 α ; 5 – диссоциация участников реакции. Молекула готова к новому циклу

с циклом усвоения кислорода митохондрией. При функционировании цикла (когда O₂ достаточно) образуется 2-оксоглутарат и часть его поступает в цитоплазму [10]. В результате, когда кислорода достаточно, PHD окисляет HIF. При падении концентрации кислорода снижается уровень окисления HIF. Клетка переходит на новые пути метаболизма. Наконец, когда уровень кислорода падает до нуля, все процессы в клетке замирают. Далее либо поступление O₂ возобновляется и все восстанавливается, либо в клетке наступают разрушительные процессы и она в конце концов гибнет. Так осуществляется пер-

вая сенсорная реакция, с которой начинаются цепи последующих событий в клетке, перестраивающих ее метаболизм в соответствии с содержанием в ней свободного кислорода.

Следует особо отметить, что за счет поступления в активный центр компонентов «суммарного сенсора» O₂ и 2-оксоглутарата, определяемого их уровнем в цитоплазме, регуляция идет плавно. И перестройка осуществляется не скачком, а в соответствии с количественным содержанием в клетке кислорода. Последующие события уже реализуются через HIF. Как указывалось выше, в зависимости от активности PHD он (HIF) может находиться либо в нативном, либо в окисленном состоянии. Переход из одного состояния в другие и есть первый этап сигнального пути, непосредственно связанного с сенсором, – процесс, первая процедура передачи сигнала с датчика на «исполнительный механизм», с которого начинается сигналинг. HIF (hypoxia-inducible factor – фактор, индуцируемый гипоксией) был открыт и впервые описан как транскрипционный фактор гена эритропоэтина Семензой и сотр. (Университет Джона Хопкинса в Балтиморе, США) в 1992 г. [11]. HIF-1 – гетеродимер, состоящий из субъединиц HIF-1 α и HIF-1 β (рис. 6), последняя также известна как ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) [12]. Обе субъединицы относятся к семейству PER-ARNT-SIM транскрипционных факторов basic-helix-loop-helix (bHLH)-PAS (Per, AhR и Sim) [13]. HIF-1 α может взаимодействовать с HIF-1 β и формировать транскрипционно активные комплексы. HIF-1 α и HIF-1 β постоянно синтезируются в клетке. Считают, что на этот процесс концентрация кислорода не влияет. Но HIF-1 α имеет короткий период полужизни – меньше 5 мин, а HIF-1 β стабилен [14]. В условиях «нормального» для клетки уровня в ней свободного кислорода (а для разных типов клеток даже одного организма «норма» количественно отличается, иногда очень существенно) PHD, по описанному выше механизму, гидроксилирует HIF-1 α по остаткам пролина в положениях 402 и 564 в кислород-зависимом деградиационном домене [15]. После реакции с PHD гидроксилированная HIF-1 α приобретает способность связываться с убиквитин-лигазным комплексом E3 с помощью его компонента – белка pVHL

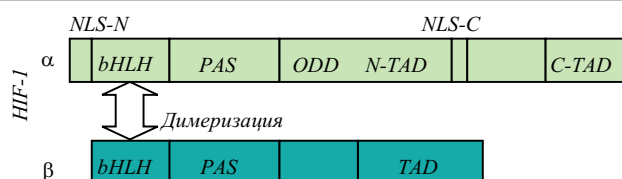


Рис. 6. Функциональные сайты HIF-1 α и HIF-1 β : HIF-1 – гетеродимер, состоящий из субъединиц HIF-1 α и HIF-1 β (димеризация – необходимое условие для связывания с ДНК, ее обеспечивают bHLH- и PAS-домены на каждой субъединице [11]); когда HIF-1 собран на HRE, он должен привлечь транскрипционные коактиваторы для формирования интактного комплекса; процесс опосредован трансактивационными доменами α -субъединицы: CAD, (786–826 а. о.) и NAD (531–575 а. о.); N-TAD (также NAD) – N-терминальный домен трансактивации HIF-1 α и HIF-2 α , привлекает коактиваторы CBP и p300, что необходимо для инициации транскрипции гетеродимером HIF; C-TAD (также CAD) – C-терминальный домен трансактивации HIF-1 α и HIF-2 α , привлекает коактиваторы CBP и p300, что необходимо для инициации транскрипции димером HIF; TAD – домен трансактивации HIF-1 β ; bHLH-PAS – домены на субъединицах, необходимые для димеризации транскрипционного активного фактора; ODD – кислород-чувствительный домен HIF, содержит консервативную последовательность Leu-Xaa-Xaa-Leu-Ala-Pro – LXXLAP-мотив, в котором содержатся пролины, гидроксимирующиеся PHD; NLS-N и NLS-C – сигналы ядерной локализации, аминокислотные последовательности, «отмечающие» белки для транспортировки в ядро

(von Hippel-Lindau tumour suppressor protein). В комплекс, кроме pVHL, входят элонгин В, элонгин С, Cul2 и Rbx 1 [16]. Комплекс E3 «отмечает» гидроксимирированный HIF-1 α полиубиквитиновым «хвостом», после чего HIF-1 α разрушается в протеосоме (рис. 7) [17]. HIF-1 β не является субстратом для PHD и постоянно присутствует в клетке, локализуясь в ядре в некоем «режиме ожидания».

В условиях гипоксии PHD не гидроксимирует HIF-1 α на достаточном уровне (по причинам, описанным выше), и сохранившаяся HIF-1 α транслируется в ядро, димеризуется с HIF-1 β и связывается с элементами, чувствительными к гипоксии, так называемыми HRE, в регуляторных участках целевых генов. Димеризация – необходимое условие для связывания с ДНК. Ее обеспечивают bHLH- и PAS-домены на каждой субъединице HIF [18].

