

# Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1: Hücrenin Hipoksiye Fizyolojik ve Patolojik Cevabı

## *Hypoxia-inducible factor-1: Physiological and Pathological Response to Hypoxia of Cell*

Saygın Hasan Demirel<sup>1</sup>, Sümeyra Çetinkaya<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Tusem Eğitim Kurumları, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup> Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Konya, Türkiye

### Yazışma Adresi / Corresponding to:

Asistan Sümeyra Çetinkaya, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Morfoloji Binası Tıbbi Biyoloji Bölümü 2.kat Konya - Türkiye  
Tel: 03322236654, Mail: cetinkayasumeyra@hotmail.com

### Özet

Başvuru Tarihi: 17.04.2014 Kabul Tarihi: 04.06.2014

Oksijen homeostazında kritik bir rol oynayan hipoksiyle indüklenen faktör-1 (HIF-1); anjiyogenezis, eritropoezis, demir metabolizması ve glukoz metabolizması gibi metabolik süreçlerin transkripsiyonel regülatörüdür. Ayrıca fetal ve postnatal hayat sürecinde anahtar fizyolojik sistemlerin düzenlenmesi için gereklidir. HIF-1 heterodimerik bir protein olup oksijen regülasyonunda rol alan HIF-1 $\alpha$  (homologları HIF-2 $\alpha$  ve HIF-3 $\alpha$ ) ve nükleusta bulunan HIF-1 $\beta$  alt ünitelerinden oluşmaktadır. HIF-1'in  $\alpha$  alt ünitesinin stabilitesi ve aktivitesi hidroksilasyon, ubikütinasyon, asetilasyon ve fosforilasyon gibi transkripsiyon sonrası modifikasyonlarla sağlanmaktadır. Normoksida, HIF-1 $\beta$ 'nin oksijen-bağımlı degradasyon (ODD) bölgesinde yer alan iki prolinin hidroksilasyonu ve bir lizinin asetilasyonu ile başlayan bu regülasyon bir tümör baskılayıcı gen olan von Hippel-Lindau proteini (pVHL) ile E3 ligaz kompleksi tarafından ubikütin-proteazom yolu ile gerçekleştirilmektedir. Hipoksik koşullarda, hidroksillenemeyen HIF-1 $\alpha$  alt ünitesi stabil hale gelir ve cAMP, protein/p300 gibi koaktivatörler ile etkinleşerek nükleusa geçer. HIF-1 $\beta$  alt ünitesi ile birleşerek hipoksiye cevap genlerinin ekspresyonunu regüle eder. HIF-1'in aşırı ekspresyonu çeşitli kanser olgularında saptanmış ve HIF-1'in hedeflenmesinin kanser tedavisinde yeni bir yaklaşım olabileceği düşünülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** HIF-1, VHL, kanser, hipoksi

### Abstract

Application: 17.04.2014 Accepted: 04.06.2014

Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) which has a critical role in the homeostasis of oxygen, is a transcriptional regulator of metabolic processes such as angiogenesis, erythropoiesis, iron metabolism and glucose metabolism. It is also essential for the regulation of key physiological systems in the process of fetal and postnatal life. HIF-1 is a heterodimeric protein consists of HIF-1 $\alpha$  (homologues HIF-2 $\alpha$  and HIF-3 $\alpha$ ) and HIF-1 $\beta$  subunits that situated in the nucleus. Stability and activity of HIF-1 $\alpha$  subunit is provided with post-transcriptional modification such as hydroxylation, ubiquitination, acetylation and phosphorylation. In normoxia, this regulation that starting with two proline hydroxylation and lysine acetylation which are located in region HIF-1 $\alpha$  oxygen-dependent degradation (ODD), is carried out with a tumor suppressor gene von Hippel-Lindau protein (pVHL) and E3 ligase complex by the ubiquitin-proteasome pathway. In hypoxic conditions, HIF-1 $\alpha$  subunits that are not hydroxylation becomes stable and switches nucleus by activating with coactivators such as cAMP, protein/p300. Combining with HIF-1 $\beta$  subunit regulates the expression of genes in response to hypoxia. Overexpression of HIF-1 is determined in various cancer events and targeting HIF-1 is thought to be new approach in cancer treatment.

