

УДК 577.218

ГЕНЫ «БЫСТРОГО» ОТКЛИКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ИНГИБИТОРОВ HIF ПРОЛИЛГИДРОКСИЛАЗЫ

Д.М. Хушпульян^{1,2}, С.В. Никулин^{2,3}, Т.А. Чубарь⁴, А.Ю. Христиненко²,
А.А. Полозников^{2,3}, И.Г. Газарян^{2,4*}

(¹Дальневосточный федеральный университет, школа биомедицины; ²Онкологический институт имени П.А. Герцена (филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии), отдел транскрипционной онкологии; ³Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», факультет биологии и биотехнологии; ⁴Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет; *email: igazaryan@gmail.com)

Попытки разобраться с механизмом гипоксической активации синтеза эритропоэтина привели к открытию транскрипционного фактора HIF (фактора, индуцируемого гипоксией) и регуляции его стабильности под действием HIF пролилгидроксилазы – железа и α -кетоглутаратзависимой диоксигеназы. Действие ингибиторов фермента имитирует действие гипоксии, но является гораздо более специфическим. Сравнение различных типов ингибиторов фермента с действием краткосрочной гипоксии методом транскриптомного микроанализа показывает большую эффективность действия ингибиторов и позволяет увидеть «первичные» мишени транскрипционного фактора HIF. Сила ингибиторов, определенная в транскрипционном анализе, соответствует соотношению констант полуактивации ингибиторов в HIF1 ODD-лус репортерном анализе. Нейроадапт является в 15–20 раз более мощным ингибитором, чем роксадустат, и в то же время наиболее специфичным к мишени, по сравнению с роксадустатом и диметиллоксалилглицином, которые, вероятно, действуют и на другие ферменты этой группы.

Ключевые слова: гипоксия, транскриптом, роксадустат, нейроадапт, диметиллоксалилглицин, экспрессия генов.

Исключительный коммерческий интерес к разработке ингибиторов фермента HIF пролилгидроксилазы связан с их способностью активировать транскрипцию в клетках печени эндогенного эритропоэтина, способного замедлить внутривенные вливания рекомбинантного эритропоэтина, рынок которого оценивается в 8–9 млрд долл. США. Рекомбинантный эритропоэтин появился в 1989 г. и по сей день является единственным разрешенным к применению препаратом для лечения пациентов с анемией, вызванной дисфункцией почек. Молекулярный механизм активации синтеза эритропоэтина при гипоксии интенсивно изучался в начале 90-х годов в лаборатории профессора Грэга Семензы, в результате был открыт транскрипционный фактор – HIF, белковая стабильность которого регулируется кислородом [1]. В последующие годы было показано, что стабилизация транскрипционного фактора наблюдается при использовании хелаторов железа или кобальта (имитация гипоксии), однако фермент, отвечающий за кислородзависимую деградацию альфа-субъединицы HIF – железосодержащая

α -кетоглутаратзависимая диоксигеназа (или HIF пролилгидроксилаза) – был открыт только в 2001 г. в лаборатории сэра Питера Ратклифа [2]. Гидроксирование пролина 564 в HIF α под действием нового фермента стало ключом к его распознаванию белком фон Хиппеля Линдау, входящим в убиквитинлигазный комплекс, как было установлено в лаборатории Уильяма Каэлина [3], что в конечном результате привело к убиквитинированию и протеасомной деградации HIF α (рис. 1). За открытие механизма клеточного ответа на гипоксию и адаптацию к ней трем вышеупомянутым ученым была присуждена Нобелевская премия по медицине в 2019 г. Новый фермент сразу после открытия стал мишенью для разработки ингибиторов, но довольно примечательно, что несмотря на их разнообразие, только структурные аналоги α -кетоглутарата (рис. 2, структуры 3, 4) вышли на финишную прямую в результате клинических испытаний. В настоящее время ингибиторы фермента изучаются в различных моделях острых и хронических нейродегенеративных заболеваний, поскольку не только активируют

