

Клетъчният отговор на липсата на кислород

К. Хайнике¹, Т. Хофер, Р. Х. Венгер², М. Гасман

Институт по психология и ветеринарна психология, Университетът в Цюрих, Швейцария

¹ Направление Психология, Отдел Медицина, Университетът в Калифорния, Сан Диего, калифорния

² Карл-Лудвиг-Институт по психология, Университетът в Лайпциг

Резюме

Еритропоезата се индуцира от анемия, редуцирано кислородно парциално налягане (pO_2), например в големи размери и по време на физическо натоварване, както и от други фактори. Глюкопротеинът еритропоиетин (Еро) е хормон, който регулира пролиферацията, диференциацията и узряването на еритроидните клетки. Хипоксията повишава ероконцентрацията в плазмата, което води до повишаване на обема на ериторцитите и чрез това до по-добър транспорт на O_2 в кръвта. Изследвания на ерогенното регулиране показаха, че съществува общ механизъм, който управлява индукцията на различни гени, когато организмът е изключил хипоксичните условия. Ключовата функция в тази O_2 -зависима генна експресия се поема от хипокси-индуциращия фактор-1 (HIF-1), хетеродимерен транскрипционен фактор, който се състои от един α и един β (наречен също ARNT) подклас. Активирането на HIF-1 е зависимо от хипокси-обусловеното стабилизиране на α подклас (HIF-1 α), докато в това време стабилизирането на ARNT не се засяга от O_2 -концентрация. До скоро не беше известно как клетките приемат намаляването на O_2 -концентрация, което води до стабилизиране на HIF-1 α . Първият поглед в механизма, как клетките реагират на липсата на O_2 -концентрация, стана възможен с откриване на фамилия на O_2 -зависими пролихидроксилази, които влияят на стабилността на HIF-1 α . Тези пролихидроксилази маркират HIF-1 α при условия на нормално съдържание на кислород за протеазо-разграждане, като те го модифицират на два специфични пролинови остатъка. Този обзор дава информация за най-новите познания в тази област.

Ключови думи: еритропоиетин, хипокси-редуциращ фактор-1, кислороден сензор

Въведение

Кислородът (O_2) е съществено важен за живота на по-висшите организми. Като терминален електронен акцептор той служи за получаване на енергия в митохондриите.

Затова не е чудно, че по време на еволюцията са се развили различни механизми за измерване и регулиране на O_2 -концентрация в клетката и системата. Работоспособността на човешкото тяло се определя от многобройни анатомични, физиологични и генетични фактори. Важна роля играе кръвоносната система по отношение транспорта на O_2 , буферирането и терморегулацията.

Заниженото хранване с O_2 се обуславя например от престой на височини, анемия или загуба на кръв при злополука, и активира експресията на кръвообразуващия хормон еритропоиетин (Еро) (Фигура 1). Чрез кръвоносната система Еро достига до костния мозък, където се свързва с Еро-рецепторите на изпреварващи/предварителни еритроидните клетки (32). В следствие на това свързването на Еро към/с неговия рецептор води до терминално узряване на еритроидните клетки и накрая до увеличаване на броя на еритроцитите. Решаващото дразнение за синтез на Еро е понижаването на интратреналното pO_2 . Известен факт е, че чрез трениране на тялото се предизвиква повишаване на еритропоезата и повишен еритроцитен обмен (48, 60). Така тренираните атлети достигат максимални стойности на обем на еритроцити и на тотално количество на хемоглобин (22b). Интересно е, че при голямо физическо натоварване се понижава оросяването с кръв на бъбреците (5), но не се установява повишение на Еро-плазмено равнище непосредствено след натоварване на нетренирани и тренирани хора, както и след продължителни периоди на тренировки (2, 47, 59). Очевидно критичният праг на pO_2 не се превишава, което води до повишение на скоростта на Еро-синтеза. Това наблюдение показва, че O_2 -регулационен механизъм трябва да се представя комплексно, а не както е считано до сега. Възможно е други механизми, като например повишена Еро-рецепторна плътност или Еро-рецепторен афинитет, да доведат до индуцирано симулиране на активността на еритропоезата, но тези постулати трябва тепърва да се изследват.

Различно е при престой на умерени (1500–3000 м) до екстремни височини (≤ 5500 м), където след няколко часа са измерени завишени Еро-концентрации (3, 20, 22a, 52). Тренировки на достатъчна голяма височина от около 2500 м и при минимален престой от 3 седмици може да доведе до повишаване на еритроцитната маса и до максимално O_2 -поемане (VO_{2max}) (36). Интересно е, че още по време на престой на височина Еро-концентрацията отново спада до нормалните кислородни стойности (22a, 37). В обширно изследване е установено, че само около половината от участващите атлети реагират на хипоксичното дразнение (7). Групата на така наречените “отговарящи” показва голямо нарастване на Еро-концентрацията при престой на височина в сравнение с “неотговарящите”. Докато при “отговарящите” се наблюдава нарастване на еритроцитния обем и на VO_{2max} , то при “неотговарящите” не се наблюдават изменения на тези величини. Авторите обясняват тези различни реакции с индивидуалните генетични полиморфози на Еро- или Еро-рецепторни-гени. Интересно ще е да се узнае каква е еритропоиетичната реакция на “неотговарящите” във връзка с патологично обусловената анемия.