Когда HIF-1 собран на HRE, он приобретает способность взаимодействовать с транскрипционными коактиваторами для формирования активного комплекса. Этот процесс опосредован трансактивационными доменами α -субъединицы (рис. 8). HIF-1 α и HIF-2 α содержат по два таких домена: CAD (786–826 а. о. HIF-1 α) и NAD (531–575 а. о.). CAD и

NAD HIF-1 α очень консервативны – более чем 90 % идентичности для разных видов, и 100 %-я идентичность для мыши и человека. Но между собой CAD и NAD HIF-1 α человека имеют мало общего. И рекрутируют разные коактиваторы (CBP/p300, SRC-1 и TIF-2) [19].

Определено более 200 вероятных генов – мишеней HIF, экспрессия которых так или иначе направлена на выживание клетки в условиях пониженного содержания кислорода. Они регулируют ангиогенез, тонус сосудов, эритропоэз, контроль внутриклеточного pH, энергетический метаболизм (поступление глюкозы в клетку), выживание, пролиферацию и др. Индивидуальными мишенями являются VEGF, транспортер глюкозы (GLUT-1), ферменты гликолиза, альдолаза А, энолаза 1, лактатдегидрогеназа А, фосфоглицераткиназа 1, iNOS (индуцибельная NO-синтаза) факторы ангиогенеза, PDGF, TGF α , эритропоэтин, SDF-1, а также гены факторов миграции клеток, сигнальные молекулы клеточного цикла (c-Met, TGF β , CXCR4 (рецептор SDF-1), матриксных металлопротеинкиназ [20]. Каждый из генов таких белков включает HRE-последовательность из 100 п. н., содержащую один или больше сайтов связывания HIF в имеющейся в нем коровой последовательности 5-RCGTG-3 [21]. Считают, что на уровне транскрипции до 1–1,5 % генома может регулироваться факторами HIF.

Как пример функционирования каскада можно привести один из элементов адаптации эмбриональных фибробластов мыши. Для адаптации к условиям хронической гипоксии им необходима активность HIF, проявляющаяся в следующем: HIF-1 активирует ген киназы пируватдегидрогеназы 1, инактивирующий каталитическую субъединицу пируватдегидрогеназы и препятствующий входу пирувата в цикл трикарбоновых кислот, и ген, кодирующий BNIP3 – белок митохондриальной аутофагии, уменьшая, таким образом, транспорт электронов по электронно-транспортной цепи (ЭТЦ), что предотвращает увеличение продукции реактивных форм кислорода (РФК) [12].

Если бы в живом все было бы так просто! В живом нет (и быть не может) только одного какого-либо фактора, каскада, фермента, сенсора или чего-либо еще, являющегося единственным, уни-

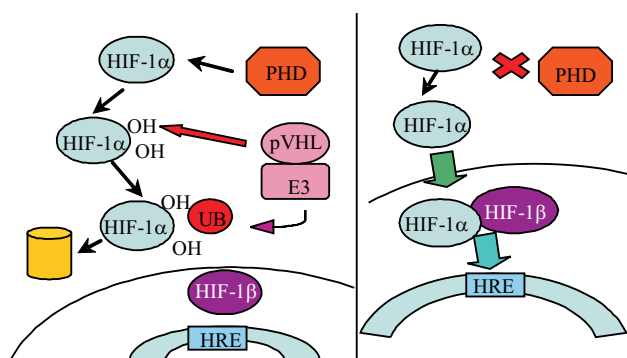


Рис. 7. Схема регуляции каскада HIF. HIF-1α постоянно синтезируется в клетке. Внутриклеточная HIF-1α экспериментально не определяется в условиях нормоксии. При гипоксических условиях HIF-1α быстро накапливается в ядрах клеток. HIF-1β также постоянно экспрессируется в клетке, а в ядре присутствует постоянно. Ключевыми в процессе адаптации клетки к гипоксии являются взаимодействия HIF-1α с PHD, белками семейства 2-оксоглутарат-зависимых диоксигеназ, гидроксилируемых HIF-1α по остаткам пролина в положениях 402 и 564 в кислород-зависимом деградационном домене (ODD). После реакции с PHD гидроксилированная HIF-1α свободно связывается с убиквитин-лигазным комплексом E3 с помощью его компонента, белка pVHL, после чего HIF-1α разрушается в протеосоме. В условиях гипоксии PHD из-за отсутствия кислорода не гидроксилирует HIF-1α; субъединица транслируется в ядро, димеризуется с HIF-1β и связывается с элементами, чувствительными к гипоксии (HRE) в регуляторных участках целевых генов

кальным, определяющим жизненно важную систему. Не является исключением, конечно же, и регуляция ответа на концентрацию, содержание свободного кислорода. Это начинается уже на самом первом уровне – сенсора и эффектора. И связано оно с тем, что PHD и HIF имеют изоформы.

Изоформы PHD. Существуют три изоформы: PHD1, PHD2 и PHD3. Полноразмерные PHD1 и PHD2 содержат более 400 (для человека – 407 и 426 соответственно) а. о. PHD3 у человека намного короче (239 а. о.), включает гидроксилазный домен и небольшую варьирующую N-терминальную последовательность [22].

При наличии некоторых общих черт PHD1–3 отличаются профилем экспрессии в тканях [23], субклеточной локализацией [24], взаимодействием с другими белками, чувствительностью к гипоксии. PHD1 (44 кДа) экспрессируется конститутивно. Существуют два варианта изоформы PHD1 (40–43 кДа), являющиеся результатом альтернативной инициации трансляции. PHD2 (46 кДа) во многих типах клеток – главная изоформа, опосредующая деградацию HIFα.