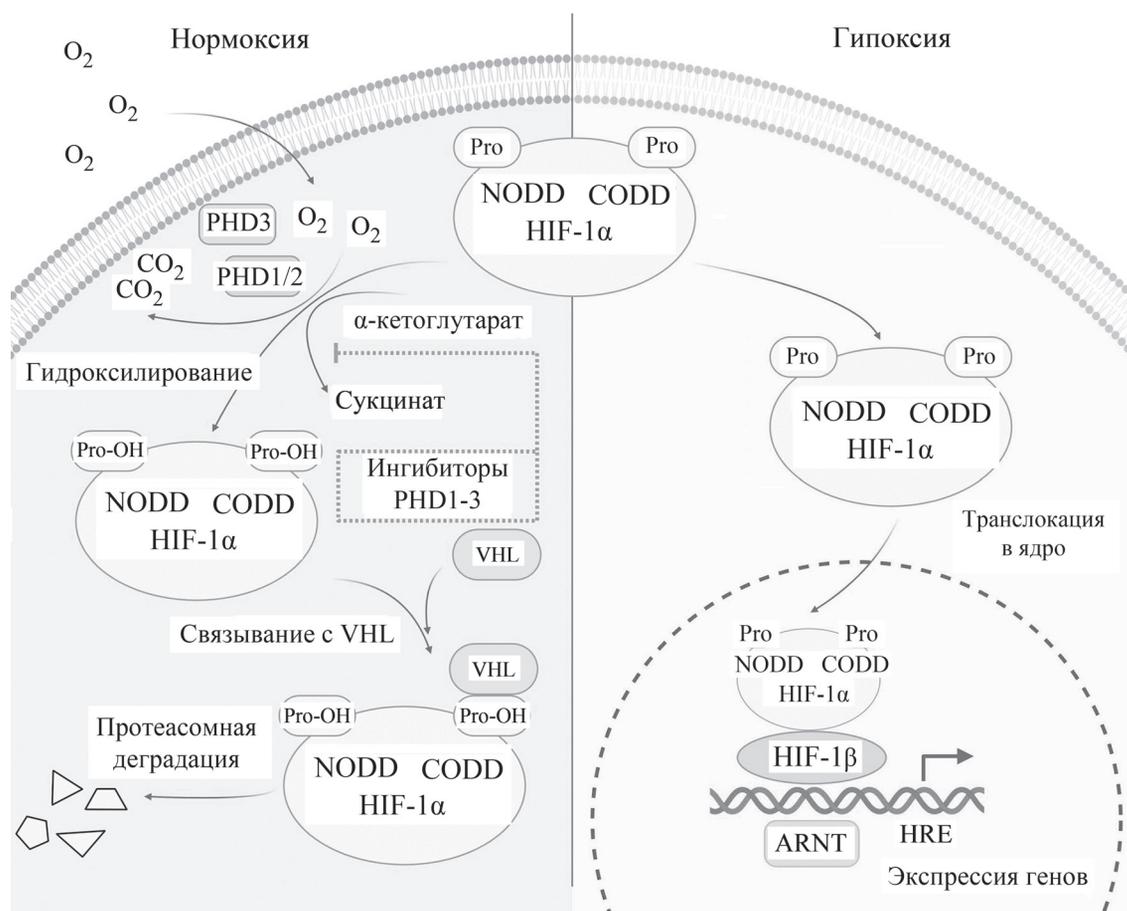


Рис. 1. Регуляция белковой стабильности HIF α . Гидроксилирование пролина в одном из кислородзависимых доменов HIF-1 α приводит к его распознаванию белком фон Хиппеля–Линдау (VHL), убиквитинированию и последующей деградации. При гипоксии HIF-1 α стабилизируется, образует димер с HIF-1 β и включает экспрессию генов, имеющих элемент HRE (hypoxia response element)

анаэробный путь производства АТФ, что способствует увеличению шансов на выживание клеток при гипоксии, но и потому, что эритропоэтин, продуцируемый в мозге, стимулирует пролиферацию и дифференциацию нейральных клеток-предшественников [4]. Нами был идентифицирован и оптимизирован специфический ингибитор фермента, принадлежащий к группе оксихинолинов с разветвленным «хвостом» в положении 7 кольца (рис. 2, структура 5), и показана его эффективность для сохранения нейрональной сети при гипоксическом инсульте [5].

Цель настоящего исследования состояла в выявлении первичных мишеней (мишеней «быстрого отклика») с использованием метода транскриптомного микроанализа при действии нового оксихинолинового ингибитора – нейроадапта [5], а также ингибиторов – миметиков α -кетоглутарата (диметиоксалилглицина (DMOG) и роксадустата).

Материалы и методы

Роксадустат (FG-4592) и диметилоксалилглицин (DMOG) приобретены у компании «Cayman Chemicals» (США). Нейроадапт (соединение 4896-3212) приобретен у компании «ХимРар» (Россия). Клеточная линия нейробластомы человека SH-SY5Y культивировалась в среде DMEM/F12 («Панэко») с 10% FBS («Gibco», США). Для подготовки образцов клетки были рассажены в 6-луночный планшет («ГРП», Россия) по 500 000 на лунку за сутки до инкубации с соединениями. Выбор оптимальной концентрации ингибиторов был проведен на основе значений IC50 активации HIF1 ODD-luc-клеточного репортера под действием роксадустата и нейроадапта [5]. Все соединения были растворены в ДМСО и добавлены к клеткам в конечной концентрации 2 мкМ (нейроадапт), 30 мкМ (роксадустат), и 0,5 мМ DMOG в трех повторах. Клетки инкубировали в течение 5 ч. В лунки с контрольными образцами добавляли 4 мкл ДМСО. Гипоксические условия

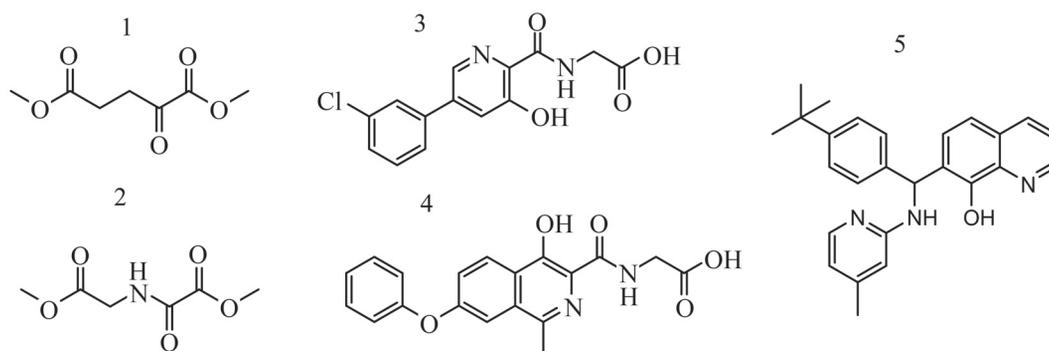


Рис. 2. Структуры субстрата и ингибиторов HIF пролилгидроксилазы. 1 – α -кетоглутарат, 2 – диметил оксалилглицин (DMOG), 3 – вададустат, 4 – роксадустат (FG-4592), и 5 – нейроадапт

