

ЕКСПРЕСІЯ мРНК HIF-1 α , HIF-2 α ТА VHL У РІЗНИХ ЛІНІЯХ КЛІТИН ПРИ ГІПОКСІЇ

А. Ю. БОБАРИКІНА¹, Д. О. МІНЧЕНКО¹, І. Л. ОПЕНТАНОВА¹, О. О. КОВТУН¹,
С. В. КОМІСАРЕНКО¹, Г. ЕСУМІ², О. Г. МІНЧЕНКО¹

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: ominchenko@yahoo.com

²Науковий інститут Національного онкологічного центру Японії

З'ясовано, що експресія мРНК α -субодиниці транскрипційного фактора-1 (HIF-1 α), індукованого гіпоксією, в різних лініях клітин суттєво знижується як при гіпоксії, так і за дії диметилноксалілгліцину, який імітує ефекти гіпоксії в умовах нормоксії. Разом із тим, зниження експресії мРНК HIF-1 α в умовах гіпоксії та за дії диметилноксалілгліцину супроводжується індукцією білка α -субодиниці HIF-1 α (pHIF-1 α) і посиленням експресії ряду залежних від гіпоксії генів (VEGF, Glut1, ФФКФБ-3 та ФФКФБ-4). Це свідчить про незалежний від транскрипції шлях індукції pHIF-1 α та активності транскрипційного комплексу HIF, а також про пригнічення експресії мРНК HIF-1 α . Дезферіоксамін та хлорид кобальту мають аналогічну до гіпоксії і диметилноксалілгліцину дію на експресію мРНК HIF-1 α , що є показником залежності процесу експресії даної мРНК не лише від рівня кисню, а й від наявності іонів заліза. Крім того, виявлено, що в деяких лініях клітин (SKBR3, MDA-MB-468 і BT549) експресія мРНК HIF-1 α при гіпоксії істотно не змінюється. В цих клітинах в умовах гіпоксії зменшується експресія мРНК HIF-2 α – транскрипту іншого гена, що також кодує синтез α -субодиниці транскрипційного комплексу HIF. Одержані результати вказують на клітинно-специфічний характер регуляції експресії генів HIF- α при гіпоксії. До того ж, експресія ФФКФБ-4 у клітинах ліній SKBR3, MDA-MB-468 та BT549 посилюється в умовах гіпоксії значно меншою мірою порівняно з іншими лініями клітин, в яких адаптація до гіпоксії контролюється pHIF-1 α . Експресія мРНК супресора пухлинного росту von Hippel-Lindau (VHL), який відповідає за убіквітинацію α -субодиниці HIF, при гіпоксії також знижується. Результати роботи свідчать про пригнічення експресії мРНК HIF-1 α і HIF-2 α при гіпоксії та про клітинно-специфічний характер її регуляції.

Ключові слова: HIF-1 α , HIF-2 α , VHL, гіпоксія, диметилноксалілгліцин.

Гіпоксія є своєрідним ключем до розшифровки низки тонких молекулярних механізмів регуляції процесів обміну речовин і дає можливість глибше зрозуміти молекулярні механізми перебігу фізіологічних і патологічних процесів в організмі (хронічних запалень, злоякісного росту, утворення склеротичних бляшок, ускладнень цукрового діабету). Адаптація організму до умов гіпоксії досить складна і багатогранна. Значною мірою адаптація ініціюється унікальним сенсорним механізмом контролю рівня кисню, що знаходиться в кожній клітині тіла [1–6]. Гіпоксія є важливим компонентом формування та росту більшості злоякісних пухлин і пов'язана не лише з утворенням пухлин і метастазів, але й із резистентністю пухлин до лікувальних засобів [7–9]. Основним фактором регуляції транскрипції, що опосередковує адаптацію клітин до гіпоксії, також як і перебіг ряду патологічних процесів, є транскрипційний фактор HIF, який значно активується в умовах гіпоксії та

індукує процеси транскрипції, зв'язуючись зі специфічними послідовностями регуляторних ділянок певних генів [3,9–13]. Транскрипційний фактор HIF є гетеродимер, до складу якого входять α - та β -субодиниці HIF (HIF- α і HIF- β), причому α -субодиниці HIF можуть бути різними [3,14]. Це пов'язано з тим, що синтез α -субодиниці HIF кодується різними генами, які відрізняються за експресією не лише в різних органах, а і в різних типах клітин одного і того самого органу, однак у більшості органів та клітин людини експресується і функціонує саме HIF-1 α [14,15]. Субодиниці HIF-1 α та HIF-2 α мають високий рівень гомології, в той час як HIF-3 α значно відрізняється від цих ізоформ і має декілька альтернативних сплайс-варіантів [15,16]. Серед них виявлено інгібіторну ізоформу HIF-3 α (IPAS), яка функціонує як домінантнегативний регулятор [16]. Транскрипційний комплекс HIF, до складу якого входить IPAS, не здатний зв'язуватися із залежними від гіпоксії регуляторними еле-

ментами генів. Відомо, що *in vivo* гіпоксія (6% кисню протягом 6 год) індукує експресію альтернативних сплайс-варіантів HIF-3 α в серці та легенях [17], які не виявляються в умовах нормального рівня кисню, що вказує на багатогранність механізмів регуляції експресії генів за гіпоксії, зокрема генів субодиниць HIF- α .

Механізми активації транскрипційного фактора HIF досить складні та багатогранні не лише за гіпоксії, а й при розвитку різноманітних патологічних процесів, які супроводжуються локальною гіпоксією. В умовах гіпоксії механізми регуляції активності HIF контролюються групою специфічних ферментів, які модифікують певні амінокислотні залишки в α -субодиниці HIF, зменшуючи, таким чином, швидкість її убіквітинації та деградації, що приводить до активації транскрипційного комплексу HIF [2,3,5,15,18–20]. За нормального рівня кисню у клітинах активність транскрипційного комплексу HIF надзвичайно низька, що обумовлено постійним розщепленням α -субодиниці цього транскрипційного комплексу за присутності кисню [2–4]. В умовах гіпоксії кількість α -субодиниці транскрипційного комплексу HIF значно збільшується, головним чином за рахунок стабілізації цього білка. Залежне від кисню розщеплення α -субодиниці HIF – це АТФ-залежний і опосередкований убіквітином процес, що контролюється низкою специфічних ферментів, які модифікують певні залишки амінокислот у молекулі HIF- α . Це залежне від кисню гідроксилування пролінових залишків (Pro-402 та Pro-564) в HIF-1 α , що каталізується ферментами PHD (пролілгідроксилаза домен-білок), потребує для зв'язування супресора пухлинного росту von Hippel-Lindau (pVHL), який є розпізнавальним компонентом E3 убіквітин-білок лігази [1,18–20].