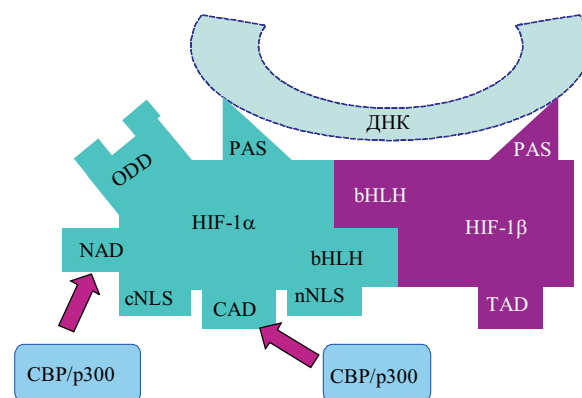


Рис. 8. Взаимодействие функциональных сайтов HIF-1α и HIF-1β. Димеризация – необходимое условие для связывания с ДНК. Ее обеспечивают bHLH- и PAS-домены на каждой субъединице. Когда HIF-1 собран на HRE, он должен привлечь транскрипционные коактиваторы для формирования интактного комплекса. Процесс опосредован трансаактивационными доменами α-субъединицы: CAD (786–826 аминокислотные остатки) и NAD (531–575). N- TAD (также NAD) – N-терминальный домен трансаактивации HIF 1α и HIF 2α – привлекает коактиваторы CBP и p300, что необходимо для инициации транскрипции гетеродимером HIF. C-TAD (так же CAD) – C-терминальный домен трансаактивации HIF-1α и HIF- 2α – привлекает коактиваторы CBP и p300, что необходимо для инициации транскрипции димером HIF. TAD – домен трансаактивации HIF-1α. bHLH и PAS – домены на субъединицах, нужные для димеризации транскрипционно активного фактора. ODD – кислород-чувствительный домен HIF, включает консервативную последовательность Leu-Хаа-Хаа-Leu-Ala-Pro (LXXLAP-мотив), в которой содержатся пролины, гидроксилируемые PHD. NLS-N и NLS-C – сигналы ядерной локализации, аминокислотные последовательности, «отмечающие» белки для транспортировки в ядро

Показано, что наибольшую активность PHD2 проявляет к изоформе HIF1-α. В условиях гипоксии регуляторный механизм включает усиление транскрипции PHD2 и PHD3 [25–27].

Описаны два типа альтернативного сплайсинга PHD3. Однако специфические функции PHD3- вариантов неизвестны. PHD3 сиквенс-специфически гидроксилирует пролин в положении 564 HIF -1α, тогда как PHD1 и PHD2 узнают сайт гидроксилирования по пространственной конформации [28].

Все три изоформы способны гидроксилировать HIF1α *in vitro*. Их активность располагается в ряду: PHD2 > PHD3 > PHD1 [29].

PHD2 наиболее распространена в цитоплазме и, как считают, контролирует постоянную концентрацию HIF1α. При достаточной концентрации кислорода внутриклеточные уровни PHD1 и PHD3 очень низкие.

Форма PHD1 определяется исключительно в ядре, PHD3 стохастически распределена между ядром и цитоплазмой, большинство PHD2 содержится в цитоплазме, хотя для PHD2 и PHD3 показано выраженное присутствие в ядре как нормальных, так и неопластических клеток. Гипоксия не влияет на локализацию ферментов.

Экспрессируясь в разных тканях, PHD отличаются количеством транскрибированной мРНК в зависимости от типа клетки. Экспрессия генов PHD2 и PHD3 повышается при гипоксии, тогда как общий синтез белка снижается [29].

Функционирование кислород-чувствительных белков *in vitro* на молекулярном уровне изучено уже весьма детально. Но органоспецифические функции *in vivo* и системные эффекты невозможно определить только из анализов *in vitro*. Данных же *in vivo* пока слишком мало и они фрагментарны. Так, *in vitro* показано, что PHD1 гидроксилирует HIF α . Но нокаутные по PHD1 мыши не имеют очевидных дефектов функционирования каскада HIF. Однако их скелетные мышцы отличаются пониженным уровнем митохондриального потребления кислорода и более слабой активностью пируватдегидрогеназного комплекса. PHD2-нокаутные эмбрионы умирают на 12–14-е сут. Эта временная точка совпадает с возрастанием уровня PHD2 у мышей дикого типа. PHD2 экспрессируется практически во всех тканях. Для PHD1 и PHD3 этот спектр намного уже, хотя в системах *in vitro* наиболее детально изучен именно PHD1. Мыши, нокаутные по 1-му экзону PHD3, нежизнеспособны. Но с чем это связано, пока до конца непонятно, хотя известно, что PHD3, кроме участия в регуляции количества HIF α , *in vitro* играет какую-то роль в апоптозе нейронов [30]. Для мРНК PHD разных изоформ имеет характерно различное распределение по тканям. мРНК PHD2 экспрессируется в большом количестве тканей, особенно в жировой. мРНК PHD3 обнаруживают во многих тканях, но особенно – в сердце и плаценте. PHD1 также экспрессируется в большом количестве тканей, особенно в семенниках. Уровни мРНК PHD3 в целом ниже, чем PHD1 и PHD2. Исследование распределения изоформ PHD в разных тканях с помощью иммуоцитохимических методов визуализировало картину экспрессии мРНК

изоформ [31]. PHD1 и PHD2 имеют сходные зоны экспрессии, хотя в эпителиальной ткани заметны отличия. Для PHD3 в ряде случаев определен более широкий спектр экспрессии, в частности, в эпителии и гладкомышечных клетках сосудов.