поддерживали инкубацией клеток в течение 2 ч в атмосфере 1% O_2 , 5% CO_2 и 94% N_2 (среда была предварительно проинкубирована в тех же условиях в течение 16 ч перед добавлением к клеткам). После двухчасовой гипоксии клетки возвращали в исходные условия и инкубировали в CO_2 -инкубаторе в течение 5 ч. По окончании инкубации клетки лизировали с помощью реагента Qiazol («Qiagen») и выделяли РНК с помощью набора «RNeasy Micro Kit» («Qiagen»). Анализ качества и количества РНК проводили, как описано ранее [6]. Значение RIN для всех использованных образцов было выше 9,5. Для синтеза кДНК брали 500 нг выделенной тотальной РНК. Все стадии подготовки образцов, гибридизацию, промывание, окрашивание и сканирование микрочипов проводили так же, как описано ранее [7]. Профиль экспрессии мРНК анализировали с помощью микрочипов Gene Chip Human Transcriptome Array 2.0 («ThermoFisher Scientific-Affymetrix», США). CEL-файлы, полученные при сканировании микрочипов, обрабатывали с помощью программного пакета Transcriptome Analysis Console 2.0 («ThermoFisher Scientific-Affymetrix», США). Неаннотированные пробсы (наборы проб на микрочипе) исключали из анализа.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения TAC 4.0 («Thermo Fisher Scientific»). Оценку статистической достоверности различий уровней экспрессии между интактными клетками и клетками подвергшихся воздействию исследуемых соединений проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Бенджамин–Хохберга. Пороговый уровень значимости составлял 0,05.

Результаты исследования

При пятичасовой обработке линии нейробластомы человека около 10 000 проб (из 70 000) показывают достоверные изменения для концентрации нейроадапта 2 мкМ. Значительные изменения (более чем в два раза) по сравнению с контролем демонстрируют порядка 400 генов: наблюдается активация 140 генов и репрессия 250 генов (рис. 3, А и рис. 3, Б соответственно). При этом число общих генов-мишеней для нейроадапта и остальных соединений составляет всего 15–18 в случае репрессии (рис. 3, А) и 6–52 в случае активации (рис. 3, Б). Данные рис. 3 указывают на наибольшую схожесть действия нейроадапта с роксадустатом, нежели с DMOG и гипоксией, в случае активации экспрессии. В отношении репрессии генов-мишеней роксадустат и DMOG в большой степени имитируют действие гипоксии. Формальное сравнение показывает, что нейроадапт отличается гораздо более высокой специфичностью, чем роксадустат и DMOG, у которых число перекрывающихся мишеней составляет более 80% в случае репрессии и порядка 70% в случае активации. Высокую специфичность нейроадапта следовало ожидать, поскольку в его структуре присутствует объемный разветвленный «хвост», предотвращающий его вхождение в активный центр других ферментов семейства негемовых α -кетоглутаратзависимых диоксигеназ (в геноме человека их насчитывают порядка 60), в число которых входят важные ферменты эпигенетического контроля – цитозиндеметилаза (TET-ферменты) и лизиндеметилаза гистонов.

Уровни активации и репрессии общих генов нейроадапта и роксадустата, приведенные в таблице, подтверждают, что концентрации нейроадапта (2 мкМ) и роксадустата (30 мкМ), выбранные на основе их активности в репортерном

