

# Кисень у міжклітинному просторі гепатоцитів як регулятор транскрипції гена сериндегідратази

А. А. Самойленко, Н. М. Теплюк<sup>1</sup>, М. Ю. Оболенська<sup>1</sup>, Т. Кітцманн<sup>2</sup>

Інститут біохімії ім. О. О. Палладіна НАН України  
Вул. Леонтовича, 9, Київ 01601, Україна

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ 03143, Україна

<sup>2</sup>Університет Кайзерслаутерну, Факультет хімії  
Вул. Ервіна Шредингера, 54, 67663 Кайзерслаутерн, Німеччина

samoilenko@biochem.kiev.ua

---

*Через однонаправлений рух крові від портальної вени та печінкової артерії до центральної вени та у зв'язку з використанням кисню клітинами синусоїду у печінці формується градієнт концентрації кисню. Його різні концентрації визначають нерівномірну експресію генів у клітинах, розташованих в перипортальній та перивенозній зонах печінкового синусоїду. Ген, який кодує сериндегідратазу (СДГ), є типовим представником генів, що переважно експресуються в гепатоцитах перипортальної зони синусоїду. Нозерн-блот гібридизація і трансфекція первинних гепатоцитів щура конструкцією, що містить репортерний ген люциферази під контролем промотору гена СДГ (-2303...+55 п. н.), виявили, що експресія гена СДГ вища при нормоксії (16 % O<sub>2</sub>), ніж при гіпоксії (8 % O<sub>2</sub>). Чотири потенційних елементи відповіді на нормоксію (ЕВН) знайдено в промоторі гена СДГ (ЕВН-1, ЕВН-2, ЕВН-3 і ЕВН-4). Щоб встановити, який з цих елементів є функціонально важливим у гепатоцитах, клітини трансфікували конструкціями з репортерним геном люциферази, що перебуває під контролем у різній мірі вкороченої ділянки промотору гена СДГ. Трансфекція клітин HeLa і HepG2 конструкціями з шістьма послідовно розташованими копіями кожного з потенційних ЕВН перед промотором SV40 і репортерним геном люциферази засвідчила, що ЕВН-2 в клітинах HeLa і HepG2, а ЕВН-1 у клітинах HeLa беруть участь у регуляції транскрипції гена СДГ за умов нормоксії.*

*Ключові слова: ген сериндегідратази, регуляція транскрипції, репортерний ген, люцифераза, гепатоцити, нормоксія.*

---

**Вступ.** Градієнт концентрації кисню, що формується в печінковому синусоїді під час руху крові від портальної вени та печінкової артерії (тиск O<sub>2</sub> 60–65 мм Hg) до центральної вени (тиск O<sub>2</sub> 30–35 мм Hg), є одним із ключових факторів, відповідальних за відмінності в експресії цілої низки генів у гепатоцитах, розташованих в перипортальній та перивенозній зонах [1].

Механізм регуляції експресії генів під впливом низьких концентрацій кисню (гіпоксії) в загальних

рисах охарактеризований [2]. Промотори більшості генів, що індукуються гіпоксією, містять специфічну послідовність, відому як елемент відповіді на гіпоксію (ЕВГ, англ. – hypoxia response element, HRE). До цієї послідовності приєднуються білки з родини факторів, індукованих гіпоксією (ФІГ, англ. – hypoxia-inducible factors, HIF), з яких найкраще охарактеризовано ФІГ-1. Останній є димером, що складається із субодиниці ФІГ-1, рівень якої збільшується за умов гіпоксії, і субодиниці ФІГ-1, яка експресується конститутивно. ФІГ-1

регулюється головним чином на посттрансляційному рівні за рахунок стабілізації білка. За умов нормоксії два залишки проліну в молекулі ФІГ-1 гідроксильються специфічними пролілгідроксилазами, що індукуює убіквітинізацію і подальшу деградацію білка [2]. Пролілгідроксилази, які для своєї активності потребують кисень і залізо, при гіпоксії інактивуються, що й веде до стабілізації ФІГ-1.

У той же час існує лише декілька публікацій, у яких вивчали регуляцію експресії генів, які вище експресовані за умов нормоксії порівняно з гіпоксією [3–5]. Метою даної роботи було з'ясувати, як регулюється транскрипція гена *СДГ* (англ. – Serine Dehydratase, SerDH) у гепатоцитах за умов нормоксії та ідентифікувати промоторні послідовності, що відповідають за цю регуляцію. *СДГ* (L-serine ammonia-lyase, EC 4.2.1.13) – це піридоксальфосфат-залежний фермент, який каталізує дезамінування серину з утворенням пірувату [6]. Він також сприяє перетворенню треоніну на альфа-кетобутират і є тотожним до треоніндегідратази (EC 4.2.1.16). *СДГ* є гомодимером (34 кДа) і експресується переважно в печінці та, меншою мірою, в нирках. Відомо, що експресія *СДГ* індукується глюкозоном і глюкокортикоїдами та інгібується інсуліном [7], тоді як регуляцію експресії *СДГ* під впливом кисню раніше не досліджували.