Асоціація α -субодиниці HIF із допоміжними білками, і зокрема з pVHL, є важливим етапом її деградації. Зв'язування pVHL активується також ацетилюванням залишку лізину (Lys-532) ARD1 ацетилтрансферазою [1,3,19]. Убіквітинація HIF-1 α веде до його деградації протеасомою 26S. Для активації HIF-1 α надзвичайно важливою є взаємодія її з коактиваторами транскрипції p300 і CBP, що контролюється ферментом FHN-1 (інгібуючий HIF-1 фактор). FHN-1 блокує зв'язування p300 і CBP із HIF-1 α внаслідок залежного від кисню окислення залишку аспарагіну (Asn-803) в HIF-1 α і в такий спосіб пригнічується транскрипція генів, опосередкована HIF-1 α [22]. В умовах гіпоксії швидкість окислення проліну

та аспарагіну в α -субодиниці HIF знижується. Це призводить до того, що VHL не може зв'язуватися з HIF-1 α , в якому пролін та аспарагін не окиснені, і таким чином деградація HIF-1 α блокується. Більше того, в умовах гіпоксії з HIF-1 α можуть зв'язуватись білки-коактиватори транскрипції p300 і CBP, що необхідно для активації транскрипції залежних від HIF-1 α генів [15,22]. Встановлено, що FHN-1 проявляє активність у формі гомодимеру та інактивується при фосфорилуванні Thr-796 [22]. Показано також, що в механізмах активації HIF та індукції експресії залежних від гіпоксії генів беруть участь деякі кінази [23,24].

Залежність активності ферментів PHD від наявності кисню свідчить про те, що вони можуть бути сенсорами кисню у клітинах. Активність пролілгідроксилаз α -субодиниці HIF залежить також і від наявності іонів заліза, бо інкубація клітин із дезферіоксаміном, який є хелатором заліза, призводить до пригнічення їхньої активності [6]. Аналогічний ефект спостерігається і за присутності іонів кобальту, які конкурують із залізом за зв'язування з пролілгідроксилазами HIF-1 α і таким чином знижують їхню активність [6,25]. Разом із тим, при дослідженні дії іонів кобальту на експресію HIF-1 α в VHL-негативних клітинах карцином нирок лінії 786-0 встановлено, що pVHL не є абсолютно необхідним для деградації α -субодиниці HIF [26]. Так, у разі дії хлориду кобальту на клітини, які не мали pVHL, спостерігалось посилення експресії HIF-1 α за рахунок її стабілізації. Більше того, в разі використання експресійної системи клітин лінії COS була показана можливість убіквітинації HIF-1 α по N-кінцевій ділянці молекули незалежним від pVHL шляхом та пригнічення деградації HIF-1 α хлоридом кобальту за рахунок зв'язування іонів кобальту з обома PAS-домеями молекули HIF-1 α [26].

Принципово інший шлях активації транскрипційного комплексу HIF спостерігається у клітинах при деяких патологічних процесах, пов'язаних з активацією факторів росту та цитокінів. Фактори росту зв'язуються з рецепторами, що мають тирозинкіназну активність, і активують шляхи фосфорилування, а це, у свою чергу, приводить до активації рибосом і процесу трансляції [27,28]. Каскад реакцій, що відбувається за активації факторів росту, надзвичайно складний і забезпечує багатогранність механізмів регуляції та специфічність дії того або іншого фактора росту. Ефект сигналів від факторів росту на активність транскрипційного комплексу HIF полягає, головним

чином, у посиленні швидкості транскрипції та трансляції мРНК α -субодиниці HIF, проте можливим є вплив також на активність пролілгидроксилаз HIF. Відомо, що дія закису азоту на експресію генів є багатогранною і обумовлена як негативним впливом на активність пролілгидроксилаз HIF, так і прямою взаємодією із транскрипційним комплексом HIF у процесі його зв'язування з відповідним регуляторним елементом гена [29,30]. Нещодавно встановлено, що за дії на клітини донора закису азоту NOC18 значно посилюється експресія HIF-1 α , причому не за рахунок пригнічення гідроксилювання, убівітинації та деградації HIF-1 α [31]. Детальне вивчення механізмів дії NOC18 на експресію HIF-1 α показало, що донор закису азоту збільшує інтенсивність біосинтезу білків і HIF-1 α , зокрема посилюючи інтенсивність фосфорилування факторів регуляції трансляції 4E-BP1, p70 S6 кінази та eIF-4E, що опосередковано MAPK та фосфатидилінозитол-3-кіназним сигнальними шляхами [31]. Активність комплексу HIF посилюється також за впливу онкогенів, але меншою мірою ніж за гіпоксії [9,10,27].

Разом із тим, чітких даних про характер змін в експресії мРНК як HIF-1 α , так і HIF-2 α за гіпоксії на даний час у літературі немає [32–35]. У зв'язку з цим, метою даної роботи було вивчення експресії мРНК HIF-1 α , HIF-2 α та VHL у трансформованих клітинах різних ліній та з'ясування механізмів регуляції експресії даного гена за гіпоксії та в разі дії диметилосалілгліцину.

Методи досліджень

Досліди проводили на культурах клітин гематоми лінії Her3B, раку простати ліній PC-3, аденокарциноми грудної залози ліній MCF7, T47D, SKBR-3, BT-549 і MDA-MB-468 та клітинах лінії HeLa, які культивували згідно з протоколом виробника («ATCC», США), як описано раніше [36–38]. Для створення гіпоксії клітини витримували в інкубаторі в атмосфері зниженого рівня кисню (1% кисню, 5% діоксиду вуглецю та 94% азоту) протягом 6 годин. Умови гіпоксії моделювали також за допомогою диметилосалілгліцину (1 мМ), дезферіоксаміну (0,13 мМ) або хлориду кобальту (0,1 мМ), які моделюють ефекти гіпоксії за нормального рівня кисню.

Для виділення РНК із культивованих клітин використовували реагент Trizol («Invitrogen», США). Рівень мРНК HIF-1 α , HIF-2 α та VHL визначали методом гібридизації мРНК з антисенсорною РНК, виді-

ляючи гібриди, які не розщеплюються рибонуклеазою. Синтез радіоактивно мічених антисенсорних проб до HIF-1 α , HIF-2 α і VHL мРНК та 18 S рРНК проводили згідно з протоколом компанії «BD Biosciences Pharmingen» (США) з використанням T7 РНК-полімерази та [α - 32 P]-УТФ («Amersham Biosciences», США), як описано раніше [36]. Плазмиди для синтезу антисенсорних проб до HIF-1 α мРНК та 18 S рРНК були описані раніше [37,38]. Для створення плазмиди, яка використовувалась для синтезу антисенсорної проби до HIF-2 α мРНК, спочатку синтезували комплементарну ДНК (кДНК), використовуючи для реакції зворотної транскрипції РНК із клітин карциноми грудної залози SKBR-3 та оліго(dT). Для ампліфікації застосовували праймери (5'-GTGGCGTCTCCCTCGCAGAG-3') та (3'-CTCCAAGCTCACGACCTTGG-5'), послідовність яких була відповідна нуклеотидам 3387–3406 та 4205–4224 в HIF-2 α мРНК людини відповідно (GenBankTM accession number BC051338). Одержаний ПЛР-фрагмент кДНК клонували у плазмиді рCRII-ТОРО («Invitrogen», США). Для синтезу антисенсорної РНК та аналізу мРНК HIF-2 α використовували коротший фрагмент кДНК HIF-2 α (410 пар нуклеотидів), який вирізали рестрикційними ферментами EcoRI і BglII та клонували у плазмиді рBluescript II SK $^{+}$ («Stratagene», США), використовуючи сайти EcoRI і BamHI. Для одержання антисенсорної проби до VHL мРНК синтезували та клонували кДНК у плазмиді рCRII-ТОРО. В реакції зворотної транскрипції використовували РНК із клітин карциноми грудної залози SKBR-3 та оліго(dT), а ампліфікацію кДНК проводили за допомогою праймерів (5'-TGCTGCGCTCGGTGAACCTCG-3' та 3'-GCATTGCACATCAACGGATG-5'), послідовність яких була відповідна нуклеотидам 398–417 та 827–846 в кДНК VHL людини відповідно (GenBankTM accession number NM_000551). Антисенсорну пробу до VHL мРНК синтезували на коротшому фрагменті кДНК VHL (378 пар нуклеотидів), який вирізали рестрикційними ферментами EcoRI і BglII та клонували у плазмиді рBluescript II SK $^{+}$, використовуючи сайти EcoRI і BamHI.