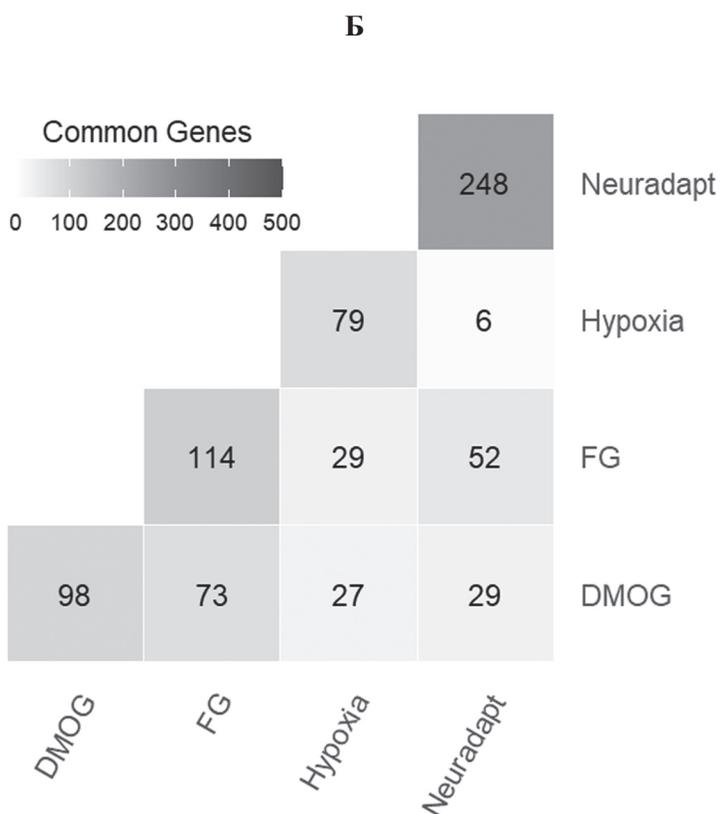
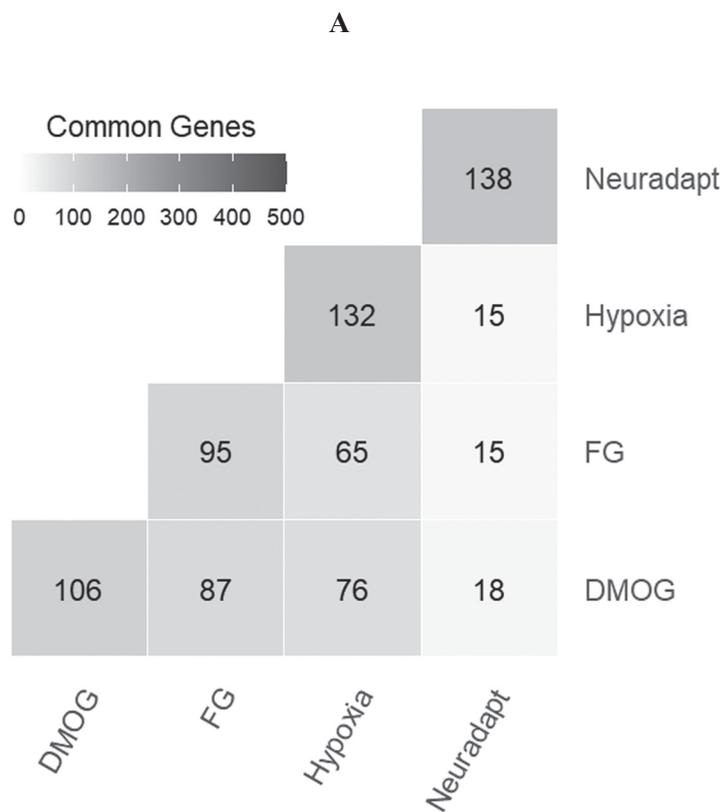


Рис. 3. Общие гены: А – репрессируемые и Б – активируемые более, чем в два раза, под действием ингибиторов фермента и гипоксии (2 мкМ нейроадапта (neuradapt), 30 мкМ роксадустата (FG), 500 мкМ DMOG, 2-часовая гипоксия, инкубация 5 ч

Перекрывающиеся мишени роксадустата и нейроадапта при 5-часовой обработке линии нейробластомы (2 мкМ нейроадапт (neuradapt), 30 мкМ роксадустат (FG), 500 мкМ DMOG, 2-часовая гипоксия; данные по 16 ч гипоксии взяты из материалов приложения к статье [8])

Символ гена	Продукт гена	Нейроадапт	FG	DMOG	Гипоксия, ч	
					2	16 [8]
Активация гликолиза						
ALDOC	альдолаза С, фруктозо-бифосфат	2,37	2,42	<2,00	<2,00	4,12
HK2	гексокиназа 2	4,82	5,23	3,88	<2,00	2,59
INSIG2	индуцируемый инсулином ген 2	3,24	2,40	<2,00	<2,00	2,69
PDK1	изофермент 1 киназы пируватдегидрогеназы	4,46	5,45	3,00	<2,00	3,98
PFKFB3	6-фосфофрукто-2-киназа/фруктозо-2,6-бифосфатаза 3	3,99	4,20	3,55	2,36	2,05
PFKFB4	6-фосфофрукто-2-киназа/фруктозо-2,6-бифосфатаза 4	4,18	2,65	<2,00	<2,00	4,61
SLC2A1 (GLUT1)	однонаправленный белок-переносчик глюкозы	3,28	4,92	<2,00	<2,00	2,35
PPP1R3C	регуляторная субъединица 3С фосфатазы 1	3,76	2,52	2,47	<2,00	1,70
Репрограммирование и инвазия						
ADAMTS20	ADAM металлопептидаза с мотивом тромбоспондина 20	4,07	2,04	<2,00	<2,00	–
AK4	аденилат киназа 4	3,46	4,21	4,70	2,39	3,71
AK4P3	аденилат киназа 4 псевдоген 3	4,52	4,21	2,35	<2,00	–
FUT11	альфа-1,3-фукозилтрансфераза 11	3,44	3,16	2,37	<2,00	2,49
EGLN3	HIF Пролилгидроксилаза, изофермент 3	2,69	2,08	2,58	2,11	2,58
KDM3A	лизин (K)-специфическая деметилаза 3A	2,54	2,80	2,80	<2,00	2,02
P4HA1	пролил 4-гидроксилаза, альфа-полипептид I	3,52	3,42	2,8	<2,00	2,30
TET1	TET метилцитозин диоксигеназа 1	2,37	2,2	<2,00	<2,00	1,71
TMEM45A	трансмембранный белок 45A	4,03	2,04	<2,00	21,6	3,70
Апоптоз						
BNIP3	белок 3, взаимодействующий с E1B 19kDa BCL2 аденовируса	4,31	5,68	2,73	<2,00	3,66
DDIT4 (CHOP)	белок транскрипта 4, индуцируемый повреждением ДНК	3,00	2,13	2,65	<2,00	2,92

Окончание табл.