**Keywords:** HIF-1, VHL, cancer, hypoxia

## Giriş

Birçok fizyolojik ve patofizyolojik olayın gen seviyesindeki düzenlenmeleri, hücrelerin oksijensiz ortamda oksijenlenmeyi sağlayacak yeni damar oluşturması, alyuvar üretiminde artış ve anaerobik glikoliz dahil metabolizmadaki pek çok değişiklik hipoksiyle düzenlenmektedir.<sup>1,2</sup> Hipoksiye cevap olarak yayılan tümör hücreleri hücre çoğalmasını, hücre sağ kalımını ve anjiyogenezi destekleyen anahtar moleküler programları uyarır. Hücresel oksijen konsantrasyonundaki değişimleri algılama ve cevaplama sorumlu bu pleotropik olayların çoğu HIF-1 tarafından düzenlenmektedir.<sup>3</sup>

Kanserin ilerlemesinde HIF-1'in rolüne ait bilgiler, insan kanser biyopsi örnekleri ve deney hayvanları çalışmalarına dayanır. İmmünohistokimyasal analizler ile HIF-1'in kolon, meme, akciğer, over, prostat, deri ve mide dahil olmak üzere birçok insan malign kanserlerinde aşırı ekspresyonu gösterilmiştir. Daha da ötesi, meme ve kolon kanser metastazlarının pek çoğunda HIF-1 alfa birikimi saptanmış ve kötü yaşam sonuçlarıyla ilişkilendirilmiştir.<sup>4,5</sup> Bu görüş yetersiz HIF-1 alfa'ya sahip fare ve insan kanser hücre serilerinde yapılan deneylerle desteklenmiştir. HIF-1 alfa protein seviyelerinin çeşitli kanserlerde, yeni tedavi stratejileri planlanırken bir biyomarkır olarak kullanılabilceği öne sürülmüştür.<sup>6,7</sup>

## HIF-1 Genleri ve Proteinleri

İnsanda hipoksiyle indüklenen genleri aktive eden HIF-1 gen proteini, HIF-1 gen ailesinin en iyi bilinen temel elemanlarından biridir.<sup>8</sup> HIF-1 alfa geni; 14q23.2 kromozom bölgesinde bulunan 15 ekzon ve 14 introndan oluşan bir genidir.

Daha sonra yapılan homoloji ve klonlama çalışmalarında HIF-2 alfa ve HIF-3 alfa genleri (HIF-1 alfa homologu) ve aril hidrokarbon nuklear translokator (ARNT) proteininin sentezinden sorumlu olan HIF-1 alfa geni tanımlanmıştır. Bunlar Per-Arnt-Sim (PAS) ailesinin temel heliks-loop-heliks (bHLH) proteinlerini sentezlerler.<sup>9,10</sup> HIF-1 alfa, hipoksiyle indüklenen genleri aktive ettiği saptanan ilk proteindir. HIF-2 alfa protein yapısı bakımından büyük ölçüde HIF-1 alfa'ya benzerlik gösterir; ancak dokuya özgü ifadeler ve farklı fonksiyonlara sahip oldukları bildirilmektedir.<sup>11</sup> Örneğin; HIF-1 alfa her hücrede bulunabilirken, HIF-2 alfa fare karaciğerinde, tübüler sistemin gelişmesinde ve vasküler endotel hücrelerin yeniden yapılanma-

larında görev alır ve buralarda fazlaca görülürler.<sup>12,13,14,15</sup> İlginç olarak, böbrekte HIF-1 alfa ve HIF-2 alfa'nın her ikisinde bulunmakta iken, miktarı fazla artan HIF-2 alfa renal karsinoma hücrelerinin çoğalmasına neden olur ve inhibisyonu bu çoğalmayı baskılamaya yeterlidir.<sup>16</sup> Bu nedenlerle, HIF-1 alfa ve HIF-2 alfa oldukça benzer olmalarına ve HIF-1 alfa ile dimer oluşturarak hedef genlerin aynı DNA sekanslarına bağlanmalarına karşılık farklı doku ve hücresel yaygınlığa sahip olabilirler ve belkide farklı hedef genleri aktive edebilirler. HIF-1 alfa ve HIF-2 alfa gen mutasyonlarının her ikisinin de farelerde embriyonik öldürücü etki göstermeleri yanında farklı fonksiyonlara sahip oldukları gösterilmiştir.<sup>17</sup> HIF-1 alt ünitelerinin en az karakterize edileni ve çok sayıda alternatif splay (alternatif kesip-ekleme) seçenekleri vermesi yönünden tek olanı HIF-3 alfa'dır.<sup>18</sup> HIF-3 alfa'nın splay seçeneklerinden biri olan inhibitör PAS domeyn proteininin (IPAS) HIF-1 alfa'ya negatif bir regülatör gibi davrandığı ve bu nedenle HIF-3 alfa'nın genellikle HIF sisteminin bir antagonisti olabileceği belirtilmiştir.<sup>19</sup>