**Матеріали і методи.** В експериментах використовували первинні культури гепатоцитів щура, ізольовані методом колагеназної перфузії [8]. Гепатоцити культивували в середовищі М 199 («Gibco», ФРН) за присутності дексаметазону (100 нМ), інсуліну (1 нМ) і (протягом перших 4 год після посадки) 4 % ембріональної сироватки теляти (ЕСТ). Клітини HeLa і гепатомної лінії HepG2 культивували в середовищі MEM («PAA Laboratories», Австрія), яке містило 10 % ЕСТ. Клітини культивували в CO<sub>2</sub>-інкубаторі (Cytoperm 8080, «Heraeus», ФРН) при температурі 37 °С у зволоженій атмосфері, що містила 8 % O<sub>2</sub> (помірна гіпоксія) або 16 % O<sub>2</sub> (нормоксія), 5 % CO<sub>2</sub> і відповідно 87 чи 79 % N<sub>2</sub>. Обрані концентрації кисню в CO<sub>2</sub>-інкубаторі відповідають (з урахуванням дифузії кисню через шар культурального середовища) його фізіологічним концентраціям на поверхні перивенозних і перипортальних гепатоцитів [1].

Плазміди *pGl3СДГ-2303*, *pGl3СДГ-2128*, *pGl3СДГ-937* і *pGl3СДГ-471* створено на основі вектора *pGl3 basic* («Promega», ФРН), у полілінкер якого перед репортерним геном люциферази вбудували відповідні ділянки промотору гена *СДГ* (2303 ... +55 п. н., 2128 ... +55 п. н., 937 ... +55 п. н. і 471 ... +55 п. н.). Плазміди *pGl3СДГ-ЕВН1*, *pGl3СДГ-ЕВН2*, *pGl3СДГ-ЕВН3*, *pGl3СДГ-ЕВН4* і *pGl3ЕПО-ЕВГ* сконструйовано на основі вектора *pGl3 promoter* («Promega»), в полілінкер якого вбудовано наведені нижче олігонуклеотиди перед промотором SV40 і репортерним геном люциферази. Олігонуклеотиди (90 п. н.) містили шість копій кожного з елементів відповіді на нормоксію (ЕВН, англ. – normoxia response element, NRE) або три копії елемента відповіді на гіпоксію (ЕВГ, англ. – hypoxia response element, HRE), притаманного промотору гена еритропоетину (ЕПО) [9], а також сайти рестрикції *SpeI* або *SmaI* посередині послідовності та *SacI* і *NheI* – по її краях. Клітини *Escherichia coli* K12 штамів DH5a і XL1-blue («Stratagene», ФРН) трансформували за допомогою електропорації. Після культивування бактерій упродовж приблизно 12 год плазмідну ДНК виділяли за допомогою набору «JETstar Plasmid Purification System» («Genomed», ФРН).

Первинні культури гепатоцитів (110<sup>6</sup> клітин на чашку діаметром 60 мм), клітини HeLa і HepG2 (після досягнення ними конфлюентності на чашках діаметром 60 мм) трансфікували методом кальцій-фосфатної преципітації з використанням 2,5 мкг плазмідної ДНК, що містила 500 нг плазміди *pRL-SV40* («Promega») і 2 мкг відповідної репортерної конструкції з геном люциферази світлячка (*Firefly*), як описано раніше [10]. Плазмиду *pRL-SV40*, що містить ген люциферази морського пера (*Renilla*) під контролем промотору SV40, використовували для контролю ефективності трансфекції. Кожний експеримент проводили з двома паралельними дослідженнями. Клітини культивували впродовж 4 год, змінювали середовище і продовжували культивування протягом першої доби за умов нормоксії, а другої – за умов нормо- або гіпоксії. Після цього клітини лізували буфером з Dual Luciferase Reporter Assay Kit («Promega») і люциферазну активність вимірювали в 20 мкл лізату