Експресію мРНК визначали за допомогою аналізатора («Fujix BAS 2000 Bio-Image Analyzer»; «Fuji Photo Film Co.», Японія). Інтенсивність кожної смужки мРНК нормалізували по рівню 18S рРНК. Результати виражали як відношення мРНК до 18 S рРНК у % від контролю.

Рівень рHIF-1 α визначали в ядерних екстрактах клітин імуноблотінгом, використо-

вуючи моноклональні антитіла анти-pHIF-1 α («Novus Biologicals», США). Виділення ядерних екстрактів із клітин описано раніше [37]. Ядерні білки розділяли електрофорезом в 10%-у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію і переносили на мембрану PVDF («Immobilon», США), використовуючи напівсуху систему перенесення. Мембрану спочатку інкубували з 5%-м розчином обезжиреного молока в TPBS (буфер PBS з 0,1%-м твин-20) протягом 2 год при кімнатній температурі. Потім мембрану інкубували протягом 16 год при 4 °С з мишиними моноклональними антитілами анти-pHIF-1 α (розведення 1 : 1000). Вторинні, кон'юговані з пероксидазою хрому антимишині антитіла («IgG, Santa Cruz Biotechnology», США) використовували в розведенні 1 : 5000. Комплекс pHIF-1 α з антитілами виявляли за допомогою хемілюмінесцентних реагентів посиленої чутливості («Amersham Pharmacia Biotech», США), як описано раніше [38,39]. Кількість білка у пробах, що наносили на поліакриламідний гель, оцінювали по рівню β -актину на блятах за допомогою антитіл до β -актину людини.

Результати та обговорення

В умовах гіпоксії вивчали механізми регуляції експресії мРНК α -субодиниць, що індукуються гіпоксією, транскрипційного фактора-1 та 2 (HIF-1 α та HIF-2 α), використовуючи для цього вісім різних за своїм походженням та властивостями ліній трансформованих клітин. Експресію мРНК α -субодиниць HIF оцінювали методом гібридизації мРНК із антисенсорною РНК, виділяючи та аналізуючи гібриди, що не розщеплюються рибонуклеазою. Із наведених на рис. 1 даних видно, що експресія мРНК HIF-1 α у клітинах аденокарциноми передміхурової залози лінії PC-3 істотно знижується в умовах гіпоксії (1% кисню протягом 6 год). Кількісний аналіз експресії мРНК HIF-1 α у клітинах цієї лінії, проведений за допомогою аналізатора Bio-Image, показав, що рівень мРНК HIF-1 α у клітинах аденокарциноми передміхурової залози в умовах гіпоксії знижується майже в 4 рази, порівняно із клітинами, що росли в умовах нормального рівня кисню. Величину експресії мРНК HIF-1 α виражали як відношення мРНК до 18S рРНК в % від контролю. Аналогічні результати одержані також у дослідах із використанням ряду інших ліній трансформованих клітин. Так, значне зниження експресії мРНК HIF-1 α виявлено за гіпоксії у клітинах ліній HeLa та Hep3B (рис. 3, 4), а також у клітинах аденокарциноми грудної залози ліній MCF7 і T47D (рис. 5, 6).

З'ясовано, що експресія мРНК α -субодиниці HIF-1 у різних лініях клітин суттєво знижується не лише в разі дефіциту кисню, а також за дії диметилноксалілгліцину (1 мМ протягом 6 год), який є специфічним інгібітором пролілгідроксилаз pHIF-1 α і за рахунок цього підвищує рівень pHIF-1 α та імітує ефект гіпоксії в умовах нормоксії (рис. 1–6). Одержані дані свідчать про негативну кореляцію між змінами в мРНК HIF-1 α та pHIF-1 α в умовах дії диметилноксалілгліцину, а також про те, що саме збільшення рівня pHIF-1 α індукуює зниження рівня мРНК HIF-1 α .

Крім того, для моделювання ефектів гіпоксії в умовах нормоксії були проведені експерименти з використанням дезферіоксаміну та хлориду кобальту, що зменшують у клітинах кількість активних іонів заліза, необхідних для функціонування пролілгідроксилаз HIF-1 α [6,19,25]. Як видно із даних, наведених на рис. 1–3, дезферіоксамін та хлорид кобальту значно знижують експресію мРНК HIF-1 α і підвищують рівень pHIF-1 α у клітинах PC-3 та HeLa. Ці результати узгоджуються з даними з

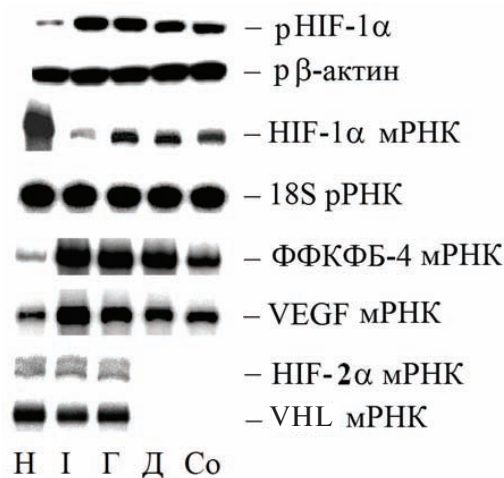


Рис. 1. Експресія білка HIF-1 α (pHIF-1 α) та HIF-1 α , HIF-2 α , VHL, VEGF і ФФКФБ-4 мРНК у клітинах аденокарциноми передміхурової залози лінії PC-3 за нормального рівня кисню (H), в умовах гіпоксії (I), а також у разі дії речовин, що моделюють ефекти гіпоксії за нормального рівня кисню: інгібітора пролілгідроксилаз диметилноксалілгліцину (I), дезферіоксаміну (D) і хлориду кобальту (Co). Клітини витримували протягом 6 год в умовах гіпоксії та з речовинами, які моделюють гіпоксію. Кількість РНК, що аналізували, оцінювали за рівнем 18 S рибосомної РНК (рРНК), а білка — за рівнем β -актину. Представлено результати типового із чотирьох незалежних експериментів.