## HIF-1 Proteinlerinin İşlevleri

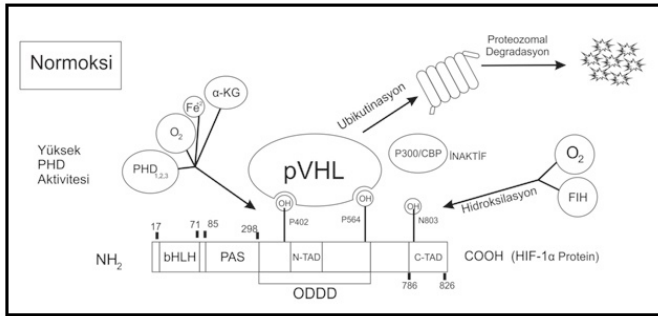
HIF-1 proteinleri hücre ve dokularda düşük oksijen basıncına adaptasyon, hücre sağ kalımı ve çoğalması, anjiyogenez, eritropoez, glukoz alınımı ve demir metabolizması gibi olaylara bağlı birçok genin hipoksiye transkripsiyonel aktivasyon cevaplarının anahtar regülatörüdür. HIF-1'in nükleer alfa-alt ünitesi yapısal, alfa-alt ünitesi regülatör bileşen olarak işlev görür. HIF-1 alfa alt ünitesi normoksik koşullarda kararsızdır ve sonraki degradasyonlar için E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bir parçası olan VHL proteininin hedefidir. Hipoksik koşullarda ise HIF-1 alfa proteozomal yıkımdan kaçır, sitozolde birikir, stabil hale gelir, fosforillenir ve nukleusa geçerek HIF-1 alfa ile heterodimerik bir kompleks oluşturur. Bu kompleks hipoksiyle indüklenebilen genlerin güçlendirici ya da promotor bölgesinde 50 baz çiftli bir DNA bağlanma motifi olan hipoksi cevap elementleri (HRE) ile bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonlarını başlatır.<sup>20,21,22</sup>

## HIF-1 alfa ve VHL Protein Etkileşimi

Normoksik koşullarda, HIF-1 alfa proteinleri korunumlu iki prolin (P402 ve P564) rezüdüsünden hidroksile olarak VHL proteinleri ile etkileşirler.<sup>23</sup> Bu prolinlerin hidroksilasyonu prolin hidroksilazlar (PHD) tarafından O<sub>2</sub>, alfa-KG, Fe<sup>2+</sup> gibi faktörlere bağımlı şekilde sağlanmaktadır. HIF-1 alfa'nın iki prolini hid-

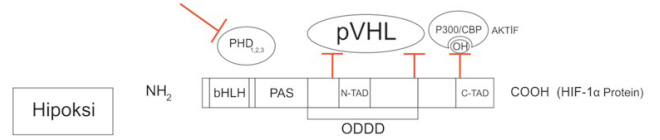
roksiprolin'e dönüştürüldükten sonra VHL proteini HIF-1alfa'yı yakalar. VHL/HIF-1alfa kompleksinin X-ışınları kristallografisi ile incelenmesi, VHL proteini yüzeyinde hidroksiprolinin tam olarak uyacağı bir cep olduğunu göstermiş ve tüm bağlanma konfigürasyonunun oldukça spesifik olduğunu bildirilmiştir.<sup>23</sup> Böylece HIF-1alfa'nın E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bir bileşeni olan VHL proteinine bağlanması, HIF-1alfa'nın ubiquitinasyonuna sebep olmakta ve sonuçta proteozomlar tarafından degradasyonu sağlanmaktadır (Şekil 1a).<sup>24,25,26</sup>

Şekil 1a: HIF-1alfa'nın normoksik koşullardaki proteozomal degradasyonu



HIF-1alfa'nın stabil olması ise hücrede oksijen konsantrasyonunun normoksik koşuldan (yaklaşık %21 O<sub>2</sub>) hipoksiye (yaklaşık %1 O<sub>2</sub>) doğru adaptasyonunu gerektirmektedir. Prolin hidroksilasyonu substrat olarak oksijene ihtiyaç duyduğu için hipoksik koşullar P402 ve P564 hidroksilasyonlarını kısıtlamakta ve VHL'nin bağlanmasını önleyerek HIF-1alfa'nın dengelenmesine öncülük etmektedir.<sup>27,28,29,30,31,32</sup> İnsanda bulunan üç prolil hidroksilaz izoformu vardır (PHD1-3); normoksik koşullarda HIF-1alfa hidroksilasyonu için öncelikli sorumlunun PHD2 olduğu ileri sürülmüştür.<sup>33,34</sup> HIF-1alfa'nın VHL proteinine bağlanan tarafı oksijen-bağımlı degradasyon (ODD) bölgesinde bulunur. ODD bölgesi HIF-1alfa'nın amino-terminal transaktivasyon domeyini N-TAD olarak bilinir. HIF-1alfa'nın ikinci transaktivasyon bölgesi karboksi-terminal C-TAD içerisinde bulunan ve özel bir asparajin hidroksilazla hidroksillenen asparajin N803 konumlu bölgesidir. Normoksidede hidroksillenen N803'ün transkripsiyonel koaktivatör CBP/p300'e yönelimi faktör engelleyici HIF (FIH) tarafından bloke edilir.<sup>35,36</sup> Hipoksi durumunda, PHD'ler ve FIH aktiviteleri baskılanarak prolil ve asparajinlerin hidroksilasyonu ortadan kalkar, VHL bağlanamaz ve HIF-1alfa stabilizasyonu meydana gelir (Şekil 1b).