Изоформы HIF. Основной в клетке считают изоформу HIF-1 α . HIF-2 α – тканеспецифический фактор, ее также называют «эндотелиальный белок с PAS-доменом» (EPAS1), HIF-1-подобный фактор (HLF) и HIF-1-родственный фактор (HRF). HIF-1 α и HIF-2 α идентичны на 48 %, у обоих есть консервативный домен деградации, зависимый от кислорода [32]. HIF-2 α также димеризуется с HIF-1 β и может связываться с HRE. Есть ряд генов, активирующихся и HIF-1, и HIF-2 [33]. Поскольку мыши, дефектные по HIF-1 α и HIF-2 α , имеют разные фенотипы, это свидетельствует о том, что роль факторов хотя и сходна, но не идентична. Есть отличие на уровне молекулярных взаимодействий с другими факторами (HIF-2 α может связываться с NEMO (NF- κ B essential modulator)) и генами-мишенями. Ген *VEGFR1* регулируется HIF-1 [34]. По некоторым данным, HIF-2 α регулирует экспрессию Oct-4 [33]. Для HIF-3 α не описана функция транскрипционного фактора, хотя он может димеризоваться с HIF-1 β и связываться с HRE [35]. Его считают негативным регулятором HIF-опосредованной транскрипции. Продукт альтернативного сплайсинга гена, кодирующего HIF-3 α , так называемый IPAS (ингибиторный белок с PAS-доменом), димеризуется с HIF-1 β (с аминокотерминальным концом) и ингибирует транскрипцию генов-мишеней, «отделяя» HIF-1 β от HIF-1 α (или предотвращая связывание с ДНК). Уровень IPAS также зависит от концентрации кислорода. Он индуцируется при гипоксии в печени и легких и таким образом выступает в роли негативного обратного регулятора для HIF-1 α . Его экспрессия регистрируется в клетках Пуркиньи и эпителии роговицы [29].

Регуляция стабильности HIF также опосредуется кислород-независимым путем. В цитоплазме HIF-1 α связывается с белком теплового шока Hsp90, что повышает стабильность субъединицы. По-видимому, это имеет значение при различных стрессовых ситуациях. Влияние ингибиторов Hsp90 (например, RACK1, рецептора активированной протеинки-

назы С) способно вызывать связывание HIF-1 α с убиквитином, активацию убиквитин-лигазной системы и стимулировать деградацию HIF-1 α -субъединицы [19].

Хотя система PHD–HIF является основной в регуляции ответа клетки на поступление в нее кислорода в молекулярной форме, тем не менее, имеются и резервные системы, а также системы «тонкой настройки». Но степень их изученности пока достаточна только для того, чтобы признать их наличие. Кроме вышеперечисленных, у PHD существуют дополнительные функции регуляции, создающие условия для сопряжения сигнальных каскадов. Так, показано, что PHD1, кроме взаимодействия с HIF, гидроксилирует Pro191 фактора I κ B, влияя таким образом на активацию NF- κ B [36]. В присутствии кислорода консервативный остаток в STAD HIF-1 α гидроксилируется с помощью другой железо- и 2-оксоглутарат-зависимой диоксигеназы – FIH (factor inhibiting HIF). Гидроксилирование предотвращает связывание HIF1 с коактиваторами p300 и CBP, чем блокирует активность генов, участвующих в ответе на гипоксию (HIF1-зависимую транскрипцию) [37]. В условиях гипоксии уровень аспарагинового и пролинового гидроксилирования падает, pVHL не связывается с HIF-1 α и этот фактор стабилизируется, транслируется в ядро, соединяется с HIF-1 β и p300/CBP и опосредует транскрипцию соответствующих генов [20]. Фактор FIH еще остается активным при пониженных содержаниях кислорода (поскольку имеет меньшую аффинность к кислороду) даже тогда, когда PHD активность уже утратил. В результате в клетке активируются дополнительные «наборы» генов адекватного ответа на количественные вариации уровней гипоксии и происходит тонкая настройка ответа при недостатке кислорода [38].

Даже сам баланс между внутриклеточной концентрацией HIF-1 α и PHD каким-то образом влияет на конечный результат регуляции генов, связанных с гипоксией [38]. Кроме HIF, на роль сенсоров кислорода предлагают НАДФН-оксидазу, гем-содержащие белки. Со временем, когда все эти факторы, резервные механизмы, пересечение регуляторных цепей будут исследованы достаточно детально, можно будет создать полную картину ответа клет-

ки на уровень в ней молекулярного кислорода и динамику во времени и пространстве. Но пока реально отследить лишь первые этапы – на уровне сенсора и передачи с него сигнала. Да и то только на примере одного, достаточно хорошо изученного варианта PHD2 (т. е. лишь одной из изоформ) и HIF-1. Но это – уже базовое, реперное изучение. Оно, став полностью проработанным, даст возможность соотносить к нему, сравнивать, сопоставлять другие параллельные и обходные пути. Далее, по мере накопления знаний, это можно будет расширять. Пока же все «остальное» существует только на уровне предположений и описания отдельных экспериментов. И очень радикально и быстро все меняется. Так, до последнего времени считали, что кислород свободно диффундирует через клеточные мембраны. Однако оказалось, что способность O₂ проходить через липидный бислой ниже, чем прогнозировали. Это наталкивает на мысль о существовании мембранных «кислородных каналов», на роль которых предлагают аквапорины, в частности аквапорин-1. Он присутствует в значительном количестве в мембранах эритроцитов и клетках эндотелия сосудов, имеющих особый механизм обмена газов (O₂/CO₂) [39].