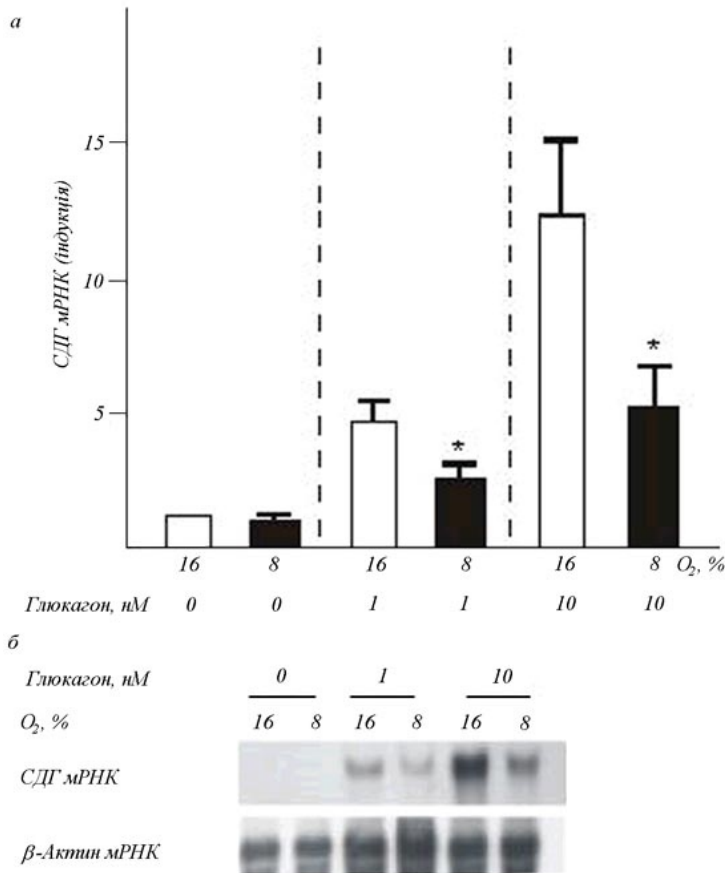


Рис. 1. Модуляція експресії гена *СДГ* під дією кисню: *a* – первинні гепатоцити щура культивували при нормоксії (16 % O<sub>2</sub>) або гіпоксії (8 % O<sub>2</sub>) (культури вирощували протягом 3 год за присутності зазначених концентрацій глюкагону або без нього; рівні СДГ мРНК визначали Нозерн-блот гібридизацією; рівень мРНК при нормоксії прийнято за одиницю; вказано середні значення трьох експериментів SEM; \*статистично значуща відмінність показників при парному порівнянні за *t*-критерієм Ст'юдента і рівнем значущості  $p < 0,05$ ); *б* – зразок Нозерн-блоту

на люмінометрі Auto Lumat Plus LB 953 («Berthold», ФРН). Спочатку реєстрували інтенсивність сигналу люмінесценції люциферази *Firefly*, потім додавали Stop and Glo™ Reagent («Promega») і вимірювали інтенсивність сигналу люмінесценції люциферази *Renilla*. Отже, люциферазну активність визначали як співвідношення інтенсивності люмінесценції люциферази *Firefly* до такої люциферази *Renilla* (нормалізована люмінесценція). Статистичну обробку результатів проводили, як описано у підписах до рисунків.

Тотальну РНК гепатоцитів виділяли ізотіоціанатним методом [11]. Вміст специфічної мРНК визначали за допомогою Нозерн-блот гібридизації 15 мкг тотальної РНК з СДГ- чи -актин-специфічними пробами кДНК, міченими дигоксигеніном (DIG RNA Labeling Kit, «Roche», ФРН). Гібридизаційні сигнали візуалізували методом хемілюмінесценції, а їхню інтенсивність оцінювали за результатами денситометрії.

**Результати і обговорення.** Індукція експресії гена *СДГ* глюкагоном за умов нормоксії та гіпоксії. Однодобову культуру первинних гепатоцитів щура культивували впродовж 24 год за умов гіпоксії (8 % O<sub>2</sub>) або нормоксії (16 % O<sub>2</sub>) та за наявності або відсутності глюкагону. За відсутності глюкагону *СДГ*-специфічна мРНК не визначається ні при високій, ні при низькій концентраціях кисню (рис. 1). Таким чином, нормоксія сама по собі не є достатнім стимулом, щоб індукувати експресію *СДГ*. Дійсно, за стандартних умов утримання і харчування тварин *СДГ* мРНК не визначається у печінці шурів. Проте голодування і пов'язане з ним зростання секреції глюкагону стимулює експресію *СДГ* [7].