Символ гена	Продукт гена	Нейроадапт	FG	DMOG	Гипоксия, ч	
					2	16 [8]
CIART	циркадно-ассоциированный репрессор транскрипции	2,67	5,99	2,38	2,18	3,29
RORA	RAR-связанный орфанный рецептор A	2,07	2,22	<2,00	<2,00	3,00
Гомеостаз кальция и фосфора						
STC1	станниокальцин 1	5,45	3,13	2,14	<2,00	1,69
STC2	станниокальцин 2	3,37	2,37	<2,00	<2,00	1,59
Иммунные реакции						
SELE	селектин E	-2,09	-4,71	-5,54	-6,0	-
VCAM1	васкулярно-клеточная адгезионная молекула 1	-2,11	-10,0	-10,0	<2,00	-
Катаболизм глутамата						
SLC1A1 (EAAT3)	нейронально-эпителиальный высокоаффинный глутаматный транспортер системы Xag, 1	2,28	2,93	<2,00	<2,00	-
Функции неизвестны						
ANKRD37	белок 37 с повторяющимися доменами анкирина	2,42	2,26	2,54	<2,00	3,46
MIR4705	микроРНК 4705	-3,02	-2,51	-2,62	-2,88	-

анализе, имеют приблизительно одинаковую эффективность в активации и репрессии указанных в таблице общих мишеней, в то время DMOG является намного менее эффективным, чем можно было предположить, а 2-часовая гипоксия вообще оказывает минимальный эффект по сравнению с действием ингибиторов фермента. Приведенные в таблице литературные данные по обработке микротранскриптомов, полученных при 16-часовой гипоксии [8], подтверждают, что двухчасовая гипоксия является очень «мягкой» по своим последствиям, несравнимой с эффектами фармакологического ингибирования фермента при 5-часовой инкубации. Короткое время инкубации позволяет увидеть первичные гены-мишени, индуцируемые (или репрессируемые) при стабилизации HIF или других транскрипционных факторов, являющихся субстратами HIF пролилгидроксилазы и регу-

лируемых протеасомной деградацией, например таких, как ATF4. Гены «быстрого отклика» относятся к различным биохимическим путям, что может также указывать на стабилизацию других транскрипционных факторов, помимо HIF.

Обсуждение результатов

Инкубация в течение 5 ч позволяет отобрать именно гены «первичного» (или быстрого) отклика, поскольку по данным репортерного анализа стабилизация репортерного гибридного белка HIF1 ODD-luc наблюдается через 2,5–3 ч, и соответственно, активация (или репрессия) становится детектируемой через 2–2,5 ч после стабилизации транскрипционного фактора, как показывают уже транскрипционные репортеры (HRE-luc). Как видно из данных таблицы, перекрывающихся генов нейроадапта и роксадуктата не так много,

причем большинство из них относятся к биохимическим путям активации гликолиза, репрограммирования / инвазии и апоптоза. Поскольку транскриптомный микроанализ проводился на линии нейробластомы человека, то гены быстрого отклика обладают спецификой, присущей нейронам.

Активация гликолиза

Ген **ALDOC** кодирует альдолазу С – основной фермент 4-й стадии гликолиза, а также в обратном пути глюконеогенеза. Он катализирует обратимую реакцию превращения фруктозо-1,6-бисфосфата в глицеральдегид-3-фосфат и дигидроксиацетон. Фермент экспрессируется специфически в гиппокампе и клетках Пуркинье, являясь критическим участником биосинтеза АТФ в мозге. Гексокиназа 2 (**HK2**) присутствует во внешней мембране митохондрий и катализирует фосфорилирование глюкозы в глюкозо-6-фосфат (первую стадию большинства путей метаболизма глюкозы) и таким образом активирует скорость гликолиза. Следует отметить, что уровень активации гексокиназы превосходит уровень активации альдолазы С практически в 2 раза (таблица). Таким же высоким уровнем активации экспрессии отличается и ген изофермента 1 киназы пируватдегидрогеназы (**PDK1**), которая фосфорилирует и тем самым ингибирует пируватдегидрогеназу и переключает клетку с митохондриального дыхания на анаэробный гликолиз. Фосфофруктокиназы 3 и 4 (**PFKFB3, 4**) перенаправляют поток глюкозы в нейронах с пентозо-фосфатного пути на гликолитический. Однонаправленный переносчик глюкозы (**SLC2A1** или **GLUT1**) кодирует главный транспортер глюкозы в гематоэнцефалическом барьере у млекопитающих. Регуляторная субъединица 3С фосфатазы 1 (**PPP1R3C**) является субъединицей комплекса фосфатазы 1, которая катализирует обратимое фосфорилирование белков и влияет на биосинтез гликогена. Таким образом, в совокупности, осуществляется мобилизация всех ресурсов глюкозы и направление ее на производство АТФ. Довольно примечательно, что одним из активируемых в первую очередь генов является ген **INSIG2**, представляющий собой кодирующий белок, ингибирующий синтез холестерина за счет участия в убиквитинировании и деградации скорость-лимитирующего фермента синтеза холестерина – 3-гидрокси-3-метил-глутарил-кофермент А редуктазы [9].