Заключение. Для борьбы с гипоксией организм имеет многоуровневую систему: усиление вентиляции легких; увеличение числа эритроцитов (при продолжительном состоянии нехватки кислорода); на уровне ткани – повышение васкуляризации. Имеются и специализированные, чувствительные к гипоксии «органы»: нейроэпителиальные тельца (расположенные в воздухоносных путях), каротиноидные тельца (локализованные в сосудах), способные при понижении кислорода передавать сигналы в ЦНС. Но во всех случаях и на всех уровнях, даже для системного ответа организма, необходимы вначале адекватные изменения в отдельных клетках. Изменения, базирующиеся на восприятии «датчиком» (молекулярным сенсором) уровня кислорода в клетке и запуска реакций реагирования. В основе всех этих реакций лежит способность индивидуальной клетки «оценивать» падение концентрации кислорода, в зависимости от чего менять свой метаболизм. И при этом, при таком изменении, продолжать выполнять как жизненно необхо-

димые внутриклеточные процессы, так и обеспечить существование всего организма. Для клетки – это увеличение продукции АТФ за счет гликолиза, «включение» антиапоптотических механизмов и перевод всех систем на снижение уровня потребления кислорода.

К таким событиям клетка хорошо приспособлена. Для переживания гипоксии у нее имеется и датчик, и включаемые им механизмы. Иначе происходит при ситуациях, отсутствующих в природе, но создающихся искусственно – при изъятии клетки из организма и выращивании ее в питательной среде. Общепринятый для этого газовый состав – обычный воздух (иногда еще и специально очищенный) с добавлением 5 % CO_2 . Это лишь незначительно снижает концентрацию кислорода – в такой газовой смеси его будет не 21, а 19,95 %.

Но в организме (как указано выше) имеется весьма крутой градиент концентраций свободного кислорода, и вокруг клеток его содержание низкое. Интересно сравнить эти величины для клеток в организме и культуре. Для клеток в организме концентрация свободного кислорода в окружающей межклеточной жидкости составляет $\approx 1-2\%$. Здесь необходимо уточнение. Оценка (непосредственная экспериментальная, а не расчетная) для тканей методически очень трудновыполнима. И в тех случаях, когда ее осуществляют, как правило, измеряют «в ткани», т. е. в массе ткани без тонкой локализации. А вся ткань пронизана капиллярами. Поэтому величины, получаемые без учета непосредственной точки измерения, будут средними: и между тем, что в капиллярах, и почти нулем на равноудаленном пространстве между ними. Клетки же потребляют в ткани кислород не «в среднем», а в совершенно конкретном своем окружении. Поэтому значения для оценки концентраций кислорода в окружении клеток в ткани надо соотносить с адекватными измерениями. Но и это только часть проблемы оценки концентраций кислорода, окружающих клетки. Точные величины определить невозможно, так как между капиллярами в слоях клеток градиент вообще может доходить до нуля (чего, скорее всего, в реальности не бывает – клетки в таких условиях не живут, а «нуль» является уже величиной расчетной). В разных тканях – своя норма.

Корреляция между концентрацией кислорода в атмосфере и его давлением в околоклеточном пространстве

Атмосферная концентрация, %	Околоклеточная концентрация, %*
20,9	15,1 ± 0,281
2	0,23 ± 0,008
1	0,14 ± 0,011

Результаты 16 независимых измерений [40].

Физиологические условия и активность метаболизма тоже будут влиять на поглощение (и как следствие – околоклеточное содержание) кислорода. Поэтому принципиален диапазон «нормы». Для клеток в организме – это будут десятые процента. Иное дело искусственные условия. Концентрация кислорода вокруг клеток в культуре будет зависеть от концентрации кислорода в газовой фазе устройства, в котором они выращиваются. Результаты прямых измерений этого представлены в таблице.

И получается, что при стандартном культивировании (CO_2 -инкубатор) концентрация кислорода вокруг клеток во много раз выше, чем вокруг клеток в организме. А регуляции систем ответа на повышенное содержание кислорода в клетках нет. В природе такого не бывает, организм с подобным никогда не сталкивался, и создавать молекулярную адаптацию к тому, чего нет, эволюционно не реализуемо. И в литературе уже несколько лет поднимается вопрос об изменении терминологии, которая стала дезинформирующей. Предлагается для клеток как в культуре, так и в организме те концентрации кислорода, которые их обычно окружают в ткани, называть не гипоксией, а физиологическими. И использовать это при аппаратном выращивании клеток в культуре [41].

Но проблема «начала», датчика, сенсора выходит далеко за рамки только культивирования.

Интересно рассмотреть возможное место датчика (сенсора) как некоего начала «точки отсчета» в концепции создания лекарственных средств. Представим себе некую «абстрактно-принципиально-обобщенную» ситуацию. Начал неправильно работать CO_2 -инкубатор – обычное 5 %-е содержание углекислого газа в нем возросло до 10 %. Началось закисление сред, перестали расти клетки, а те, которые росли, стали «не такими» и т. д. Приступили

ли к «лечению» CO₂-инкубатора. По одной «технологии лечения» начали перекрывать редуктор на баллоне, чтобы снизить в конечном итоге в инкубаторе содержание углекислоты. По другой – стали пережимать подающие CO₂-шланги, вставлять более узкие трубки, снижать (или повышать) подачу электричества на клапаны дозатора и все такое прочее. Но датчик подает сигнал (исходя из своей сбитой настройки) на поддержание 10 %. И вся система регуляции в строгом соответствии с сигналом от датчика дает команды (а исполнительные механизмы их выполняют) на повышение концентрации до ненужных, но «выставленных» в результате неисправности датчика 10 %. И, в конце концов, все закончится поломкой прибора. А надо (что при настройке прибора и делают) отрегулировать датчик CO₂. Инкубатор, конечно же, не человек. Но общие принципы управления, регуляции, обратных связей – универсальные, действующие во всем мироздании. Их экстраполируют (с учетом реального объекта) на все и на всех.