При регулярна тренировка се достига не само до привеждане в съответствие на броя на еритроцитите, но и до реакция на адаптиране на скелетната мускулатура, което се характеризира с нарастване на капиляризацията, броя на митохондриите и с активността на оксидативните ензими (21, 25, 46). Едно редуцирано pO_2 и/или метаболитно изменение в скелетната мускулатура по време на натоварването се считат като възможни първични стимули на ангиогенеза (21). При липса на O_2 се увеличава продуцираното на васкуларен ендотелиален фактор на растежа (VEGF), което води до образуване на нови кръвоносни

съдове (Фигура 1) (15). Това се потвърждава от активното нарастване на концентрацията на VEGF mRNA в биопсиите на M. Vastus lateralis след еднократно натоварване на нетренирани хора в нормоксични условия (42). Неочаквано допълнителната системна хипоксия (12% O₂) по време на натоварване не доведе до нарастване на концентрацията на VEGF mRNA. Откриха се други данни при тренирани хора. Хопелер и сътрудниците му показаха, че една симулирана хипоксия по време на повтаряща се интензивна тренировка с включена почивка в нормоксични условия (training high – living low) води до VEGF-обусловено увеличение на капиляризацията (26). Тази работна група откри постулати, че повтаряща се интензивна тренировка при хипоксия, при иначе нормоксични условия на живот, води до увеличаване на мускулната капиляризация, която не може да се постигне при тренировка в нормоксични условия.

Как обаче се приспособява отделната клетка към недостиг/липса на O₂ ? Специфичен отговор на хипоксията е наличието на транскрипционно регулиране на специфични гени, които са необходими за да се поддържа O₂-хомеостазата (50, 61). Ответният отговор на тялото се извършва на целуларно (например глюकोлиза), локално (например ангиогенеза, съдов тонус) и на системно (например еритропоезата) ниво, (Фигура 1). Хипокси-индуциращ Фактор-1 (HIF-1) играе ролята на диригент при взаимодействието на O₂-зависими фактори. С идентифицирането на целуларния O₂-сензор се достигна до научен пробив. В този обзор трябва да се направи преглед на досегашните познания в областта на молекулярния O₂-регулационен механизъм както и на O₂-зависимата генна експресия.

HIF-1 α управлява поддържането на O₂-равновесие

Идентифицирането на HIF-1 като главен регулатор на O₂-зависимата генна експресия беше първата голяма крачка в анализа на механизма, който е основата на адаптацията към хипоксичните условия. Транскрипционният фактор HIF-1 се състои от HIF-1 α и HIF-1 β (Фигура 2), при което клонирането на HIF-1 β показва, че той е вече познат/известен. HIF-1 β е идентичен с хетеродимеризионния партньор на диоксин-рецептора, т.н. арилхидрокарбон-рецептор нуклеарен транслокатор (ARNT) (18, 58). Двата HIF-1 принадлежат на подфамилията на basic-helix-loop-helix (bHLH) протеини, които притежават определена характерна последователност/секвенция (наречена PAS-домен) (58). HIF-1 α и HIF-1 β се експримира в тъканите на много биологични видове (хора, гръбначни животни, червеи, инсекти и др.) (4, 13, 51). Активирането на HIF-1 зависи изключително от индуцираното от хипоксията стабилизиране на α -подединицата, докато обратното HIF-1 β /ARNT-подединицата се експримира независимо от парциалното налягане на кислорода (pO₂). В следствие на това в противовес на HIF-1 β /ARNT, HIF-1 α -подединицата в клетъчните култури не може да се докаже над критичната граница на концентрацията на O₂. В HeLa-клетките тя е около 5% O₂ (35 mmHg) (34). Само под влияние на хипоксията или на хипокси-наподобяващи субстанции (например кобалтови соли или желязни хелатори) нараства концентрацията на HIF-1 α и води до активиране на HIF-1 α -зависими водещи/целящи се гени (Фигура 2).