Şekil 1b: Hipoksik koşullarda HIF-1alfa'nın stabilizasyonu



Stabillenen ve MAPK ile indüklenerek fosforlanan HIF-1alfa proteinleri nukleusa transloke olarak HIF-1alfa'ya bağlanır. HIF-1alfa'nın hidroksillenmemiş N803 bölgesi CBP/p300'ün hedef gene yönlendirilmesine ve transkripsiyonel aktivasyonuna yol açar.<sup>37,38</sup> Kısaca HIF-1alfa'nın, normoksidede prolil hidroksilasyonu ile VHL bağlanması için sinyal oluşturarak yıkımı; hipoksidede ise hidroksillenmemiş asparajinin koaktivatör CBP/p300'e bağlanması ile uyum seviyesine göre hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonu regüle edilmiş olur. Diğer bir durumda, VHL gen mutasyonları olan hücrelerde HIF-1alfa ve HIF-2alfa normoksi durumunda da stabildirler ve hipoksiyle indüklenebilir genlerin fazlaca ekspresyonuna sebep olurlar. Böylece VHL proteini eksik olan hücrelerde normal oksijen basıncı altında HIF-1alfa'nın stabilitesine ve aktivitesine izin vererek tümör oluşumuna ve hücreler hipoksik koşullara maruz kalmadan da anjiyogenik faktörleri kodlayan genlerin ekspresyonuna sebep olabilecekleri bildirilmiştir.<sup>39,40,41,42</sup>

### Lizin Asetilasyonunun HIF-1 Degradasyonu Üzerine Etkisi

Normoksi koşullarda VHL proteininin HIF-1alfa'ya bağlanmasını stimüle eden diğer bir yol, HIF-1alfa'nın ODD domeyininde lokalize lizin 532 (Lys532)'nin bir asetiltransferaz (ARD1) tarafından asetillenmesidir. ARD1 adı ilk kez *Saccharomyces cerevisiae* mayalarında saptanmış ve adlandırılması mitotik hücre siklusunda mutasyon oluşturulan defektif mayalardan gelmiştir.<sup>43</sup> Bu asetilasyonun VHL ile HIF-1'in etkileşimini artırarak proteozomal degradasyonunu desteklediği gösterilmiş; ancak bu çalışmalarda mekanizması açıklanamamıştır.<sup>44</sup> Daha sonra yapılan araştırmalarda normoksidede ARD1 aktivitesi oksijenden etkilenmediği için aktiftir ve HIF-1alfa'yı oksijen seviyesinden etkilenmeksizin asetilleyebilir; fakat hipoksik durumda ARD1'in mRNA ve protein seviyesi azalır ve böylece HIF-1alfa'yı normoksidedekinden daha az asetilleyebilir açıklaması yapılmıştır.<sup>45,46</sup>

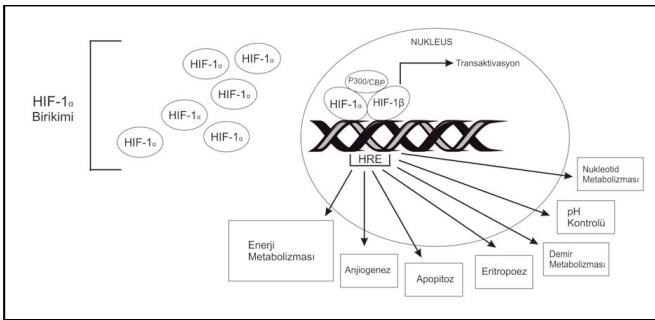
### HIF-1'in Fosforilasyonu

Oksijen konsantrasyonuna duyarlı HIF-1 aktivitesini regüle etmede esas öneme hidroksilazlar sahip olmakla birlikte, HIF-1 aktivitesinin kontrolünde yardımcı diğer mekanizmalar da vardır. Bunlardan biri evrimsel olarak korunmuş ve mayadan insana kadar tüm ökaryot hücrelerde sinyal iletiminde merkezi rol oynayan mitojen tarafından aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yolağıdır. Bu regülasyonda MAPK ailesinin proteinleri olan serin/treonin kinazların rol aldığı gösterilmiştir. HIF-1'in fosforilasyonu HIF-1alfa ile dimerleşmesine olanak sağlamaktadır.<sup>47,48,49,50,51</sup>