Хорошо бы такое учитывать и при создании лекарств. Пока же лекарства действуют не на датчик, а на промежуточные системы. Да и датчики – молекулярные сенсоры и первые (еще до разветвлений) сигнальные этапы для систем клетки организма – неизвестны (и не изучены), за редчайшими исключениями. А надо бы начинать с них. С такой постановкой проблемы подхода к разработке лекарственных средств можно не соглашаться, вообще «отмахнуться» от нее, но концептуально она более «таргетна», более прицельна и узконаправленна, чем идея блокирования активных центров ферментов или функциональных участков промежуточных или ключевых макромолекул (в ключевых точках) какого-то сигнального пути (или точках пересечения сигнальных путей). Их можно как угодно менять. Но датчик, если он сбит, будет выдавать команды на поддержание патологии. И системы организма будут перестраиваться на ее, патологии, сохранение, поддержание. Проблема «датчика» в регуляции клеточных процессов так же критична, как и центральные точки сигнальных путей. В центральных точках многое пересекается. А с датчиков многое начинается. Их поиск и анализ необходимы. В конце концов, все начинается с «начала».

П р и л о ж е н и е

ARNT – aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, другое название HIF-β;

bHLH – basic-helix-loop-helix – структурный мотив белков, характеризует семейство транскрипционных факторов;

bHLH-PAS – домены HIF-α и HIF-β, необходимые для димеризации субъединиц HIF;

CBP и p300 – коактиваторы HIF, необходимые для транскрипции генов-мишеней;

C-ODD – C-терминальный чувствительный к кислороду домен HIF-α; содержит консервативную последовательность Leu-Хаа-Хаа-Leu-Ala-Pro (LXXLAP-мотив), которая включает пролины, гидроксимирующиеся PHD;

C-TAD – C-терминальный домен трансактиваии HIF-1α и HIF-2α, привлекает коактиваторы CBP и p300, что необходимо для инициации транскрипции димером HIF;

FIN – фактор, ингибирующий HIF, пролилгидроксилаза, гидроксимирует аспарагиновый консервативный остаток в CTAD, что препятствует связыванию димера HIF1 с коактиваторами p300 и CBP и индуцируемую ими транскрипцию;

HIF – фактор, индуцируемый гипоксией. Транскрипционный фактор ряда генов, экспрессия которых является ответом на снижении концентрации кислорода в окружении клетки. Гетеродимер, состоит из субъединиц: HIF-α и HIF-β.

HIF-α – α-субъединица фактора, индуцируемого гипоксией. Существует в виде изоформ. Постоянно экспрессируется в клетке. В условиях нормоксии гидроксимируется ферментом PHD, вследствие чего разрушается в протеосомах. При гипоксии стабилизируется, транспортируется в ядро и соединяется с HIF-β, формируя гетеродимер, работающий как транскрипционный фактор.

HIF-β – β-субъединица фактора, индуцируемого гипоксией. HIF-β постоянно экспрессируется в условиях нормоксии, определяется в ядре. Существует в виде изоформ. При гипоксии соединяется с HIF-α, формируя димер, работающий как транскрипционный фактор.

HRE – элементы, чувствительные к гипоксии; последовательность в промоторных участках генов. Узнаются гетеродимером HIF;

IPAS – ингибиторный белок с PAS-доменом. Продукт альтернативного сплайсинга гена, кодирующего HIF-3α, ингибирует транскрипцию генов-мишеней, «отбирая» HIF-1β от HIF-1α (или предотвращая связывание с ДНК);

MYND – белковый домен «цинковый палец». Встречается во многих группах белков, обнаружен у дрожжей, дрожофилов и млекопитающих.

N-ODD – N-терминальный чувствительный к кислороду домен HIF-α, содержит консервативную последовательность

Leu- Xaa-Xaa-Leu-Ala-Pro (LXXLAP-мотив), которая включает пролины, гидроксимирующиеся PHD;

N-TAD – N-терминальный домен трансаактивации HIF-1 α и HIF-2 α , привлекает коактиваторы CBP и p300, что необходимо для инициации транскрипции гетеродимером HIF;

PAS – per-ARNT-Sim – белковый домен, широко распространен как компонент сигнальных белков. Опосредует контакты между белками. Присутствует у про- и эукариотов;

PHD – «пролилгидроксилазные домены», кислород-чувствительный белок каскада HIF. Относится к семейству 2-оксоглутарат-зависимых гидроксилаз, гидроксимирует HIF-1 α . Реакция гидроксимирирования зависит от доступности кислорода, железа, 2-оксоглутарата. Это делает реакцию, осуществляющую PHD, восприимчивой к колебаниям концентраций этих веществ в цитоплазме и «определяет гипоксические условия». Существует в виде изоформ;

pVHL – белок «фон Гиппель-Линдау», супрессор опухолей (von Hippel-Lindau tumour suppressor protein). Компонент убиквитинлигазного комплекса E3, узнает гидроксимирированные пролиновые остатки в ODD HIF- α .

TAD – домен трансаактивации HIF- β ;

ПДК – парциальное давление кислорода (в данной работе – в плазме крови и тканевой жидкости). Каждому значению содержания газа в жидкости соответствует определенное значение его парциального давления над жидкостью, при котором происходит растворение. Например, если парциальное давление кислорода в плазме равно 90 мм рт. ст., это означает, что в плазме в растворенном состоянии содержится столько кислорода, сколько его могло раствориться, если бы плазма находилась в контакте с воздухом, в котором парциальное давление кислорода составляет 90 мм рт. ст.;

РФК – реактивные формы кислорода, свободные радикалы, ионы кислорода, перекиси. Высокореактивные метаболиты кислорода, возникают при функционировании ЭТЦ и некоторых других процессах в клетке.