Синтез холестерина – процесс, требующий очень большого расхода кислорода, и в первую очередь **HIF** предотвращает расход кислорода в процессе, который не является необходимым для выживания клетки в условиях гипоксии.

Репрограммирование и инвазия

Прежде всего активируется экспрессия генов ферментов, напрямую связанных с эпигенетическим контролем и репрограммированием клетки. К их числу относятся деметилаза гистонов (**KDM3A**), активация которой в конечном счете усиливает пролиферацию и подвижность клеток [10], цитозин деметилаза (**TET1**) – фермент окисляющий 5-метилцитозин в 5-гидроксиметилцитозин, что приводит к усилению транскрипционной активности, так называемому «функциональному деметилированию», характерному для пост-митотических нейронов [11], и как было недавно показано, ускоряет перепрограммирование соматических клеток в плюрипотентные. Довольно любопытно, что активирует экспрессию гена изофермент 3 **HIF** пролилгидроксилазы (**EGLN3**) – изофермент, имеющий более 10 субстратов в дополнение к **HIF**, в число которых входят транскрипционные факторы p53 и ATF4. Таким образом, обеспечивается интенсивное эпигенетическое перепрограммирование клетки для обеспечения ее выживания в новых условиях. Перепрограммирование связано и с приобретением клетками инвазивной способности. К числу активируемых генов, связанных с инвазией, относятся коллаген пролил-4-гидроксилаза (**P4H1A**), трансмембранный белок **TMEM45A**, нокаут которого ингибирует клеточную адгезию и инвазию [12], ген **FUT11**, продукт которого альфа-(1,3)-фукозилтрансфераза 11 увеличивает гликозилирование белков (фукозилирование), необходимое для увеличения клеточной адгезии. Секретируемая металлопротеиназа **ADAMTS20** принимает участие в ремоделировании внеклеточного матрикса, и как было недавно установлено, является внутриклеточным регулятором цилиогенеза (формирование ресничек – построение клеточной антенны и механизма передачи внеклеточной жидкости) [13]. Аденилаткиназы являются широко распространенными фосфотрансферазами, регулирующими гомеостаз нуклеотидов. Аденилаткиназа 4 (**AK4**) известна как маркер метастатического рака [14] – ее повышенная активность приводит в конечном итоге к активации эпителиально-мезенхимной трансформации за счет ингибирования активности АМФ-активируемой протеинкиназы.

Активация экспрессии гена нейронально-эпителиального высокоаффинного транспортера глутамата (**SLC1A1** или **EAAT3**) довольно примечательна в связи с рассмотренной выше активацией экспрессии генов ферментов **HIF** пролилгидроксилазы 3 (**EGLN3**), коллаген пролилгидроксилазы (**P4HA1**), лизин деметилазы гистонов (**KDM3A**), цитозиндеметилазы (**TET1**) – ферментов, относящихся к одному и тому же семейству α -кетоглутарат и железо-зависимых диоксигеназ. Данный транспортер [15] принимает участие в поглощении цистеина, что способствует повышению уровня глутатиона и выживанию клетки, а также в поглощении глутамата для его катаболизма в нейронах, одним из продуктов реакции трансминирования которого является α -кетоглутарат, необходимый для вышеперечисленных ферментов, участвующих в перепрограммировании клетки.

Апоптоз

Апоптоз, запускаемый выходом цито-хрома **C** из митохондрий, может проходить по двум путям. Первый запускается проапоптотическими белками семейства **Bax/Bcl2**, а второй – через открытие митохондриальной поры и участие потенциалзависимого анионного канала (**VDAC**). Примечательно, что наблюдается активация экспрессии ключевых игроков обоих путей апоптоза. Наибольшая активация экспрессии (таблица) наблюдается для гена **FAM162A**, кодирующего белок роста и трансформации (**human growth and transformation-dependent protein**), локализованного в митохондриях и физически взаимодействующего с **VDAC**, запускающая апоптотический каскад [16]. В меньшей степени активируется экспрессия **BNIP3** и **DDIT3**(**CHOP**). **BNIP3** (белок 3, взаимодействующий с 19 кДа **Bcl2**/аденовируса **E1B**) является членом семейства апоптотических белков **Bcl-2**, и в зависимости от ситуации в клетке **BNIP3** может вызвать как ее гибель (некроз, апоптоз, аутофагия), так и способствовать ее выживанию. **CHOP** является транскрипционным фактором, запускающим экспрессию анти- и проапоптотических генов семейства **Bcl2**. **CHOP** обычно рассматривается как мишень транскрипционного фактора **ATF4** – субстрата **HIF** пролилгидроксилазы 3, и более того, **CHOP** возможно взаимодействует с **ATF4** для запуска экспрессии генов белков, осуществляющих аутофагию.