### HIF-1'in Hedef Genleri

Hücre ve organlar oksijen basıncındaki değişikliklere uyum sağlama ihtiyacıdadırlar. HIF-1'in hedef genlerinin buldukları dokuya oksijen sağlanmasındaki değişimlere özel bir şekilde adaptasyon göstermesi sürpriz olmamalıdır. Son zamanlarda, HIF-1'in adaptasyonu ile regüle edilen farklı fonksiyonlu 100'den fazla gen tanımlanmıştır. Dahası arteriyel endotel hücrelerinde, insan genlerinin %2'den fazlasının, direkt veya indirekt olarak HIF-1 tarafından regüle edildiği bildirilmiştir<sup>52,53,54</sup> (Şekil 2). HIF-1, hedef genlerin güçlendirici ve promotör bölgelerine lokalize olmuş 50 baz çiftli bir HRE (hipoksi yanıt elemanı) bölgesine bağlanarak, bu genlerin ekspresyonlarını aktive etmektedir.<sup>55,56</sup>

Şekil 2: HIF-1'in birikimi ve hedef genlerin aktivasyonu



### Anjiyogenez

Anjiyogenezis farklı hücre tiplerinde, çok sayıda gen ürününün ekspresyonu ile gerçekleşen karmaşık bir süreçtir.<sup>57</sup> Anjiyogenezisin farklı basamaklarında, hipoksi ile baş etmek için pek çok genin olaylara karıştığı gösterilmiştir.<sup>58,59</sup> Bunlardan endotele özgü büyüme faktörleri içinde en fazla çalışılmış ve

en etkin olanı VEGF'dir. VEGF, hipoksik koşullarda endotel hücrelerin proliferasyonunu stimüle ederek doğrudan anjiyogenezisin içinde yer alır. Böylece VEGF ve birtakım diğer proanjiyogenetik faktörlerin indüksiyonu, vasküler yoğunluğu artırır ve oksijen difüzyon mesafesini düşürür.<sup>60,61</sup>

### Glukoz metabolizması

Oksijenin azalması durumunda hücreler glukoz metabolizma yollarını oksijene bağımlı trikarboksilik asit (TCA) siklusu yolağından, oksijen bağımsız anaerobik glikoliz yolağına değiştirirler.<sup>62,63</sup> TCA siklusunda bir glukoz molekülünden 30 ATP molekülü üretilirken, anaerobik glikoliz ile sadece 2 ATP molekülü üretilir, hipoksik hücreler ATP üretimlerini daha fazla glukoz alınımı ile yükseltirler. Hipoksi ve HIF-1'in bu regülasyonu glikolitik yolağın tüm enzimleri ve glukoz taşıyıcılarının da artırılmasıyla sağlanır.<sup>64,65</sup> Laktat ve piruvat gibi glikoliz metabolitlerinin, normokside HIF-1alfa birikimini artırdığı ve hipoksiyle indüklenebilir gen ifadelerini regüle ettiği ve böylece potansiyel bir pozitif geri besleme oluşturduğu belirtilmiştir.<sup>66,67</sup>

### Hücre proliferasyonu ve sağkalım

Hipokside, HIF-1 insülin-benzeri büyüme faktörü 2 (IGF2) ve transforme edici büyüme faktörü-alfa (TGF-alfa) gibi büyüme faktörlerini indükle.<sup>68,69</sup> Bu tür büyüme faktörlerinin kendi akraba reseptörlerine bağlanması sinyal transdüksiyonu yollarını aktive ederek hücre proliferasyonunu/sağkalımını destekler ve HIF-1alfa'nın kendisinin de ekspresyonunu stimüle eder.<sup>70</sup> Büyüme faktörleri hipoksiyle beraber bazı hücrelerde MAPK ve fosfatidilinositol 3 kinaz (P13K) sinyal yollarını aktive edebilir, hücre proliferasyonunu kolaylaştırabilirler. Bu ise IGF2 ve TGF-alfa kodlayıcıları da dahil olmak üzere bazı büyüme faktörleri, HIF-1alfa hedef genlerinin transkripsiyonel aktivitelerini artırır ve böylece kanser oluşumunda kritik bir öneme sahip olan otokrin-sinyalleme yollarına yardımcı olur.<sup>6,69,70</sup>