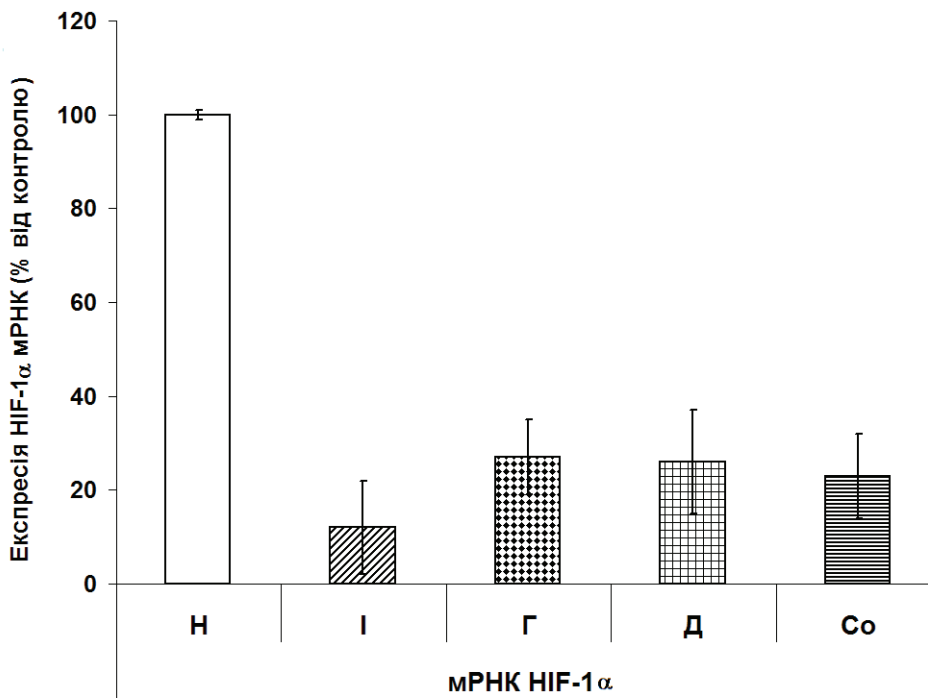


Рис. 2. Кількісна оцінка експресії мРНК HIF-1α у клітинах аденокарциноми передміхурової залози лінії PC-3 за нормального рівня кисню (H), в умовах гіпоксії (I), а також за дії речовин, що моделюють ефект гіпоксії за нормального рівня кисню: інгібітора пролілгідроксилаз диметилкоксалілгліцину (I), дезферіоксаміну (D) і хлориду кобальту (Co). Клітини витримували протягом 6 год в умовах гіпоксії (1% кисню) та з речовинами, які моделюють гіпоксію. Експресію виражали співвідношенням мРНК до 18 S рибосомної РНК (рРНК). Представлено результати чотирьох незалежних експериментів.

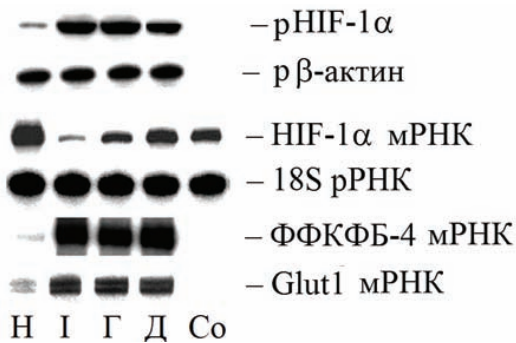


Рис. 3. Експресія білка HIF-1α (pHIF-1α) та HIF-1α, Glut1 та ΦΦКФБ-4 мРНК у клітинах HeLa за нормального рівня кисню (H), в умовах гіпоксії (I), а також за дії речовин, що моделюють ефекти гіпоксії за нормального рівня кисню: інгібітора пролілгідроксилаз диметилкоксалілгліцину (I), дезферіоксаміну (D) і хлориду кобальту (Co). Клітини витримували протягом 6 год в умовах гіпоксії та з речовинами, які моделюють гіпоксію. Кількість РНК, що аналізували, оцінювали за вмістом 18 S рибосомної РНК (рРНК), а білка — за рівнем β-актину. Представлено результати типового із чотирьох незалежних експериментів.

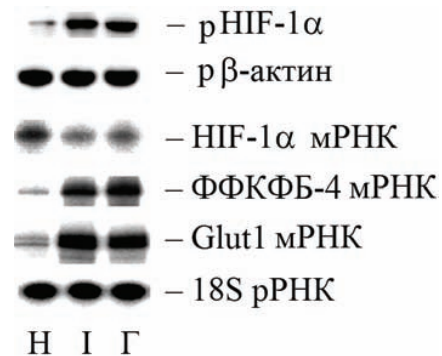


Рис. 4. Експресія білка HIF-1α (pHIF-1α) та HIF-1α, Glut1 та ΦΦКФБ-4 мРНК у клітинах гепатоми лінії Hep3B за нормального рівня кисню (H), в умовах гіпоксії (I), а також за дії диметилкоксалілгліцину (I) — речовини, яка моделює ефекти гіпоксії за нормального рівня кисню. Кількість РНК, що аналізували, оцінювали за рівнем 18 S рибосомної РНК (рРНК), а білка — за рівнем β-актину. Представлено результати типового із чотирьох незалежних експериментів.

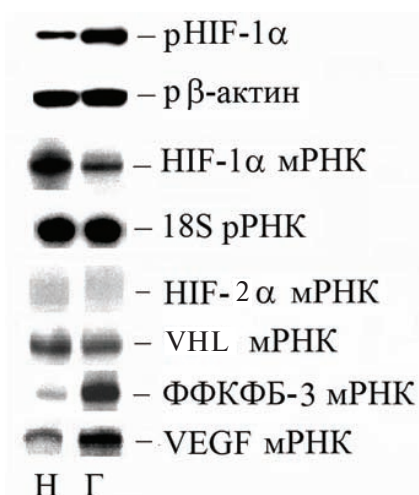


Рис. 5. Експресія білка HIF-1α (pHIF-1α), HIF-1α, HIF-2α, VHL, VEGF та ФФКФБ-3 мРНК у клітинах аденокарциноми грудної залози лінії MCF7 при нормальному рівні кисню (Н) та в умовах гіпоксії (Г), 6 год. Кількість РНК, що аналізували, оцінювали за вмістом 18 S рибосомної РНК (рРНК), а білка – за рівнем β-актину. Представлено результати типового із п'яти незалежних експериментів.

того факта, що для залежної від кисню деградації pHIF-1α специфічними пролілгідроксилазами необхідні іони заліза. А до того ж вони демонструють подібність дії дезферіоксаміну та хлориду кобальту на експресію мРНК HIF-1α до дії диметилноксалілгліцину, однак механізм дії цих речовин є різним [6,25,41,42].