Циркадный ритм, иммунитет и другие функции

Связь гипоксии и циркадного ритма по механизму регуляции обратной связи хорошо известна, но все еще находится в процессе интенсивного исследования [17]. Циркадный репрессор транскрипции **CIART** работает независимо от хорошо известных транскрипционных репрессоров **CRY1**, **CRY2** и **BHLHE41**, взаимодействует с глюкокортикоидным рецептором **NR3C1** и таким образом вносит свой вклад в репрессию глюкокортикоидного отклика. Орфанный рецептор **ROR α** активирует транскрипцию **Bmal1**, и таким образом снимает репрессию **REV-ERBa**, конкурируя за связывание одного и того же элемента. Перекрестное взаимодействие обоих факторов выступает как тонкая настройка их физиологических мишеней, таких как циркадный ритм, метаболизм и воспаление. Любопытно, что репрессируемые в первую очередь гены включают **VCAM-1** (васкулярную молекулу клеточной адгезии 1) – белок, входящий в суперсемейство иммуноглобулинов, играющий значительную роль в иммунной системе человека, участвуя в адгезии лейкоцитов и эндотелиальных клеток, а также передаче сигналов. Предполагается, что этот белок может иметь отношение к развитию атеросклероза и ревматоидного артрита. Второй репрессируемый белок – **селектин Е** (**ECAM1**, молекула эндотелиальной адгезии лимфоцитов). Его функции до конца не выяснены, предположительно, селектин **Е** отвечает за накопление лейкоцитов в местах воспаления. Интересно, что репрессия этих генов под действием нейрорапта выражена гораздо меньше, чем для роксадустата и **DMOG**.

Характерна довольно значительная активация генов **станниокальцина 1 и 2** (гормонов, участвующих в регуляции уровня кальция) [18] под действием обоих ингибиторов (таблица) в отличие от эффекта 16-часовой гипоксии. Продукты этих генов являются цитопротекторами в нейронах [19], но также, как было недавно показано в экспериментах *in vivo*, увеличивают поглощение глюкозы [20]. Ген белка **37** с повторяющимися доменами анкирина (**ANKRD37**) является установленной мишенью **HIF** [21], но функция его до сих пор неизвестна.

Таким образом, сравнительный транскриптомный микроанализ действия ингибиторов **HIF** пролилгидроксилазы человека (роксадустата и нейрорапта) при кратковременной инкубации с линией нейробластомы человека позволяет выделить около 30 генов «быстрого» отклика, которые

служат мишенями HIF и, вероятно, не требуют участия других транскрипционных факторов. За исключением трех репрессируемых генов, транскрипция генов «быстрого отклика» активируется под действием ингибиторов, при этом более половины генов направлены на выживание клетки за счет активации гликолиза и эпигенетического перепрограммирования. Оба препарата показывают близкую эффективность, что указывает на правильность подбора действующих концентраций на основании данных репортерного анализа.

В целом, транскриптомный анализ подтверждает, что нейроадапт превосходит роксадустат по эффективной концентрации почти на полтора порядка.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, грант 20-15-00207.

Конфликта интересов нет.

Дополнительной информации нет.

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang G.L., Semenza G.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1993. Vol. 90, N. 9. P. 4304. (DOI: 10.1073/pnas.90.9.4304).
2. Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.-M., Wilson M.I., Gielbert J., Gaskell S.J., Kriegsheim A. v., Hebestreit H.F., Mukherji M., Schofield C.J., Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. // Science (80). 2001. Vol. 292, N. 5516. P. 468 (DOI: 10.1126/science.1059796).
3. Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J.M., Lane W.S., Kaelin J. // Science (80). 2001. Vol. 292, N. 5516. P. 464 (DOI: 10.1126/science.1059817).
4. Noguchi C.T., Asavaritikrai P., Teng R., Jia Y. // Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2007. Vol. 64, N. 2. P. 159 (DOI: 10.1016/j.critrevonc.2007.03.001).
5. Savyuk M., Krivonosov M., Mishchenko T., Gazaryan I., Ivanchenko M., Khristichenko A., Poloznikov A., Hushpulian D., Nikulin S., Tonevitsky E., Abuzarova G., Mitroshina E., Vedunova M. // Antioxidants (Basel, Switzerland). 2020. Vol. 9, N. 8 (DOI: 10.3390/antiox9080662).
6. Maltseva D., Raygorodskaya M., Knyazev E., Zgoda V., Tikhonova O., Zaidi S., Nikulin S., Baranova A., Turchinovich A., Rodin S., Tonevitsky A. // Biochimie. 2020. Vol. 174. P. 107 (DOI: 10.1016/j.biochi.2020.04.016).
7. Kudriaeva A., Galatenko V., Maltseva D., Khaustova N., Kuzina E., Tonevitsky A., Gabibov A., Belogurov A. // Molecules. 2017. Vol. 22, N. 5. P. 808 (DOI: 10.3390/molecules22050808).
8. Chan M.C., Ilott N.E., Schödel J., Sims D., Tumber A., Lippl K., Mole D.R., Pugh C.W., Ratcliffe P.J., Ponting C.P., Schofield C.J. // J. Biol. Chem. 2016. Vol. 291, N. 39. P. 20661 (DOI: 10.1074/jbc.M116.749291).
9. Hwang S., Nguyen A.D., Jo Y., Engelking L.J., Brugarolas J., DeBose-Boyd R.A. // J. Biol. Chem. 2017. Vol. 292, N. 22. P. 9382 (DOI: 10.1074/jbc.M117.788562).
10. Kim H., Kim D., Choi S.A., Kim C.R., Oh S.K., Pyo K.E., Kim J., Lee S.H., Yoon J.B., Zhang Y., Baek S.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2018. Vol. 115, N. 46. P. 11766 (DOI: 10.1073/pnas.1805662115).
11. Mellén M., Ayata P., Heintz N. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2017. Vol. 114, N. 37. P. E7812 (DOI: 10.1073/pnas.1708044114).
12. Guo J., Chen L., Luo N., Yang W., Qu X., Cheng Z. // Oncol. Rep. 2015. Vol. 33, N. 6. P. 3124 (DOI: 10.3892/or.2015.3902).
13. Nandadasa S., Kraft C.M., Wang L.W., O'Donnell A., Patel R., Gee H.Y., Grobe K., Cox T.C., Hildebrandt F., Apte S.S. // Nat. Commun. 2019. Vol. 10, N. 1 (DOI: 10.1038/s41467-019-08520-7).
14. Jan Y.H., Lai T.C., Yang C.J., Huang M.S., Hsiao M. // Sci. Rep. 2019. Vol. 9, N. 1 (DOI: 10.1038/s41598-019-48243-9).
15. Bjørn-Yoshimoto W.E., Underhill S.M. // Neurochem. Int. 2016. Vol. 98. P. 4 (DOI: 10.1016/j.neuint.2016.05.007).
16. Qu Y., Mao M., Zhao F., Zhang L., Mu D. // Stroke. 2009. Vol. 40, N. 8. P. 2843 (DOI: 10.1161/STROKEAHA.109.553644).
17. Manella G., Aviram R., Bolshette N., Muvkadi S., Golik M., Smith D.F., Asher G. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2020. Vol. 117, N. 1. P. 779 (DOI: 10.1073/pnas.1914112117).
18. Joshi A.D. // Front. Endocrinol. (Lausanne). 2020. Vol. 11 (DOI: 10.3389/fendo.2020.00172).
19. Zhang Y., Shan P., Srivastava A., Li Z., Lee P.J. // Antioxidants Redox Signal. 2019. Vol. 30, N. 15. P. 1775 (DOI: 10.1089/ars.2018.7514).
20. Sarapio E., De Souza S.K., Model J.F.A., Trapp M., Da Silva R.S.M. // Can. J. Physiol. Pharmacol. 2019. Vol. 97, N. 10. P. 916 (DOI: 10.1139/cjpp-2019-0023).
21. Benita Y., Kikuchi H., Smith A.D., Zhang M.Q., Chung D.C., Xavier R.J. // Nucleic Acids Res. 2009. Vol. 37, N. 14. P. 4587 (DOI: 10.1093/nar/gkp425).