V. A. Kordium¹, N. S. Shuvalova²

The concept of «origin» – problem definition and attempt of analysis

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnogo Str., Kyiv, Ukraine, 03680

²State Institute of Genetic and Regenerative Medicine, NAMS of Ukraine
67, Vyshgorodska Str., Kyiv, Ukraine, 04114

Summary

The present article analyzes the problem of «origin» by the example of respiration. The «origin» implies the system of molecular sensor and affecting signal, which start the chain (cascade) of molecular conversions, leading to the phenotypic changes. As «origin» the most studied elements of the cascade are chosen: molecular oxygen, PHD and HIF protein families and molecules interacting directly with them. The al-

ternative and additional systems are also considered. The important point of the whole regulation is the absence of signaling systems for increasing molecular oxygen concentration (above necessary, i. e. hypoxia) in the cell.

Keywords: PHD and HIF protein, signaling systems, molecular oxygen.

V. A. Kordium, N. S. Shuvalova

Проблема «початку» – формулювання і спроба аналізу

Резюме

На прикладі дихання сформульовано і проаналізовано проблему «початку». Під «початком» мається на увазі система молекулярного датчика та подавання на нього молекулярного сигналу, з яких запускається послідовний каскад молекулярних перетворень, що в кінцевому підсумку призводить до зміни фенотипу. На роль «початку» обрано найвивченіші (як датчики) перші учасники події – молекулярний кисень, родини білків PHD і HIF та молекули, які безпосередньо з ними взаємодіють. Обговорено також наявність додаткових і альтернативних систем. Істотним моментом усієї регуляції є відсутність систем сигналіну на зростання (вище необхідної, тобто гіпероксії) концентрації молекулярного кисню в клітині.

Ключові слова: білки PHD і HIF, системи сигналіну, молекулярний кисень.

REFERENCES

- Gibson D. G., Glass J. I., Lartigue C., Noskov V. N., Chuang R. Y., Algire M. A., Benders G. A., Montague M. G., Ma L., Moodie M. M., Merryman C., Vashee S., Krishnakumar R., Assad-Garcia N., Andrews-Pfannkoch C., Denisova E. A., Young L., Qi Z. Q., Segall-Shapiro T. H., Calvey C. H., Parmar P. P., Hutchison C. A. 3rd, Smith H. O., Venter J. C. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome // Science.– 2010.– **329**, N 5987.–P. 52–56.
- Brahimi-Horn M. C., Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress // FEBS Letters.–2007.–**581**, N 19.–P. 3582–3591.
- Braun R. D., Lanzen J. L., Snyder S. A., Dewhirst M. W. Comparison of tumor and normal tissue oxygen tension measurements using OxyLite or microelectrodes in rodents // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.–2001.–**280**, N 6.–H2533–2544.
- Erecinska M., Silver I. A. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia // Respir. Physiol.–2001.–**128**, N 3.–P. 263–276.
- Siddiq A., Aminova L. R., Ratan R. R. Hypoxia inducible factor prolyl 4-hydroxylase enzymes: center stage in the battle against hypoxia, metabolic compromise and oxidative stress // Neurochem Res.–2007.–**32**, N 4–5.–P. 931–946.
- McDonough M. A., Li V., Flashman E., Chowdhury R., Mohr C., Lienard B. M., Zondlo J., Oldham N. J., Clifton I. J., Lewis J., McNeill L. A., Kurzeja R. J., Hewitson K. S., Yang E., Jordan S., Syed R. S., Schofield C. J. Cellular oxygen sensing: Crystal structure of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase (PHD2) // Proc. Natl Acad. Sci. USA.–2006.–**103**, N 26.–P. 9814–9819.
- Choi K., Lee T., Lee N., Kim J. H., Yang E. G., Yoon J. M., Kim J. H., Lee T. G., Park H. Inhibition of the catalytic activity of hypoxia-inducible factor-1 α -prolyl-hydroxylase 2 by a MYND-type zinc finger // Mol. Pharmacol.–2005.–**68**, N 68.–P. 1803–1809.
- Metzen E. Enzyme substrate recognition in oxygen sensing: how the HIF trap snaps // Biochem. J.–2007.–**408**, N 2.–P. e5–6.