Таким чином, дезферіоксамін та хлорид кобальту мають аналогічну до гіпоксії та диметилноксалілгліцину дію на експресію мРНК HIF-1α, що свідчить про залежність процесу експресії даної мРНК не лише від рівня кисню, а й від наявності іонів заліза, а також про те, що дія дезферіоксаміну та хлориду кобальту переважно опосередкована пролілгідроксилазами pHIF-1α, активність яких контролюється як киснем, так і іонами заліза [3,5,19,20,25,41]. Разом із тим, зниження експресії мРНК HIF-1α у клітинах аденокарциноми передміхурової залози лінії PC-3 в умовах гіпоксії та за дії диметилноксалілгліцину супроводжується індукцією білка α-субодиниці HIF і посиленням експресії низки відомих залежних від гіпоксії генів (VEGF та ФФКФБ-4), про що свідчать дані, наведені на рис. 1. Це підтверджує наявність протилежно спрямованих змін в експресії мРНК та білка HIF-1α в умовах гіпоксії, вказує на незалежний від транскрипції шлях індукції pHIF-1α та активності транс-

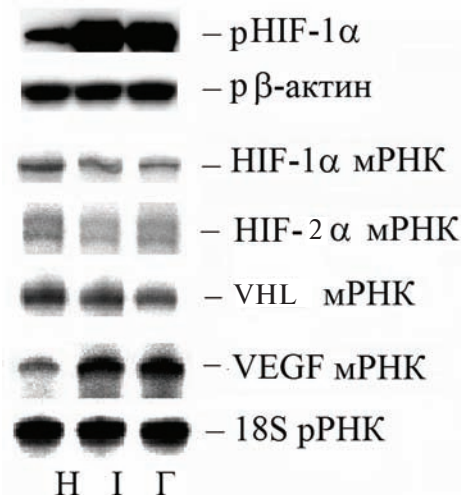


Рис. 6. Експресія pHIF-1α та мРНК HIF-1α, HIF-2α, VHL і VEGF у клітинах аденокарциноми грудної залози лінії T47D при нормальному рівні кисню (Н), в умовах гіпоксії (Г) та за дії диметилноксалілгліцину (І). Кількість РНК, що аналізували, оцінювали за рівнем 18 S рибосомної РНК (рРНК), а білка – за рівнем β-актину. Представлено результати типового із чотирьох незалежних експериментів.

крипційного комплексу HIF, а також на опосередкованість пригнічення експресії мРНК HIF-1α збільшенням рівня pHIF-1α, оскільки дія диметилноксалілгліцину спрямована на стабілізацію pHIF-1α.

Аналіз наявних на сьогодні даних стосовно експресії транскрипційного комплексу HIF за гіпоксії показав, що в більшості опублікованих робіт досліджували транскрипційну активність цього комплексу та експресію pHIF-1α [3,9–15,38,39]. У той самий час є лише поодинокі дані стосовно дії гіпоксії на експресію мРНК HIF-1α [24,32–35]. В експериментах in vivo показано, що експресія мРНК HIF-1α в різних органах тварин за гіпоксії істотно не змінюється протягом 12 год, у той самий час має місце виражена індукція pHIF-1α [32]. У деяких дослідках на культурах клітин СНО також не було виявлено зміни в експресії мРНК HIF-1α за гіпоксії (0,1% кисню, 16 год) [33], однак в інших роботах визначено зниження за таких умов рівня мРНК HIF-1α [24,35]. Нещодавно показано, що ефект гіпоксії на експресію мРНК HIF-1α деякою мірою залежить від типу досліджуваних клітин: зниження експресії мРНК HIF-1α виявлено не в усіх досліджуваних культурах клітин сім'яників [34]. Можна припустити, що ефект гіпоксії на експресію мРНК HIF-1α залежить також від

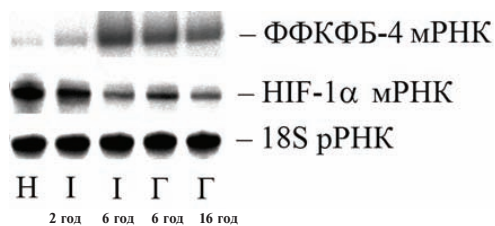


Рис. 7. Аналіз мРНК ФФКФБ-4 та HIF-1α у клітинах аденокарциноми грудної залози лінії MCF7 за нормального рівня кисню (Н), в умовах гіпоксії (Г, 6 і 16 год) та за дії диметилноксалілгліцину (І, 2 і 6 год). Кількість РНК, що аналізували, оцінювали за рівнем 18 S рибосомної РНК (рРНК). Представлено результати типового із трьох незалежних експериментів.

ступеня гіпоксії та її тривалості, але наведені на рис. 7 дані свідчать, що зниження експресії мРНК HIF-1α у клітинах аденокарциноми грудної залози лінії MCF7 спостерігається як через 6, так і через 16 годин від початку гіпоксії.

Таким чином, виявлений нами пригнічуючий ефект гіпоксії на експресію мРНК HIF-1α узгоджується з даними літератури, проте є характерним не для всіх типів клітин. Це підтверджується наведеними на рис. 8 результатами досліджень, які свідчать, що у клітинах аденокарциноми грудної залози ліній SKBR3, MDA-MB-468 та BT549 експресія мРНК HIF-1α як за гіпоксії, так і в разі дії диметилноксалілгліцину істотно не змінюється. У двох інших

лініях клітин аденокарциноми грудної залози (MCF7 та T47D) продемонстровано зниження експресії мРНК HIF-1α (рис. 5, 6). Оскільки в регуляції експресії HIF-залежних генів бере участь не лише HIF-1α, а також і HIF-2α, було доцільним порівняти вплив гіпоксії на експресію мРНК HIF-1α та мРНК HIF-2α.

Вивчення впливу гіпоксії та диметилноксалілгліцину на експресію мРНК HIF-1α і HIF-2α в різних лініях трансформованих клітин показало, що характер змін в експресії мРНК HIF-1α значною мірою визначається типом клітин і роллю рHIF-1α у процесах адаптації клітин до гіпоксії. Відомо, що в цих процесах транскрипція більшості генів і в переважній більшості клітин контролюється саме транскрипційним комплексом з рHIF-1α, а не з рHIF-2α [40]. З даних, наведених на рис. 8, видно, що у клітинах аденокарциноми грудної залози ліній SKBR3, MDA-MB-468 та BT549 знижується рівень транскрипту іншого гена, що також кодує синтез α-субодиниці транскрипційного комплексу HIF (HIF-2α), як за гіпоксії та у разі дії диметилноксалілгліцину, в той час як у клітинах інших ліній аденокарциноми грудної залози (MCF7 та T47D) експресія мРНК HIF-2α істотно не змінюється за гіпоксії та у разі дії диметилноксалілгліцину (рис. 5, 6). Не виявлено зміни в експресії мРНК HIF-2α за гіпоксії також у клітинах аденокарциноми передміхурової залози лінії PC-3 (рис. 1). Кількісний аналіз експресії мРНК HIF-1α та HIF-2α у клітинах аденокарциноми грудної за-