### Kanser gelişimi

Bazı insan kanserlerinde, muhtemelen intratümöral hipoksi veya genetik alterasyonlar sonucu HIF-1alfa ve HIF-2alfa'nın aşırı ekspresyonu bulunmuştur.<sup>5,71</sup> Tümör büyüklüğü artarken, tümör kütesinin içerisi yeterli kan damarı oluşturuluncaya kadar giderek hipoksikleşir. Tümör içerisindeki hipoksik koşullar HIF-1 stabilitesini ve aktivitesini artırabilir.<sup>2,71</sup> İmmunohistokimyasal analizler normal dokularda olmamasına karşılık; benign tümörlerde saptanabilir miktarlarda, malign tümörlerde artmış

miktarlarda, metastazlarda ise aşırı miktarlarda HIF-1alfa proteini bulunduğunu göstermiştir.<sup>72,73,74</sup>

Kanser hücrelerinde artmış HIF-1alfa ekspresyonuna bağlı olarak kayda değer sıklıkta genetik alterasyonlar vardır. Örneğin, VHL hastalıklarında belirtildiği gibi VHL fonksiyon kaybı, temelde HIF-1alfa protein miktarının artışına sebep olur.<sup>75</sup> İnsan kanserlerinin pek çoğunda fonksiyon kaybı tespit edilen p53'ün, HIF-1alfa'nın ve HIF-2alfa'nın hedef gen transkripsiyonlarının artmasına sebep olduğu belirtilmektedir.<sup>76,77</sup> Diğer yandan, Rous sarkom (v-Src) retroviral onkogeninin transformasyon potansiyelinin kısmen HIF-1 indüklemesine bağlı olduğu ve v-Src'nin fonksiyon kazanmasının da HIF-1alfa ekspresyonunu artırdığına dair deliller bulunmaktadır.<sup>78</sup> Başka bir bulguda, reseptör tirozin kinazın (HER2) sinyalleme artışının HIF-1alfa sentezini artırdığı yönündedir.<sup>79</sup> HER2 aktivitesindeki

artışın meme kanserlerinde yaygın ve önemli bir genetik alterasyon olduğu bunun da tümör agresifliği, tedavi direnci ve hasta ömrüyle korelasyon gösterdiği bildirilmiştir.<sup>56,70,80</sup>

Keşfinden buyana HIF'in hakkında bildiklerimiz eksponansiyel olarak artmıştır. Hipoksinin gen ekspresyonu yoluyla hücre biyolojisi ve memeli fizyolojisindeki önemi ve oksijen homeostazında oynadığı kritik rol bize adeta bir orkestra şefi gibi davrandığını düşündürmektedir.

Araştırmalar HIF-1alfa geninde bulunan polimorfizmlerin ifadelenen proteinlerin aktivitesinde etkili olabileceğini göstermiştir.<sup>61,81</sup> Bu bilgi birikiminin ileride kanser dahil birçok hastalığın tanı ve tedavisi için ümit verici gelişmelerin habercisi olduğu kanısındayız.

## References

1. Avni R, Cohen B, Neeman M. Hypoxic stres and cancer: Imaging the axis of evilin tumor metastasis. *NMR Biomed* 2011; 24: 569-581.
2. Bahadori B, Uitz E, Mayer A, Harauer J, Dam K, Truschnig-Wilders M, Pilger E, Renner W. Polymorphisms of the hypoxia-inducible factor 1 gene peripheral artery disease. *Vascular Medicine* 2010; 15(5): 371-374.
3. Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 $\alpha$  in normoxia. *EMBO J* 2003; 22: 4082-4090.
4. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 2001; 294: 1337-1340.
5. Brusselmans K, Bono F, Maxwell P, Dor Y, Dewerchin M, Collen D, Herbert JM, Carmeliet P. Hypoxia-inducible factor 2- $\beta$  (HIF-2 $\beta$ ) is involved in the apoptotic response to hypoglycemia but not to hypoxia. *J Biol Chem* 2001; 276: 39192-39196.
6. Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 2001; 276: 9519-9525.
7. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 507-521.
8. Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 68-72.
9. Domene C, Illingworth CJR. Effects of point mutations in pVHL on the binding of HIF-1 $\alpha$ . *Proteins* 2012; 80: 733-746.
10. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakola P, Barstead R, Hodgkin PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001; 107: 43-54.
11. Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 1999; 59: 3915-3918.
12. Gorchach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, Berchner-Pfannschmidt U, Roth U, Brandes RP, Kietzmann T, Busse R. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res* 2001; 89: 47-54.
13. Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 38-47.
14. Hes FJ, Höppener WM, Luijt RB, Lips CJM. Von Hippel-Lindau Disease. *Hereditary Cancer Clinical Practice* 2005; 3(4): 171-178.
15. Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Stuart DI, Jones EY. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 by pVHL. *Nature* 2002; 417: 975-978.
16. Hsiao PC, Chen MK, Su SC, Ueng KC, Chen YC, Hsieh YH, Liu YF, Tsai HT, Yang SY. Hypoxia inducible factor-1a gene polymorphism G1790A and its interaction with tobacco and alcohol consumptions increase susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Journal of Surgical Onc* 2010; 102: 163-169.
17. Hupp TR, Hayward RL, Wojtesek B. Strategies for p53 reactivation in human sarcoma. *Cancer Cell* 2012; 22(3): 283-5.
18. Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG, Goldberg MA. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(20): 10595-9.
19. Illingworth CJR, Loenarz C, Schofield CJ, Domene C. Chemical basis for the selectivity of the von Hippel Lindau tumor suppressor pVHL for prolyl-