У наших експериментах глюкагон в концентрації 1 нМ індукував експресію гена *СДГ*, що підтверджується появою гібридизаційного сигналу через 3 год інкубації з гормоном. Індукція була виражена сильніше при застосуванні 10 нМ концентрації гормону. При обох концентраціях глюкагону

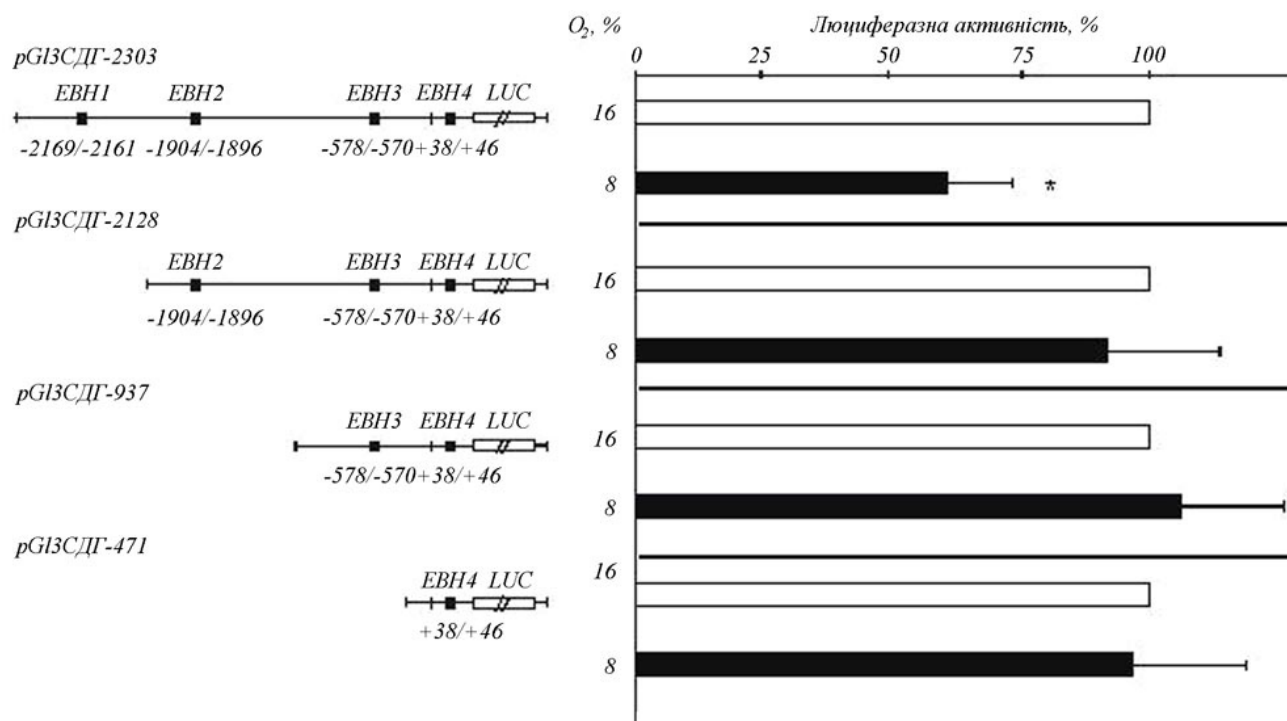


Рис. 2. Експресія люциферазних конструкцій, що містять фрагменти промотору гена *СДГ*, під дією різних концентрацій кисню. Первинні гепатоцити щура трансфікували люциферазними конструкціями, що містять 2303 ... +55 п. н., 2128 ... +55 п. н., 937 ... +55 п. н. і 471 ... +55 п. н. послідовності промотору гена *СДГ* щура. Гепатоцити культивували за умов нормоксії (16 % O<sub>2</sub>) або гіпоксії (8 % O<sub>2</sub>), як зазначено. В кожному експерименті рівень люциферазної активності для даної конструкції при нормоксії прийнято за 100 %. Вказано середні значення шести експериментів ± SEM; \*статистично значуща відмінність показників при парному порівнянні за *t*-критерієм Ст'юдента і рівнем значущості  $p < 0,05$

рівень *СДГ*-специфічної мРНК у клітинах, культивованих за умов нормоксії, був приблизно вдвічі вищим, ніж у клітинах, культивованих за умов гіпоксії (рис. 1). Отже, різниця в концентрації кисню змінювала експресію гена *СДГ* і ця відмінність зберігалася незалежно від концентрації глюкозону.

Локалізація елемента відповіді на нормоксію у промоторі гена *СДГ*. Щоб встановити, які ділянки в промоторі гена *СДГ* можуть відповідати за регуляцію його експресії залежно від концентрації кисню, нуклеотидну послідовність цього промотору аналізували на наявність ділянок, схожих на ЕВН (5'-ТТАGGTСAG-3') у промоторі гена фосфоенолпіруваткарбоксікінази-1 (*ФКК-1*) [4].

У складі промоторної ділянки гена *СДГ* (-2303...+55 п. н.) виявлено чотири потенційних ЕВН. Локалізація усіх чотирьох елементів, а саме – ЕВН-1 (-2169...-2161, 5'-TGAGGACAG-3'), ЕВН-2 (-1904...-1896, 5'-ТТАТGTGAG-3'), ЕВН-3 (-578...-570, 5'-ТТАGТССAG-3') і ЕВН-4

(+38...+46, 5'-СТАGATСAG-3') збігалася з розташуванням ЕВН *ФКК-1* у семи з дев'яти положень.