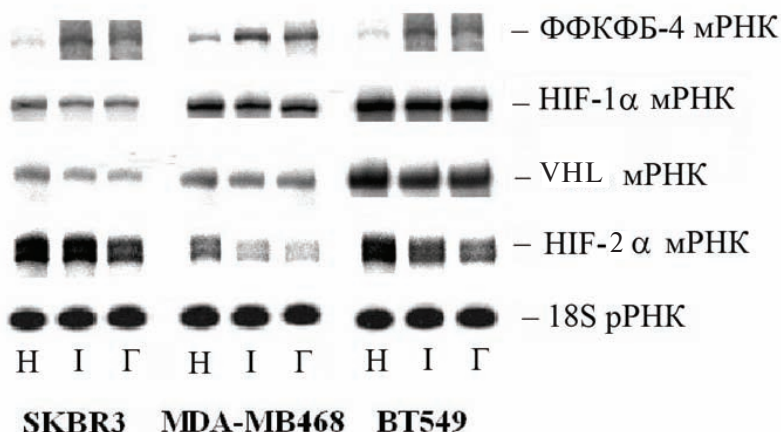


Рис. 8. Експресія HIF-1α, HIF-2α, VHL та ФФКФБ-4 мРНК у клітинах аденокарциноми грудної залози ліній SKBR3, MDA-MB-468 та BT549 у разі нормального рівня кисню (Н), в умовах гіпоксії (Г) та за дії диметилноксалілгліцину (І). Кількість мРНК, що аналізували, стандартизували за рівнем 18 S рибосомної РНК (рРНК), а білка — за рівнем β-актину. Представлено результати типового із трьох незалежних експериментів.

лози ліній MDA-MB-468 та BT549 показав, що рівень мРНК HIF-1 α в цих клітинах істотно не змінюється в умовах гіпоксії та за дії диметилноксалілгліцину, в той час як мРНК HIF-2 α знижується в 3–4 рази порівняно з клітинами, які росли в умовах нормального рівня кисню і без диметилноксалілгліцину.

Таким чином, одержані результати свідчать про клітинно-специфічний характер регуляції експресії генів HIF-1 α та HIF-2 α за гіпоксії, натомість у всіх досліджуваних лініях трансформованих клітин спостерігається індукція експресії ряду генів залежних від транскрипційного комплексу HIF. Як видно із даних, наведених на рис. 1, 3–8, гіпоксія індукує експресію генів *VEGF*, *Glut1*, *ФФКФБ-3* та *ФФКФБ-4*, що супроводжується зменшенням експресії мРНК HIF-1 α або HIF-2 α . Разом із тим слід відзначити, що у клітинах аденокарциноми грудної залози ліній SKBR3, MDA-MB-468 та BT549 експресія *ФФКФБ-4* посилюється за гіпоксії та в умовах дії диметилноксалілгліцину значно меншою мірою порівняно з іншими лініями клітин, в яких адаптація до гіпоксії контролюється рHIF-1 α . Ці результати узгоджуються з даними ряду авторів щодо нерівнозначної ролі HIF-1 α та HIF-2 α в регуляції транскрипції HIF-залежних генів, а

також експресії клітинно-специфічного характеру регуляції генів HIF-1 α - та HIF-2 α -вмістними транскрипційними комплексами HIF [40,43].

Як видно із даних на рис. 1, 5, 6, 8 та 10, експресія мРНК супресора пухлинного росту VHL знижується за гіпоксії та дії диметилноксалілгліцину у клітинах аденокарциноми передміхурової залози лінії PC-3 та у клітинах аденокарциноми грудної залози ліній MCF7, T47D, SKBR3, MDA-MB-468 та BT549, але значно меншою мірою, ніж мРНК HIF-1 α або HIF-2 α . Оскільки залежне від кисню гідроксилювання пролінових залишків у HIF- α , що каталізується специфічними пролілгідроксилазами HIF- α , потребує для зв'язування рVHL, який є розпізнавальним компонентом E3 убіквітин-білок лігази [1,18–20], то вивчення його експресії також має важливе значення для розуміння молекулярних механізмів адаптації клітин до умов гіпоксії. Одержані результати свідчать про взаємозв'язану регуляцію експресії генів HIF- α та VHL в умовах гіпоксії. Аналізуючи ці дані, можна припустити, що механізми регуляції експресії генів VHL та HIF- α за гіпоксії схожі між собою.

Таким чином, як в умовах гіпоксії, так і при моделюванні ефектів гіпоксії різними

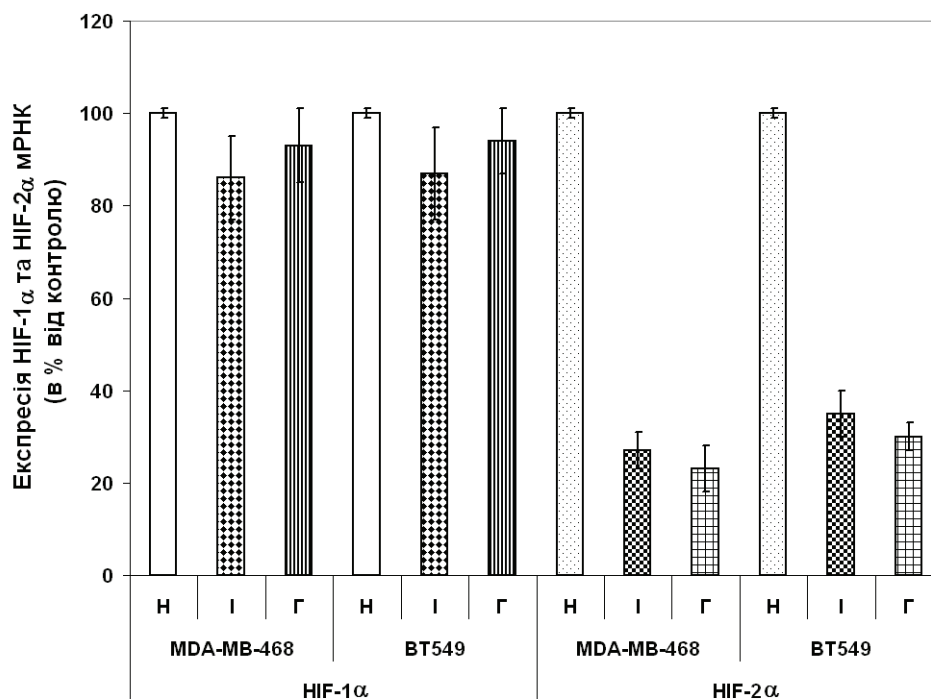


Рис. 9. Кількісна оцінка експресії мРНК HIF-1 α та HIF-2 α у клітинах аденокарциноми грудної залози ліній MDA-MB-468 та BT549 за нормального рівня кисню (H), в умовах гіпоксії (I) та за дії диметилноксалілгліцину (G). Експресію виражали відношенням мРНК до 18 S рибосомної РНК (рРНК). Представлено результати трьох незалежних експериментів.