Изненадващ е фактът, че HIF-1 α протеин при настъпване на липса на O₂ веднага, т.е. в рамките на секунди, е на разположение на култивираните клетки (33). Нормализира

ли се подаването на O_2 , HIF-1 α изчезва отново в рамките на няколко минути. Най-новите имунохистохимични изследвания на различни органи на мишки показаха, че в мозъка, бъбреците, черния дроб, сърцето и скелетните мускули HIF-1 α протеин е доказуем и в нормоксични условия на околната среда (53). Ако мишките се подложат на системна хипоксия (6% O_2 за 4 часа), концентрацията на HIF-1 α се повишава различно в различните органи и достига своя максимум в мозъка, бъбреците и черния дроб след 1-4 часа. Величината на pO_2 , което води до нарастване на концентрацията на HIF-1 α , както и периода/времето за достигане на максимална HIF-1 α експресия, е зависимо от съответната тъкан. Тези наблюдения доведоха до предположението, че винаги е необходима определена концентрация на HIF-1 α , за да се гарантира непрекъсната експресия на гени, които са необходими за предоставяне на достатъчна енергия за поддържане на нормалната функция на клетките. Това предположение се подкрепя чрез изследвания на HIF-1 α -дефицитни ембрионални стволови клетки в нормоксия, при която намалява базалната експресия на HIF-зависимите водещи гени (30).

Колко важен е HIF-1 α ? Изследвания на хомозиготен HIF-1 α -дефицитни зародиши на мишка (т.н. knock-out мишки, виж 17) показаха, че те не са жизнеспособни и умират (30, 44). Тези зародиши показват обременяване/затрудняване на образуването/развитието на сърцето и мозъка, както и на дефектна кръвоносна система. Очевидно HIF-1 α е жизненоважен фактор, който не може да се замести от HIF-2 α (12) или HIF-3 α (19). Тези последни фактори имат подобни функции както HIF-1 α , но не се експримира в HIF-1 α .

Експресия на HIF-1 зависими водещи гени при хипоксия

Хипоксията предизвиква интрацелуларно стабилизиране на HIF-1 α , който накрая се транспортира в ядрото на клетката. Тази нуклеарна транслокация се извършва независимо от HIF-1 β /ARNT-подединица, която се намира налична конститутивно в ядрото на клетката (9). Че HIF-1 α попада в ядрото на клетките може да се установи също и в силно HIF-1 α -свърхекспримиращи, но нормоксично култивирани клетъчни линии, (23). От това може да се направи заключение, че не е необходим никакъв друг хипоксия-зависим сигнал за нуклеарен транспорт на HIF-1 α . Ако HIF-1 α един път е попаднал в ядрото на клетката, той там се хетеродимеризира с HIF-1 β /ARNT и полученият от това HIF-1-комплекс се свързва със специфична основна/базова последователност/секвенция от O_2 -регулирущи гени (Фигура 2). Тази последователност/секвенция се нарича HIF-1 binding site (HBS) и гласи: A/GCGTG (6, 62). HBS е последователност/поредрост от ядра на т.н. hypoxia response elements (HRE), която управлява финото регулиране на HIF-1-зависими водещи гени. От няколко години е известно, че O_2 -регулираните гени притежават едно или повече копия на този HREs. Въпреки, че HIF-1 α основно се регулира от O_2 , за стабилността и транскрипционна активност на HIF-1 α на водещите гени, важна роля играят и редица други фактори. Така фосфорилирането на HIF-1 α е есенциално за нормална HIF-1-функция, която отново води след себе си повишение на транскрипцията на HIF-1 водещи гени (Фигура 3) (41). Освен това чрез различни фосфорилиращи инхибитори може да се блокира регулирането на HIF-1-зависими водещи гени (8, 28, 63).

В момента са известни над 25 такива водещи гени (24). Изхожда се от това, че това е само върхът на айсберга. Свързването на HIF-1 към HRE води до свърхекспресия на

различни фактори, които регулират отговора на организма в системна, локална и целуларна плоскост. Фигура 1 показва координиращите функции на много HIF-1-зависими водещи гени след хипоксична експозиция. Редуцираното предлагане на кислород води до повишение на Еро-нивото на системна плоскост и така до повишение на еритропоезата. Тя изисква за хемосинтеза повече желязо, което е налично благодарение на повишения синтез на трансферин и неговите рецептори. При активна хипоксия се произвежда повече енергия чрез повишаване на глюкозата и възможността за наличие на глюкоза. В същото време циркулацията на кръв се напасва, като тонуса на съдовете се модифицира чрез въздействащи на съдовете HIF-1-зависими фактори (Фигура 1).

HIF-1 α се разгражда в нормоксия: O₂-фактор

Както беше споменато по-горе, HIF-1 α протеинът не може да се докаже над критичното интрацелуларно pO₂. Многобройни изследвания показаха, че HIF-1 α не се регулира на транскрипционно ниво, а чрез стабилизиране на потенциала при хипоксични условия (62). Това означава, че HIF-1 α протеина конститутивно се синтезира и веднага отново се разгражда при нормотоксични условия през убикуетин/протеаза-деградационна каскада (Фигура 3) (27, 35, 45).