Промоторну ділянку гена *СДГ* (-2303 ... +55 п. н.) було вбудовано в полілінкер плазмідного вектора *pGl3 basic*, клоновано і нову плазмиду названо *pGl3СДГ-2303*. Первинні гепатоцити трансфікували цією плазмидою і культивували впродовж першої доби за умов нормоксії, другої – при нормоксії або гіпоксії. Люциферазна активність у клітинах, культивованих за умов гіпоксії, становила 60 % від активності, виміряної за умов нормоксії (рис. 2).

Глюкозону не впливав на експресію *pGl3СДГ-2303*, що узгоджується з даними про розташування елемента відповіді на глюкозону за межами обраного фрагмента промотору [12]. Індукція експресії *СДГ* під дією глюкозону опосередкована стимуляцією синтезу цАМФ і активацією транскрипційного фактора, що зв'язує елемент відповіді на цАМФ (ЕВЦА, англ. – CRE, cAMP responsive element). У промоторі гена *СДГ* ідентифіковано два ЕВЦА

(ЕВЦА-1, -3528 ... -3521, ЕВЦА-2, -3538 ... -3531), серед яких для глюкогон-залежної індукції необхідним є ЕВЦА-2 [12].

Щоб встановити, яка ділянка промотору *СДГ* може відповідати за модуляцію експресії цього гена в залежності від концентрації кисню, первинні гепатоцити трансфікували конструкціями, що містили в різній мірі вкорочені фрагменти промотору *СДГ* (2128 ... +55 п. н., 937 ... +55 п. н. і 471 ... +55 п. н.) (рис. 2). Конструкція *pGl3СДГ-471* містить лише ЕВН-4, *pGl3СДГ-937* – ЕВН-3 і ЕВН-4, а *pGl3СДГ-2128* – ЕВН-2, ЕВН-3 і ЕВН-4. Експресія репортерного гена під контролем кожної з перелічених конструкцій за умов нормоксії не відрізнялися від експресії за умов гіпоксії. Отже, видалення лише ЕВН-1 нівелювало здатність промотору гена *СДГ* реагувати на підвищену концентрацію кисню. Таким чином, ділянка промотору, яка опосередковує в первинних гепатоцитах щура залежність інтенсивності транскрипції гена *СДГ* від концентрації кисню, розташована в межах -2128 ... -2303 п. н.

*Біологічна активність потенційних СДГ-специфічних елементів відповіді на нормоксію в гетерологічних умовах.* Щоб з'ясувати, чи може кожний з чотирьох потенційних елементів відповіді на нормоксію у промоторі гена *СДГ* функціонувати в інших промоторах та в інших клітинах, замовили чотири олігонуклеотиди, які містили по шість копій кожного з чотирьох ЕВН. Олігонуклеотиди вбудували в полілінкер плазмідного вектора *pGl3 promoter* перед промотором SV40, за яким розташований репортерний ген люциферази. Одержані плазмиди отримали назви *pGl3СДГ-ЕВН1*, *pGl3СДГ-ЕВН2*, *pGl3СДГ-ЕВН3* і *pGl3СДГ-ЕВН4*. Експресія люциферазного гена в первинних гепатоцитах щура, які трансфікували зазначеними плазмидами, суттєво не відрізнялася за умов культивування при різних концентраціях кисню. Проте в клітинах гепатоми (НерG2) одна з досліджуваних конструкцій (*pGl3СДГ-ЕВН2*) за умов нормоксії на 40 % підвищувала транскрипцію репортерного гена (рис. 3). У клітинах HeLa дві конструкції з чотирьох (*pGl3СДГ-ЕВН1* і *pGl3СДГ-ЕВН2*) підвищували експресію репортерного гена за умов нормоксії на 30 % порівняно з експресією за умов гіпоксії (рис.

3). Ці результати вказують на те, що деякі потенційні елементи відповіді на нормоксію з промотору гена *СДГ* є активнішими в імморталізованих клітинах. Є дані, що при онкологічних захворюваннях імморталізовані клітини часто перебувають в умовах гіпоксії і у випадках окремих типів раку активується ФІГ-1, який посилює експресію цілої низки генів, що містять ЕВГ і відповідають за виживання, метастазування та ангіогенез [13, 14]. З іншого боку, відомо про існування онкогенних білків, які індукуються нормоксією (наприклад, активатори плазміногену) [15–16], і гіпотетична активація факторів, що стимулюють ЕВН, внаслідок генетичних змін при онкологічних перетвореннях могла б активувати ці білки навіть за умов гіпоксії.