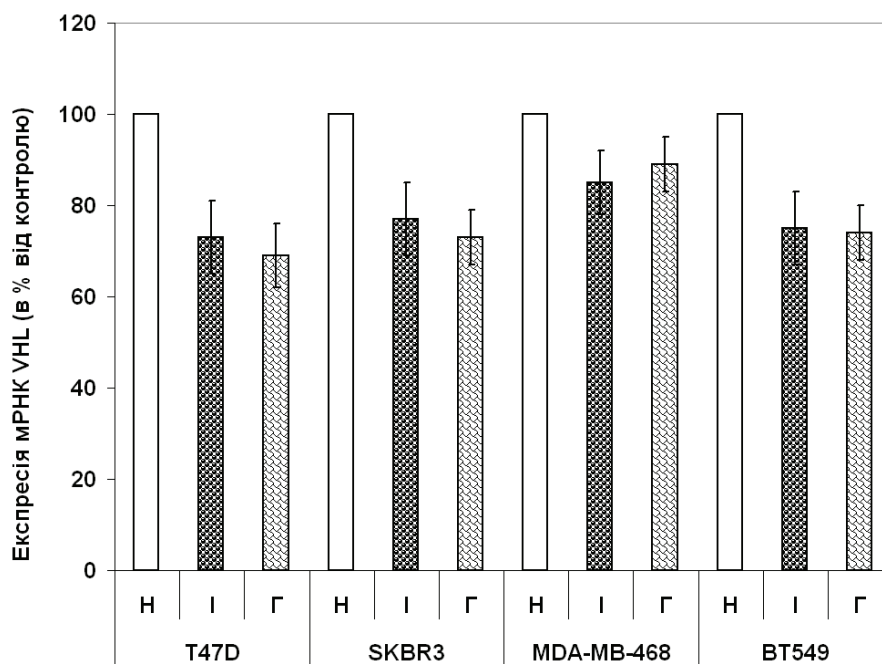


Рис. 10. Кількісна оцінка експресії мРНК VHL у клітинах аденокарциноми грудної залози ліній T47D, SKBR3, MDA-MB-468 та BT549 за нормального рівня кисню (H), в умовах гіпоксії (Г) та за дії диметил-оксалилгліцину (I). Експресію виражали відношенням мРНК до 18 S рибосомної РНК (рРНК). Представлено результати п'яти незалежних експериментів.

за механізмом дії сполуками змінюється експресія мРНК HIF-1 α і рHIF-1 α , але посилення експресії рHIF-1 α не обумовлено збільшенням експресії мРНК HIF-1 α і, більше того, супроводжується пригніченням такої експресії, що може бути наслідком як зниження інтенсивності транскрипції, так і посиленої деградації мРНК α -субодиниці HIF [35]. Можливо, що зниження рівня мРНК HIF-1 α у клітинах за гіпоксії, а також за впливу препаратів, які імітують ефекти гіпоксії, обумовлено різким зростанням рівня білка HIF-1 α в ядрах клітин і є залежним від рHIF-1 α процесом. У деяких лініях клітин в умовах гіпоксії змінюється експресія мРНК не HIF-1 α , а HIF-2 α , що є свідченням клітинно-специфічного характеру регуляції експресії генів HIF- α за гіпоксії. Експресія мРНК супресора пухлинного росту VHL, що відповідає за убіквітинацію α -субодиниці HIF, за гіпоксії також знижується, що вказує на взаємозв'язану регуляцію експресії генів HIF-1 α та VHL за таких умов. Диметил-оксалилгліцин, специфічний інгібітор проліл-гідроксилаз HIF-1 α , подібно до гіпоксії змінює експресію HIF-1 α , HIF-2 α та VHL при нормальному рівні кисню, що є показником залежного від проліл-гідроксилаз механізму індукції експресії цих генів у разі гіпоксії.

ЭКСПРЕССИЯ мРНК HIF-1 α , HIF-2 α И VHL В РАЗЛИЧНЫХ ЛИНИЯХ КЛЕТОК ПРИ ГИПОКСИИ

А. Ю. Бобарькина¹, Д. А. Минченко¹,
И. Л. Опентанова¹, А. А. Ковтун¹,
С. В. Комиссаренко¹, Г. Эсуми²,
А. Г. Минченко¹

¹Институт биохимии им. О. В. Палладина
НАН Украины, Киев;

²Научный институт Национального
онкологического центра Японии;
e-mail: ominchenko@yahoo.com

Экспрессия мРНК α -субъединицы индуцируемого гипоксией транскрипционного фактора-1 (HIF-1 α) в различных линиях клеток существенно снижается как при гипоксии, так и при действии диметил-оксалилгліцина, который имитирует эффекты гипоксии в условиях нормоксии. Вместе с тем, снижение экспрессии мРНК HIF-1 α в условиях гипоксии и при действии диметил-оксалилгліцина сопровождается индукцией белка HIF-1 α (рHIF-1 α) и усилением экспрессии ряда зависимых от гипоксии генов (*VEGF*, *Glut1*, *ФФКФБ-3* и *ФФКФБ-4*). Это указывает на независимую от транскрипции индукцию рHIF-1 α и активности транскрипционного комплекса HIF. Дез-

ферриоксамин и хлорид кобальта оказывают аналогичное гипоксии и диметилаланилглицину действие на экспрессию мРНК HIF-1 α , что указывает на зависимость процесса экспрессии этой мРНК не только от уровня кислорода, а и от наличия ионов железа. Кроме того, выявлено, что в некоторых линиях клеток (SKBR3, MDA-MB-468 и BT549) экспрессия мРНК HIF-1 α при гипоксии существенно не изменяется. В этих клетках уменьшается экспрессия мРНК HIF-2 α , транскрипта другого гена, который также кодирует синтез α -субъединицы транскрипционного комплекса HIF. Полученные результаты указывают на клеточно-специфический характер регуляции экспрессии генов HIF- α при гипоксии. Более того, экспрессия гена *ФФКФБ-4* в клетках линий SKBR3, MDA-MB-468 и BT549 в условиях гипоксии усиливается в значительно меньшей степени, чем в других линиях клеток, в которых адаптация к гипоксии контролируется pHIF-1 α . Экспрессия мРНК супрессора опухолевого роста von Hippel-Lindau (VHL), который участвует в убиквитинации α -субъединицы HIF, также снижается при гипоксии. Результаты работы свидетельствуют об угнетении экспрессии мРНК HIF-1 α и HIF-2 α при гипоксии и о клеточно-специфическом характере ее регуляции.

Ключевые слова: HIF-1 α , HIF-2 α , VHL, гипоксия, диметилаланилглицин.