Дълго време не беше известно как клетките могат да измерват концентрацията на O₂ в тяхното обкръжение. Една от многото теории беше, че концентрацията на реактивни O₂-видове (ROS), като например супероксид или пероксид служат както предаватели на сигнала при измерване на O₂. ROS възниква в митохондриите както странични продукти на веригата на дишане. Публикуваните данни са controversни. Докато Фандрей и сътрудниците му установиха намалението на ROS при намаляване на концентрация на O₂ (14), Шумаер и сътрудниците му публикуваха, че произвеждането на ROS се стабилизира при хипоксични условия (11, 57). От миналата година е известен механизмът, който регулира стабилизирането на HIF-1 α . Ключовите ензими, които контролират O₂-зависимото разграждане на HIF-1 α , са специфични полихидрохксилази, които се нуждаят от Fe²⁺ като Co-фактор, както и от O₂ и 2-охксоглутарата като Co-субстрити (29, 31). Тези пролилхидроксилазите хидроксилират два определени пролин-остатъци, които са налични в т.н. O₂-зависими деградационни области (ODD) (Фигура 3) (38). При нормоксични условия тази хидроксиляция осъществява/подпомага специфичната интеракция на Hippel-Lindau тумор-супресорен протеин (pVHL) с HIF-1 α . pVHL съдържа унбукуитин лигаза, която извършва унбукуитирането на HIF-1 α . Като следствие се разграждат унбукуитираните HIF-1 α -молекули чрез протеазоми (Фигура 3) (10, 39, 40, 55). Аналогични резултати както при клетъчните култури са открити при *Caenorhabditis elegans* (13). С други думи: При нормоксия непрекъснато се синтезира HIF-1 α , но едновременно с това се маркира чрез закачане на OH-групи. Един път маркиран, протича HIF-1 α процес на интрацелуларно разграждане до пълно разрушаване. При липса на O₂ липсва пролилхидроксилазата, което води до това, че не могат да се закачат OH-групи. В следствие на това HIF-1 α не се разгражда, движи се в ядрото и активира съответните водещи гени след хетеродимеризиране с HIF-1 β /ARNT. Така специфичните HIF-1 α -пролилхидроксилази могат да се разглеждат като важни части на O₂-защита, ако не като същински O₂-сензори.

Медицинско значение

Може ли HIF-1 α да се използва директно за терапевтични цели? Вече се изследваха ген-терапевтичните възможности за приложение, които се базират на трансфера на HIF-1 водещи гени, като VEGF или EPO (43, 49, 56). Трансферът на гени на VEGF, на най-важният ангиогенетичен растежен фактор, е необходим при исхемични заболявания като периферно артериално запушване, диабетична невропатия и коронарна болест на сърцето (43, 49). Тъй като HIF-1 се определя и координира от нормата на транскрипция на VEGF и други ангиогенетични фактори на растежа при хипоксични условия на околната среда (50, 61), то HIF-1 трябва да предложи още едно приложение за генна терапия (24). HIF-1-генния трансфер би се определял на по-високо комплексно ниво и би могъл по този начин да действа физиологично на локалната ангиогенеза.

Терапевтичните приложения се използват за лекуване на рани, например при изгаряния с голяма повърхност, където са увредени кръвоносни съдове в непосредствена близост с раната. Тук чрез добавяне на HIF-1 или VEGF може да се ускори процесът на оздравяване.

За разлика от защитните ефекти, които HIF-1 показва при лечение на исхемични заболявания, HIF-1 може да въздейства и патологично, като способства за растежа на тумори (1). Един солиден тумор по време на растежа преминава през състояние на липса O₂, която е очевидна в центъра на тумора. За да се отстрани тази липса на O₂, туморните клетки произвежда VEGF, което води до васкуларизация и по този начин се осигурява храненето на туморната тъкан с O₂ и хранителни вещества (16). Интратуморалният трансфер на гени т.н. антисенс HIF-1 α –плазмид (54) е една от изследваните стратегии за лечение на хипоксични тумори. Тази технология се базира на това, че един комплементарен RNA-възел (антисенс RNA) се произвежда по генна технология в клетката, който разпознава първичния RNA-възел (сенс RNA), свързва го и по този начин го активира. Експресията на HIF-1 α –антисенс RNA в туморната тъкан води до намаляване на концентрацията на VEGF и следващо от това намаление на капилярната плътност. По този метод могат да се постигнат първите успехи с трайната инволюция/закърняване на по-малките тумори.

Генната терапия предлага напълно нови стратегии на лечение във все още непознати измерения. В момента се намираме в началото на изследванията, но въпреки това сега е възможна и злоупотреба с генната технология за повишаване на спортните постижения. Тази злоупотреба трябва да се предотврати със съответни закони, както и с етични и педагогични програми въз основа на най-новите научни достижения.