Як контроль у цих експериментах використано конструкцію *pGl3ЕПО-ЕВГ*, що містить три копії ЕВГ, притаманні промотору гена еритропоетину [9] і розташовані перед промотором SV40 і геном люциферази. Як і очікувалось, люциферазна активність в усіх трьох типах клітин, трансфікованих *pGl3ЕПО-ЕВГ* і культивованих за умов гіпоксії, була значно вищою за активність при культивуванні за умов нормоксії (рис. 3). Це свідчить про те, що індукування репортерної активності гена люциферази при нормоксії у нашому дослідженні є специфічним наслідком збільшення вмісту кисню в клітинах, а не результатом посилення енергетичного метаболізму, що узгоджується з опублікованими даними [1, 11].

Хоча вже ідентифіковано багато генів, експресія яких активується за умов нормоксії у порівнянні з гіпоксією [1], однак дуже мало відомо про механізми цього процесу. Крім ЕВН у промоторі гена *ФКК-1* [4], гомологічними до якого є ідентифіковані у даному дослідженні послідовності в промоторі гена *СДГ*, описано також елемент, що відповідає за індукцію гена глутатіонпероксидази при нормоксії і який має іншу, відмінну від ЕВН *СДГ*, послідовність нуклеотидів [3, 5]. Також описано випадки інгібування експресії певних генів фактором ФІГ-1 за умов гіпоксії із зняттям цього інгібування при підвищенні вмісту кисню [17]. Отже, на даний момент неможливо визначити, чи існує загальний механізм регуляції генної експресії під дією нормоксії порівняно з гіпоксією. Проте