9. Dalgard C. L., Lu H., Mohyeldin A., Verma A. Endogenous 2-oxoacids differentially regulate expression of oxygen sensors // *Biochem. J.*—2004.—**380**, Pt 2.—P. 419–424.
10. Schofield C. J., Ratcliffe P. J. Oxygen sensing by HIF hydroxylases // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*—2004.—**5**, N 5.—P. 343–354.
11. Semenza G. L., Wang G. L. A nuclear factor induced by hypoxia via *de novo* protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation // *Mol. Cell Biol.*—1992.—**12**, N 12.—P. 5447–5454.
12. Shi Y. H., Fang W. G. Hypoxia-inducible factor-1 in tumour angiogenesis // *World J. Gastroenterol.*—2004.—**10**, N 8.—P. 1082–1087.
13. Semenza G. L. Oxygen homeostasis // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*—2010.—**2**, N 3.—P. 336–361.
14. Wang G. L., Jiang B. H., Rue E. A., Semenza G. L. Hypoxia inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*—1995.—**92**, N 12.—P. 5510–5514.
15. Qutub A. A., Popel A. S. A computational model of intracellular oxygen sensing by hypoxia-inducible factor HIF1 α // *J. Cell Sci.*—2006.—**119**, Pt.16.—P. 3467–3480.
16. Kaelin W. G. Jr., Ratcliffe P. J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway // *Mol. Cell.*—2008.—**30**, N 4.—P. 393–402.
17. Rankin E. B., Rha J., Selak M. A., Unger T. L., Keith B., Liu Q., Haase V. H. Hypoxia-inducible factor 2 regulates hepatic lipid metabolism // *Mol. Cell Biol.*—2009.—**29**, N 16.—P. 4527–4538.
18. Zagorska A., Dulak J. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing // *Acta Biochim. Pol.*—2004.—**51**, N 3.—P. 563–585.
19. Lisy K., Peet D. J. Turn me on: regulating HIF transcriptional activity // *Cell Death Differ.*—2008.—**15**, N 4.—P. 642–649.
20. Fulda S., Debatin K. M. HIF-1-regulated glucose metabolism: a key to apoptosis resistance? // *Cell Cycle.*—2007.—**6**, N 7.—P. 790–792.
21. Haddad J. J. Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology // *Respir. Res.*—2002.—**3**.—P. 26.
22. Fong G. H., Takeda K. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins // *Cell Death Differ.*—2008.—**15**, N 4.—P. 635–641.
23. Metzen E., Berchner-Pfannschmidt U., Stengel P., Marxsen J. H., Stolze I., Klinger M., Huang W. Q., Wotzlaw C., Hellwig-Burgel T., Jelkmann W., Acker H., Fandrey J. Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing // *J. Cell. Sci.*—2003.—**116**, Pt 7.—P. 1319–1326.
24. Hirsila M., Koivunen P., Gunzler V., Kivirikko K.I., Myllyharju J. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor // *J. Biol. Chem.*—2003.—**278**, N 33.—P. 30772–30780.
25. Metzen E., Stiehl D. P., Doege K., Marxsen J. H., Hellwig-Burgel T., Jelkmann W. Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 (*phd2/egln-1*) gene: identification of a functional hypoxia-responsive element // *Biochem J.*—2005.—**387**, Pt. 3.—P. 711–717.
26. Berra E., Ginouves A., Pouyssegur J. The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling // *EMBO Rep.*—2006.—**7**, N 1.—P. 41–45.
27. Cervera A. M., Apostolova N., Luna-Crespo F., Sanjuan-Pla A., Garcia-Bou R., McCreath K. J. An alternatively spliced transcript of the PHD3 gene retains prolyl hydroxylase activity // *Cancer Lett.*—2006.—**233**, N1.—P. 131–138.
28. Chan D. A., Sutphin P. D., Yen S. E., Giaccia A. J. Coordinate regulation of the oxygen-dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1 alpha // *Mol. Cell Biol.*—2005.—**25**, N 15.—P. 6415–6426.
29. Ke Q., Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) // *Mol. Pharmacol.*—2006.—**70**, N 5.—P. 1469–1480.
30. Katschinski D. M. *In vivo* functions of the prolyl-4-hydroxylase domain oxygen sensors: direct route to the treatment of anaemia and the protection of ischaemic tissues // *Acta Physiol. (Oxf.)*—2009.—**195**, N 4.—P. 407–414.
31. Soilleux E. J., Turley H., Tian Y. M., Pugh C. W., Gatter K. C., Harris A. L. Use of novel monoclonal antibodies to determine the expression and distribution of the hypoxia regulatory factors PHD-1, PHD-2, PHD-3 and FIH in normal and neoplastic human tissues // *Histopathology.*—2005.—**47**, N 6.—P. 602–610.
32. Tian H., McKnight S. L., Russell D. W. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells // *Genes Dev.*—1997.—**11**, N 1.—P. 72–82.
33. Covello K. L., Kehler J., Yu H., Gordan J. D., Arsham A. M., Hu C. J., Labosky P. A., Simon M. C., Keith B. HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth // *Genes Dev.*—2006.—**20**, N 5.—P. 557–570.
34. Okuyama H., Krishnamachary B., Zhou Y.F., Nagasawa H., Bosch-Marce M., Semenza G. L. Expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in bone marrow-derived mesenchymal cells is dependent on hypoxia-inducible factor 1 // *J. Biol. Chem.*—2006.—**281**, N 22.—P. 15554–15563.
35. Gu Y. Z., Moran S. M., Hogenesch J. B., Wartman L., Bradfield C. A. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 alpha // *Gene Expr.* 1998.—**7**, N 3.—P. 205–213.
36. Aragones J., Fraix P., Baes M., Carmeliet P. Oxygen sensors at the crossroad of metabolism // *Cell Metabolism.*—2009.—**9**, N 1.—P. 11–22.
37. Koivunen P., Hirsila M., Gunzler V., Kivirikko K.I., Myllyharju J. Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases // *J. Biol. Chem.*—2004.—**279**, N 11.—P. 9899–9904.
38. Acker H. The oxygen sensing signal cascade under the influence of reactive oxygen species // *Philos Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*—2005.—**360**, N 1464.—P. 2201–2210.
39. Echevarria M., Munoz-Cabello A. M., Sanchez-Silva R., Toledo-Aral J. J., Lopez-Barneo J. Development of cytosolic hypoxia and HIF stabilization are facilitated by aquaporin 1 expression // *J. Biol. Chem.*—2007.—**282**, N 41.—P. 30207–30215.
40. Fink T., Abildtrup L., Fogd K., Abdallah B. M., Kassem M., Ebbesen P., Zachar V. Induction of adipocyte-like phenotype in human mesenchymal stem cells by hypoxia // *Stem Cells.*—2004.—**22**, N 7.—P. 1346–1355.
41. Haque N., Rahman M. T., Abu Kasim N. H., Alabsi A. M. Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy // *Sci. World J.*—2013.—**2013**.—P. 1–12.

Received 02.01.13