HIF-1 α , HIF-2 α AND VHL mRNA EXPRESSION IN DIFFERENT CELL LINES UNDER HYPOXIA

A. Yu. Bobarykina¹, D. O. Minchenko¹,
I. L. Opentanova¹, O. O. Kovtun¹,
S. V. Komisarenko¹, H. Esumi²,
O. H. Minchenko¹

¹Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine;
e-mail: ominchenko@yahoo.com

²National Cancer Center, Research Institute, East Kashiwa, Chiba, Japan;

Summary

Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) mRNA expression is significantly decreased under hypoxia in different cell lines exposed directly to hypoxia or treated with dimethylalanylglycine which mimics hypoxic effects under normoxic conditions. However, the decreased expression of HIF-1 α mRNA is accompanied by an increase of HIF-1 α protein (pHIF-1 α) level as well as by overexpression of known HIF-dependent genes (*VEGF*, *Glut1*, *PFKFB-3*

and *PFKFB-4*) under hypoxic conditions or with the use of dimethylalanylglycine. Expression of HIF-1 α mRNA also depends on iron because desferrioxamine and cobalt chloride produce similar to hypoxia effects on the levels of this mRNA. It was shown that HIF-1 α mRNA expression did not change significantly in some cell lines (SKBR3, MDA-MB468 and BT549) under hypoxia. However, in these cell lines hypoxia decreases expression of HIF-2 α mRNA, another member of HIF- α gene family, as a result of cell specific regulation of HIF- α genes under hypoxia. Moreover, hypoxia slightly induces expression of PFKFB-4 mRNA in SKBR3, MDA-MB468 and BT549 as compared to other cell lines where this effect of hypoxia was much stronger and adaptation to hypoxia is controlled by HIF-1 α . Hypoxia slightly reduces expression of tumor suppressor VHL which targets HIF-1 α for ubiquitination. Thus, our results clearly demonstrated down regulation of HIF-1 α or HIF-2 α in different cell lines by hypoxia.

Key words: HIF-1 α , HIF-2 α , VHL, hypoxia, dimethylalanylglycine.

1. Ivan M., Kondo K., Yang H. et al. // Science. — 2001. — **292**, N 5516. — P. 464–468.
2. Ratcliffe P. J. // Blood Purif. — 2002. — **20**, N 5. — P. 445–450.
3. Wenger R. H. // FASEB J. — 2002. — **16**, N 10. — P. 1151–1162.
4. Metzen E., Ratcliffe P. J. // Biol. Chem. — 2004. — **385**, N 3–4. — P. 223–230.
5. Schofield C. J., Ratcliffe P. J. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. — 2004. — **5**, N 5. — P. 343–354.
6. Bruick R. K. // Genes Dev. — 2003. — **17**, N 21. — P. 2614–2623.
7. Warburg O. // Science — 1956. — **123**, N 3191. — P. 309–314.
8. Vaupel P. // Adv. Exp. Med. Biol. — 1996. — **388**. — P. 341–351.
9. Ryan H. E., Poloni M., McNulty W. et al. // Cancer Res. — 2000. — **60**, N 15. — P. 4010–4015.
10. Lu H., Forbes R. A., Verma A. // J. Biol. Chem. — 2002. — **277**, N 26. — P. 23111–23115.
11. Wykoff C. C., Pugh C. W., Harris A. L. et al. // Novartis Found. Symp. — 2001. — **240**. — P. 212–225.
12. Ratcliffe P. J., O'Rourke J. F., Maxwell P. H., Pugh C. W. // J. Exp. Biol. — 1998. — **201**, Pt. 8. — P. 1153–1162.
13. Semenza G. L. // J. Appl. Physiol. — 2004. — **96**, N 3. — P. 1173–1177.
14. Huang L. E., Bunn H. F. // J. Biol. Chem. — 2003. — **278**, N 22. — P. 19576–19578.
15. Hu C. J., Wang L. Y., Chodosh L. A. et al. // Mol. Cell. Biol. — 2003. — **24**, N 24. — P. 9361–9374.

16. Makino Y., Cao R. H., Svensson K. et al. // Nature (London). – 2001. – **414**, N 6863. – P. 550–554.
17. Makino Y., Kanopka A., Wilson W. J. et al. // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**, N 36. – P. 32405–32408.
18. Min J.-H., Yang H., Ivan M. et al. // Science. – 2002. – **296**, N 5574. – P. 1886–1889.
19. Masson N., Ratcliffe P. J. // J. Cell Sci. – 2003. – **116**, N 15. – P. 3041–3049.
20. Appelhoff R. J., Tian Y.-M., Raval R. R. et al. // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**, N 37. – P. 38458–38465.
21. Mahon P. C., Hirota K., Semenza G. L. // Genes Dev. – 2001. – **15**, N 20. – P. 2675–2686.
22. Lancaster D. E., McNeill L. A., McDonough M. A. et al. // Biochem. J. – 2004. – **383**, Pt. 3. – P. 429–437.
23. Minet E., Arnould T., Michel G. et al. // FEBS Lett. – 2000. – **468**, N 1. – P. 53–58.
24. Minchenko A., Caro J. // Mol. Cell. Biochem. – 2000. – **208**, N 1. – P. 53–62.
25. Gleadle J. M., Ebert B. L., Firth J. D., Ratcliffe P. J. // Am. J. Physiol. – 1995. – **268**, Pt. 1. – P. C1362–C1368.
26. Kanaya K., Kamitani T. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – **306**, N 3. – P. 750–755.
27. Bitlon R. L., Booker G. W. // Eur. J. Biochem. – 2003. – **270**, N 5. – P. 791–798.
28. Hopfl G., Ogunshola O., Gassmann M. // Am. J. Physiol. – 2004. – **286**, N 4. – P. R608–R623.
29. Metzzen E., Zhou J., Jelkmann W. et al. // Mol. Biol. Cell – 2003. – **14**, N 8. – P. 3470–3481.
30. Kimura H., Weisz A., Kurashima Y. et al. // Blood – 2000. – **95**, N 1. – P. 189–197.
31. Kasuno K., Takabuchi S., Fukuda K. et al. // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**, N 4. – P. 2550–2558.
32. Stroka D. M., Burkhardt T., Desbaillets I. et al. // FASEB J. – 2001. – **15**, N 13. – P. 2445–2453.
33. Vaux E. C., Wood S. M., Cockman M. E. et al. // J. Biol. Chem. – 2001. – **276**, N 47. – P. 44323–44330.
34. Marti H. H., Katschinski D. M., Wagner K. F. et al. // Mol. Endocrinol. – 2002. – **16**, N 2. – P. 234–243.
35. Uchida T., Rossignol F., Matthay M. A. et al. // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**, N 15. – P. 14871–14878.
36. Minchenko O. H., Ochiai A., Opentanova I. L. et al. // Biochimie – 2005. – **87**, N 11. – P. 1005–1010.
37. Minchenko A., Bauer T., Salceda S., Caro J. // Lab. Invest. – 1994. – **71**, N 3. – P. 374–379.
38. Minchenko A. G., Leshchinsky I., Opentanova I. et al. // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**, N 8. – P. 6183–6187.
39. Minchenko O. H., Opentanova I. L., Minchenko D. O. et al. // FEBS Lett. – 2004. – **576**, N 1. – P. 14–20.
40. Sowter H. M., Raval R. R., Moore J. W. et al. // Cancer Res. – 2003. – **63**, N 19. – P. 130–134.
41. Knowles H. J., Mole D. R., Ratcliffe P. J., Harris A. L. // Ibid. – 2006. – **66**, N 5. – P. 2600–2607.
42. Mole D. R., Schlemminger I., McNeill L. A. et al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2003. – **13**, N 16. – P. 2677–2680.
43. Wiesener M. S., Jurgensen J. S., Rosenberger C. et al. // FASEB J. – 2003. – **17**, N 2. – P. 271–273.

Отримано 13.03.2006