- hydroxylated HIF-1 $\alpha$ . *Biochemistry* 2010; 49: 6936-6944.
20. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG. HIF1 $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* 2001; 292: 464-468.
  21. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF-1 $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; 292: 468-472.
  22. Jain S, Maltepe E, Lu MM, Simon C, Bradfield CA. Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mech Dev* 1998; 73: 117-123.
  23. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW. Regulation and destabilization of HIF-1 $\alpha$  by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 2002; 111: 709-720.
  24. Jiang BH, Agani F, Passaniti A, Semenza GL. V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: Involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res* 1997; 57: 5328-5335.
  25. Josko J, Gwozdz B, Jędrzejowska-Szypulka H, Hendryk S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit* 2000; 6: 1047-1052.
  26. Kaelin W. The von Hippel-Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338(1): 627-38.
  27. Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, Conaway JW. Activation of HIF 1 $\alpha$  ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 10430-10435.
  28. Kanno H, Saljooque F, Yamamoto I, Hattori S, Yao M, Shuin T. Role of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein during neuronal differentiation. *Cancer Res* 2000; 60: 2820-2924.
  29. Ke Q, Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 2006; 70: 1469-1480.
  30. Kelsey JL. Breast cancer epidemiology: Summary and future direction. *Epidemiol Rev* 1993; 15: 256-263.
  31. Kim MS, Kwon HJ, Lee YM, Baek JH, Jang JE, Lee SW, Moon EJ, Kim HS, Lee SK, Chung HY, et al. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med* 2001; 7: 437-443.
  32. Knechtel G, Szkandera J, Stotz M, Hofmann G, Langsenlehner U, Kripp P, Samonigg H, Renner W, Langner C, Dehchamani D, Gerger A. Single nucleotide polymorphisms in the Hypoxia-Inducible Factor-1 gene and colorectal cancer risk. *Molecular Carcinogenesis* 2010; 49: 805-809.
  33. Konac E, Dogan I, Onen HI, Yurdakul AS, Ozturk C, Varol A, Ekmecki A. Genetic Variations in the Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Gene and Lung Cancer. *Experimental Biology and Medicine* 2009; 234: 1109-1116.
  34. Kondo K, Kim WY, Lechpammer M, Kaelin WG. Inhibition of HIF-2 $\alpha$  is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. *PLoS Biol* 2003; 1: 439-444.
  35. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Polychronidis A, Simopoulos C, Gatter KC, Harris AL, Sivridis E. Endogenous markers of hypoxia/anaerobic metabolism and anemia in primary colorectal cancer. *Cancer Sci* 2006; 97(7): 582-588.
  36. Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, Iyer N, LaRusch J, Pak B, Taghavi P, et al. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 2003; 63: 1138-1143.
  37. Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S, Hiyama T, Hiyama T, Tanimoto K, Chayama K. Mutation of the von Hippel-Lindau (VHL) gene in human colorectal carcinoma: Association with cytoplasmic accumulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1. *Cancer Sci* 2004; 95: 149-153.
  38. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of HIF. *Genes Dev* 2002; 16: 1466-1471.
  39. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 3995-4004.
  40. Lee J, Bae S, Jeong J, Kim S, Kim K. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) $\alpha$ : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 2004; 36: 1-12.
  41. Li J, Davidson G, Huang Y, Jiang BH, Shi X, Costa M, Huang C. Nickel compounds act through phosphatidylinositol-3-kinase/Akt-dependent, p70(S6k)-independent pathway to induce hypoxia inducible factor transactivation and Cap43 expression in mouse epidermal C141 cells. *Cancer Res* 2004; 64: 94-101.
  42. Liao D, Corle C, Seagroves TN, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res* 2007; 67(2): 563-572.
  43. Lu H, Forbes RA, Verma A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* 2002; 277: 23111-23115.
  44. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 $\alpha$  and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 2001; 15: 2675-2686.
  45. Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 $\alpha$  locus. *J Biol Chem* 2002; 277: 32405-32408.
  46. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, Semenza GL. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 2005; 105: 659-669.
  47. Manohar SM, Padgaonkar AA, Jalota-Badwar A, Sonawane V, Rathos MJ, Kumar S, Joshi KS. A novel inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  P3155 also modulates PI3K pathway and inhibits growth of prostate cancer cells. *BMC Cancer* 2011; 11: 338-348.
  48. Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- $\alpha$  chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J* 2001; 20: 5197-206.
  49. Maynard MA, Ohh M. Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible factor in kidney cancer. *Am J Nephrol* 2004; 24: 1-13.
  50. Maynard MA, Qi H, Chung J, Lee EHL, Kondo Y, Hara S, Conaway RC, Conaway JW, Ohh M. Multiple splice variants of the human HIF-3 $\alpha$  locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 Ubiquitin Ligase complex. *J Biol Chem* 2003; 278: 11032-11040.
  51. Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG, Pavletich NP. Structure of an