Поступила в редакцию 11.01.2021

Получена после доработки 14.01.2021

Принята к публикации 20.01.2021

FAST RESPONDING GENES TO HIF PROLYL HYDROXYLASE INHIBITORS

D.M. Hushpulian^{1,2}, S.V. Nikulin^{2,3}, T.A. Chubar⁴, A.Yu. Khristichenko²,
A.A. Poloznikov^{2,3}, I.G. Gazaryan^{2,4*}

(¹Far Eastern Federal University, School of Biomedicine; ²P. A. Hertsen Moscow Oncology Research Center, Branch of the National Medical Research Radiological Center, Department of Translational Oncology; ³National Research University Higher School of Economics, Faculty of Biology and Biotechnology; ⁴M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry; *e-mail: igazaryan@gmail.com)

The attempts to elucidate the mechanism of hypoxic activation of erythropoietin synthesis lead to the discovery of hypoxia inducible factor (HIF) and its stability regulation via HIF prolyl hydroxylase, iron and α -ketoglutarate dependent dioxygenase. Enzyme inhibitors mimic the action of hypoxia, however, are far more specific. Comparative transcriptomic microanalysis of various types of the enzyme inhibitors versus hypoxia at short incubation times demonstrates high potency of inhibitors and points to the primary targets of HIF transcription factor. The power of inhibitors evaluated in the transcriptomic analysis matches the ranking of enzyme inhibitors based on the values of their half-activation constants in HIF1 ODD-luc reporter assay. Neuradapt is 15-20 times more potent than roxadustat, and in addition, it is much more specific for the target enzyme than roxadustat and dimethyl oxalylglycine, which are likely acting on other enzymes of the same family.

Key words: hypoxia, transcriptome, roxadustat, neuradapt, dimethyl oxalylglycine, gene expression.

Сведения об авторах: Хушпульян Дмитрий Михайлович – зав. лабораторией микрофизиологических систем школы биомедицины ДВФУ, канд. хим. наук (hushpulian@gmail.com); Никулин Сергей Вячеславович – ст. науч. сотр. междунар. лаборатории микрофизиологических систем факультета биологии и биотехнологии НИУ ВШЭ, канд. биол. наук (snikulin@hse.ru); Чубарь Татьяна Анатольевна – ассистент кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (tchubar@gmail.com); Христиченко Анна Юрьевна – мл. науч. сотр. отдела трансляционной онкологии онкологического института имени П.А. Герцена (филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии), канд. биол. наук (hristik14@gmail.com); Полозников Андрей Александрович – вед. науч. сотр. междунар. лаборатории микрофизиологических систем факультета биологии и биотехнологии НИУ ВШЭ, канд. хим. наук (apoloznikov@hse.ru); Газарян Ирина Георгиевна – вед. науч. сотр. отдела трансляционной онкологии онкологического института имени П.А. Герцена (филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии), докт. хим. наук (igazaryan@gmail.com).