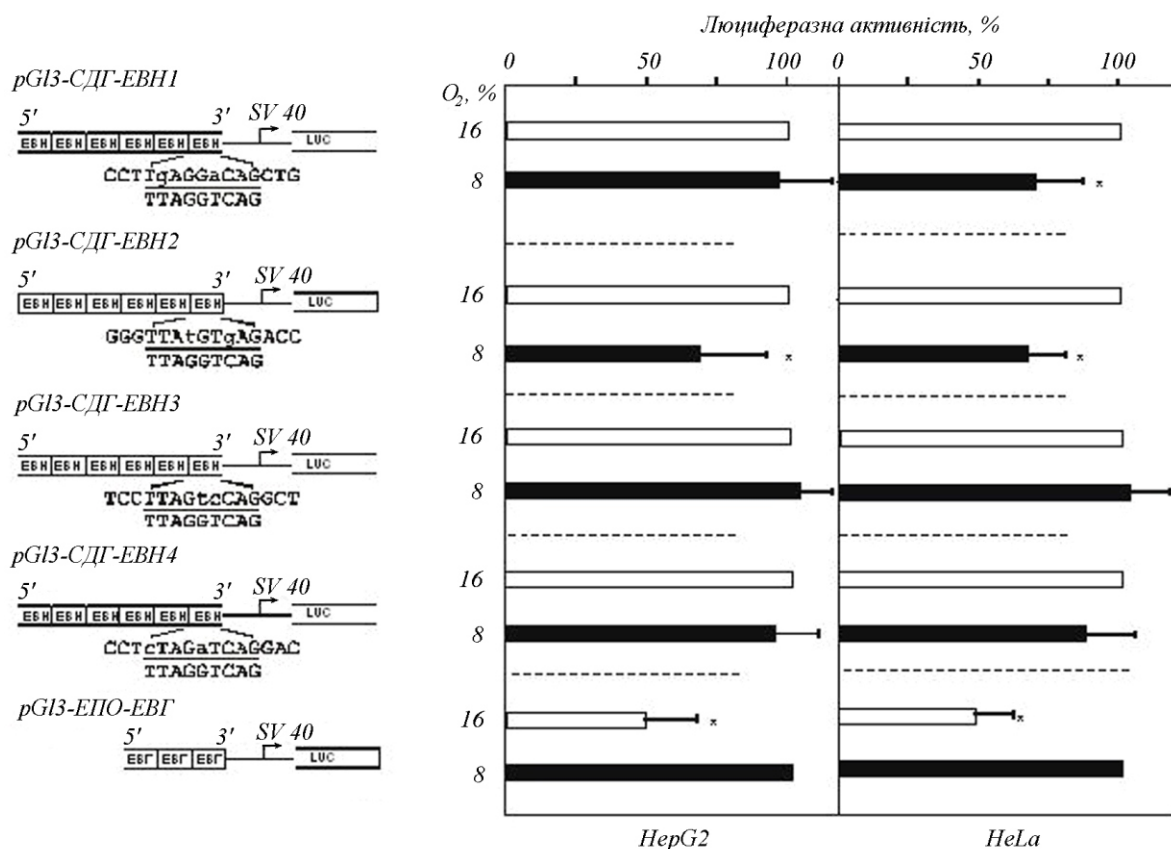


Рис. 3. Експресія люциферазних конструкцій, що містять ЕВН з промотору гена *СДГ*, в гетерологічних умовах. Клітини HepG2 і HeLa трансфікували люциферазними конструкціями *pGI3-СДГ-ЕВН1*, *pGI3-СДГ-ЕВН2*, *pGI3-СДГ-ЕВН3*, *pGI3-СДГ-ЕВН4* або *pGI3-ЕПО-ЕВГ*. У кожному експерименті рівень люциферазної активності для даної конструкції при нормоксії (для конструкції *pGI3-ЕПО-ЕВГ* – гіпоксії) прийнято за 100 %. Вказано середні значення трьох експериментів SEM; \*статистично значуща відмінність показників при парному порівнянні за *t*-критерієм Ст'юдента і рівнем значущості  $p < 0,05$ . Послідовності, наведені у верхньому ряду, відповідають ЕВН промотору гена *СДГ*; у нижньому – ЕВН промотору гена *ФКК-1*

здатність ЕВН, виявлених нами, бути активними в промоторах інших генів і в клітинах іншого типу за умов нормоксії свідчить на користь того, що цей механізм не є характерним лише для гена *СДГ*.

Нашим дослідженням встановлено, що експресія гена *СДГ* у первинних гепатоцитах щура вища за умов нормоксії (16 % O<sub>2</sub>), ніж помірної гіпоксії (8 % O<sub>2</sub>). Хоча нормоксія сама по собі не є достатнім стимулом, щоб індукувати експресію *СДГ* за відсутності глюкозону, однак за наявності останнього залежна від кисню регуляція експресії гена *СДГ* зберігалася незалежно від його концентрації. Більше того, активність репортерного гена люциферази, контрольованого промотором гена *СДГ*, не була обумовлена присутністю глюкозону, проте активувалася нормоксією. Також нами локалізовано ділянку промотору гена *СДГ*,

відповідальну за залежну від кисню регуляцію його експресії, і виявлено ЕВН, які можуть функціонувати в гетерологічних умовах.

A. A. Samoylenko, N. N. Tepluk, M. Yu. Obolenskaya, T. Kietzmann

Oxygen as a regulator of serine dehydratase (SerDH) gene expression

Summary

An oxygen gradient is formed in the liver due to the unidirectional blood flow from the portal vein and hepatic artery to the central vein and due to the oxygen-consuming metabolic processes of the cells along the sinusoid. This gradient appears to be one of the major factors responsible for differential expression of a number of genes between periportal and perivenous zones of liver sinusoid. The serine dehydratase (SerDH) gene is predominantly expressed in the hepatocytes of periportal zone. Northern blot analysis and transfections with the SerDH promoter luciferase constructs containing SerDH promoter (-2303 ... +55 bp) upstream of the Firefly luciferase gene demonstrated that the SerDH expression was higher under normoxia (16 % O<sub>2</sub>) as compared to hypoxia (8 %

*O<sub>2</sub>*). Four putative normoxia responsive elements (NRE) were found in the SerDH promoter (NRE-1, NRE-2, NRE-3, NRE-4). To identify which of these elements is functional in hepatocytes, several plasmids containing 6 copies of putative SerDH NRE's upstream of the SV40 promoter and the Firefly luciferase gene were constructed. It was found that NRE-2 in both HeLa and HepG2 cells as well as NRE-1 in HeLa cells were responsible for the O<sub>2</sub>-dependent SerDH gene expression.

**Keywords:** serine dehydratase gene, transcription regulation, reporter gene, luciferase, hepatocytes, normoxia

А. А. Самойленко, Н. Н. Теплоу, М. Ю. Оболенская,  
Т. Китцманн

Кислород в межклеточном пространстве гепатоцитов как регулятор транскрипции гена сериндегидратазы.

#### Резюме

В связи с односторонним движением крови от портальной вены и печеночной артерии к центральной вене и из-за использования кислорода клетками синусоида в печени формируется градиент концентрации кислорода. Его различные концентрации определяют неравномерную экспрессию генов в клетках, расположенных в перипортальной и перивенозной зонах печеночного синусоида. Ген, кодирующий сериндегидратазу (СДГ), является типичным представителем генов, преимущественно экспрессирующихся в гепатоцитах перипортальной зоны синусоида. Нозерн-блот гибридизация и трансфекция первичных гепатоцитов крысы конструкцией, содержащей репортерный ген люциферазы под контролем промотора гена СДГ (-2303 ... +55 п. н.), выявили, что экспрессия СДГ выше при нормоксии (16 % O<sub>2</sub>), чем при гипоксии (8 % O<sub>2</sub>). Четыре потенциальных элемента ответа на нормоксию (ЭОН) обнаружены в промоторе гена СДГ (ЭОН-1, ЭОН-2, ЭОН-3 и ЭОН-4). Чтобы установить, какой из этих элементов функционирует в гепатоцитах, клетки трансфицировали конструкциями с репортерным геном люциферазы, находящимся под контролем в разной мере укороченных участков промотора гена СДГ. Трансфекция клеток HeLa и HepG2 конструкциями, содержащими шесть последовательно расположенных копий каждого из потенциальных ЭОН перед промотором SV40 и репортерным геном люциферазы, показала, что ЭОН-2 в клетках HeLa и HepG2, а ЭОН-1 в клетках HeLa участвуют в регуляции транскрипции гена СДГ при нормоксии.