- HIF-1 $\alpha$  -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 2002; 296: 1886-1889.
52. Minet E, Michel G, Mottet D, Raes M, Michiels C. Transduction pathways involved in Hypoxia-Inducible Factor-1 phosphorylation and activation. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 847-855.
53. Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim T, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the  $\beta$ -domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 423-427.
54. Park S, Dadak AM, Haase V, Fontana L, Giaccia AJ, Johnson R. Hypoxia-induced gene expression occurs solely through the action of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ): role of cytoplasmic trapping of HIF-2 $\alpha$ . *Mol Cell Biol* 2003; 23: 4959-4971.
55. Prior SJ, Hagberg JM, Phares DA, Brown MD, Fairfull L, Ferrell RE, Roth SM. Sequence variation in hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1A): Association with maximal oxygen consumption. *Physiol Genomics*. 2003; 15(1): 20-6.
56. Putra A, Tanimoto K, Arifin M, Hiya K. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  polymorphisms are associated with genetic aberrations in lung cancer. *Respirology* 2011; 16: 796-802.
57. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes Dev* 2000; 14: 34-44.
58. Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 $\alpha$  is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 1998; 17: 3005-3015.
59. Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* 2000; 60: 4010-4015.
60. Salnikow K, Blagosklonny MV, Ryan H, Johnson R, Costa M. Carcinogenic nickel induces genes involved with hypoxic stress. *Cancer Res* 2000; 60: 38-41.
61. Salnikow K, Donald SP, Bruick RK, Zhitkovich A, Phang JM, Kasprzak KS. Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J Biol Chem* 2004; 279: 40337-40344.
62. Schwab LP, Peacock DL, Majumdar D, Ingels JF, Jensen LC, Smith KD, Cushing CR, Seagroves TN. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  promotes primary tumor growth and tumor-initiating cell activity in breast cancer. *Breast Cancer Research* 2012; 14: 6-8.
63. Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, Laderoute K. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 3436-3444.
64. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 5447-54.
65. Semenza GL. Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer. *Intern Med* 2002; 41: 79-83.
66. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-732.
67. Semenza GL. Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Physiology* 2008; 24: 97-106.
68. Semenza GL. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Seminars in Cancer Biology* 2009; 19: 12-16.
69. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current Opinion in Genetics & Development* 2010; 20: 51-56.
70. Shimomura M, Hinoi T, Kuroda S, Adachi T, Kawaguchi Y, Sasada T, Takakura Y, Egi H, Okajima M, Tashiro H, Nishizaka T, Ohdan H. Overexpression of Hypoxia Inducible Factor-1 Alpha is an independent risk factor for recurrence after curative resection of colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol* 2013; 10434: 2945-52.
71. Sodhi A, Montaner S, Patel V, Zohar M, Bais C, Mesri EA, Gutkind JS. The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor upregulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Cancer Res* 2000; 60: 4873-4880.
72. Stiehl DP, Jelkmann W, Wenger RH, Hellwig-Burgel T. Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  by insulin and interleukin-1 $\beta$  involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett* 2002; 512: 157-162.
73. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000; 157: 411-421.
74. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 1997; 11: 72-82.
75. Vaupel P, Hockel M, Mayer A. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO<sub>2</sub> histography. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(8): 4010-4015.
76. Vleugel MM, Greijer AE, Van Der WE, Van Diest PJ. Mutation analysis of the HIF-1 $\alpha$  oxygen-dependent degradation domain in invasive breast cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2005; 163: 168-172.
77. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J* 2002; 16: 1151-1162.
78. Whiteway M, Szostak JW. The ARD1 gene of yeast functions in the switch between the mitotic cell cycle and alternative developmental pathways. *Cell* 1985; 43: 483-492.
79. Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Horstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt KU. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 $\alpha$  in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* 2003; 17: 271-273.
80. Yamada N, Horikava Y, Oda N, Lizuka K, Shihara N, Kishi S, Takeda J. Genetic variation in the Hypoxia-Inducible-1 $\alpha$  gene is associated with type 2 diabetes in Japanese. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2005; 90: 5841-47.
81. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, et al. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* 2000; 14: 391-396.