**Ключевые слова:** ген сериндегидратазы, регуляция транскрипции, репортерный ген, люцифераза, гепатоциты, нормоксия.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Jungermann K., Kietzmann T. Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver // *Hepatology*.—2000.—**31**.—P. 255–260.
2. Semenza G. L. Regulation of physiological responses to continuous and intermittent hypoxia by hypoxia-inducible factor 1 // *Exp. Physiol.*—2006.—**91**.—P. 803–806.
3. Cowan D. B., Weisel R. D., Williams W. G., Mickle D. A. G. Identification of oxygen responsive elements in the 5'-flanking region of the human glutathione-peroxidase gene // *J. Biol. Chem.*—1993.—**268**.—P. 26904–26910.

4. Bratke J., Kietzmann T., Jungermann K. Identification of an oxygen responsive element in the 5'-flanking sequence of the rat cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase-1 gene, modulating its glucagon-dependent activation // *Biochem. J.*—1999.—**339**.—P. 563–569.
5. Merante F., Altamentova S. M., Mickle D. A. G., Weisel R. D., Thatcher B. J., Martin B. M., Marshall J. G., Tumati L. C., Cowan D. B., Li R. K. The characterization and purification of a human transcription factor modulating the glutathione peroxidase gene in response to oxygen tension // *Mol. and Cell. Biochem.*—2002.—**229**.—P. 73–83.
6. Ogawa H., Fujioka M., Matsuda Y., Su Y., Dunn T., Miller D. A., Pitot H. C. Sequence of the rat serine dehydratase gene // *Nucl. Acids Res.*—1988.—**16**.—P. 10921–10923.
7. Su Y., Kanamoto R., Miller D. A., Ogawa H., Pitot H. C. Regulation of the expression of the serine dehydratase gene in the kidney and liver of the rat // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1990.—**170**.—P. 892–899.
8. Berry M. N., Friend D. S. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells – A biochemical and fine structural study // *J. Cell Biol.*—1969.—**43**.—P. 506–520.
9. Kietzmann T., Cornesse Y., Brechtel K., Modarresi S., Jungermann K. Perivenous expression of the mRNA of the three hypoxia-inducible factor alpha-subunits, HIF1alpha, HIF2alpha and HIF3alpha, in rat liver // *Biochem. J.*—2001.—**354**.—P. 531–537.
10. Immenschuh S., Hinke V., Ohlmann A., Gifhorn-Katz S., Katz N., Jungermann K., Kietzmann T. Transcriptional activation of the haem oxygenase-1 gene by cGMP via a cAMP response element/activator protein-1 element in primary cultures of rat hepatocytes // *Biochem. J.*—1998.—**334**.—P. 141–146.
11. Samoylenko A., Roth U., Jungermann K., Kietzmann T. The upstream stimulatory factor-2a inhibits plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by binding to a promoter element adjacent to the hypoxia-inducible factor-1 binding site // *Blood*.—2001.—**97**.—P. 2657–2666.
12. Haas M. J., Pitot H. C. Glucocorticoids stimulate CREB binding to a cyclic-AMP response element in the rat serine dehydratase gene // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1999.—**362**.—P. 317–324.
13. Harris A. L. Hypoxia – a key regulatory factor in tumor growth // *Nat. Revs Cancer*.—2001.—**2**.—P. 38–46.
14. Semenza G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy // *Nat. Revs Cancer*.—2003.—**3**.—P. 721–732.
15. Pinsky D. J., Liao H., Lawson C. A., Yan S. F., Chen J., Carmeliet P., Loskutoff D. J., Stern D. M. Coordinated induction of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and inhibition of plasminogen activator gene expression by hypoxia promotes pulmonary vascular fibrin deposition // *J. Clin. Invest.*—1998.—**102**.—P. 919–928.
16. Pillay V., Dass C. R., Choong P. F. The urokinase plasminogen activator receptor as a gene therapy target for cancer // *Trends Biotechnol.*—2007.—**25**.—P. 33–39.
17. Narravula S., Colgan S. P. Hypoxia-inducible factor 1-mediated inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression during hypoxia // *J. Immunol.*—2001.—**166**.—P. 7543–7548.