

文章编号: 1004-0374(2013)01-0040-07

低氧诱导因子-1激活的调节

赵琛, 谭斐*

(中国医科大学附属盛京医院神经内科, 沈阳 110004)

摘要: 低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是细胞对缺氧反应的关键调节者,能激活100多种与缺氧条件下细胞存活有关的基因转录。它是由 α 和 β 两个亚基组成的异源二聚体,而HIF-1 α 是决定其活性的功能性亚基。HIF-1 α 的合成主要受PI3K及MAPK通路调节。在常氧条件下,由于氧依赖性的及氧非依赖性的通路HIF-1 α 被降解,几乎没有活性。当细胞缺氧时,HIF-1 α 积累,然后通过输入蛋白的转运进入细胞核,与HIF-1 β 形成HIF-1,后者与辅激活因子一起与靶DNA结合,从而发挥其转录激活功能。就HIF-1激活的调节作一综述。

关键词: 低氧诱导因子-1; 细胞核转运; 激活

中图分类号: Q256; Q257 **文献标志码:** A

The regulation of HIF-1 activation

ZHAO Chen, TAN Fei*

(Department of Neurology, Shengjing Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China)

Abstract: Hypoxia-inducible factor-1 is a key regulator of the cellular response to hypoxia, activating the transcription of more than 100 genes crucial for adaptation to hypoxia. It is a heterodimer of the regulated HIF-1 α subunit and the constitutively expressed HIF-1 β subunit. The synthesis of HIF-1 α is mainly regulated by the PI3K and MAPK pathways. It is degraded through oxygen-dependent or oxygen-independent mechanisms under normoxic condition. Under hypoxic condition, HIF-1 α accumulates, translocates into the nucleus by importins, and interacts with HIF-1 β to form HIF-1. Together with coactivator, HIF-1 binds the targeted-DNA to exert the transcriptional activation function. Here we reviewed the regulation of HIF-1 activation.

Key words: hypoxia-inducible factor-1; nuclear translocation; activation

低氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是细胞对缺氧应答的关键调节因子,其激活与多种生理病理过程密切相关,包括血管重塑、肿瘤生长、细胞代谢等。了解其激活的调节可以为许多疾病的治疗提供思路。

1 HIF-1的结构

HIF-1是由HIF-1 α 和HIF-1 β 组成的异源二聚体。HIF-1 α 是HIF-1的功能性亚基,由826个氨基酸组成,相对分子质量约120 kDa。HIF-1 α 的N-端具有碱性螺旋-环-螺旋结构域(basic-helix-loop-helix domain, bHLH)和PAS(Per-ARNT/Abr-Sim)结构域,其功能是使HIF-1 α 与HIF-1 β 异二聚化形成

HIF-1,以及促进HIF-1与靶基因DNA上的缺氧反应元件(hypoxic responsive elements, HRE)结合。HIF-1 α 的C-端包括两个反式激活区(transactivation domain, TAD),即N-TAD(531~575 aa)和C-TAD(786~826 aa)。这两个TAD之间的区域为抑制性结构域(inhibitory domain, ID; 576~785 aa),能抑制HIF-1 α 在常氧条件下的反式激活作用。此外,HIF-1 α 还存在两个核定位信号(nuclear localization signal, NLS)及一个细胞核输出信号(nuclear export signal,

收稿日期: 2012-07-17; 修回日期: 2012-08-25

基金项目: 辽宁省科委社发基金项目(2012225016)

*通信作者: E-mail: tanf@sj-hospital.org

NES), 分别位于 N-端 17~33 aa、C-端 718~721 aa 及 632~639 aa, 其中 C-NLS 和 NES 在介导 HIF-1 α 进出细胞核的过程中起着关键作用。在常氧条件下 HIF-1 α 能很快被降解, 与降解有关的结构域即氧依赖性降解结构域 (oxygen-dependent degradation domain, ODDD; 401~603 aa)(图 1), 它含有两个类 PEST 结构域 (499~518 aa 和 581~600 aa), 即富含

脯氨酸 (P)、谷氨酸 (E)、丝氨酸 (S) 和苏氨酸 (T) 的一段氨基酸序列, 该结构域被发现存在于半衰期不到 2 h 的蛋白质中, 与蛋白质在细胞内迅速降解有关^[1]。HIF-1 β 亚基又称芳香烃受体核转运蛋白 (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT), 是 HIF-1 的结构性亚基, 不受氧浓度的影响, 在细胞核内稳定表达。

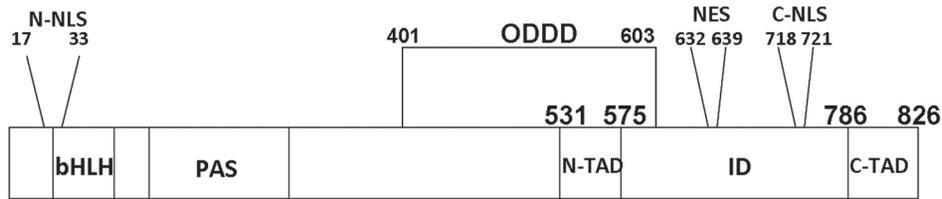


图1 HIF-1 α 的结构

2 HIF-1的调节

HIF-1 是在生理和病理条件下维持氧稳态的关键调节因子, 其生理学功能由 HIF-1 α 决定, 而 HIF-1 α 激活的调节是一个多步骤的过程, 涉及到 HIF-1 α 稳定、细胞核转运、异二聚化, 以及与辅激活因子一起结合到靶基因 DNA 的 HRE 上发挥转录激活功能。

2.1 HIF-1 α 的合成

常氧条件下 HIF-1 α 蛋白的合成主要受磷脂酰肌醇-3 激酶 (phosphatidyl inositol 3-kinase, PI3K) 及促分裂源活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路调节。PI3K 通路能通过 Akt (protein kinase B) 及 mTOR (mammalian target of rapamycin) 介导 HIF-1 α 的翻译, 而 MAPK 通路 (RAS-MEK-ERK) 能通过细胞外信号调节激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 启动 HIF-1 α 的翻译。mTOR 和 ERK 能通过灭活翻译抑制因子即真核起始因子 4E-结合蛋白 (4E-BP) 或者激活核糖体蛋白 6S 激酶 (p70S6K) 来激活特异的 mRNA 序列的翻译^[2-3]。真核起始因子 4E (eukaryotic initiation factor 4E, eIF4E) 是一种帽结合蛋白, 可以与 eIF4G、eIF4A 共同组成真核细胞翻译启动因子 (eukaryotic initiation factor 4F, eIF4F), 后者与 mRNA 的 5' 端帽子结合, 从而启动 HIF-1 α 翻译的开始。目前普遍认为 eIF4E 在帽依赖性翻译的起始阶段起中心调节作用。4E-BP 可以与 eIF4E 结合抑制 eIF4F 复合体的形成。低磷酸化的 4E-BP 与 eIF4E

有高亲和力, 可以与 eIF4G 竞争 eIF4E 结合位点, 因此能阻止 eIF4F 复合体的形成及翻译的起始。当 4E-BP 磷酸化时, 释放 eIF4E, 使之与 eIF4G、eIF4A 结合形成 eIF4F, 提高蛋白质的翻译效率。mTOR 及 ERK 的激活可以在多个位点上使 4E-BP 磷酸化, 进而释放 eIF4E, 允许 eIF4F 复合体形成及随后的帽依赖的翻译^[4]。而且, MAPK 通路也可以激活 MAPK 信号-融合激酶 (MAPK signal integrating kinase, MNK), 后者能够发挥 eIF4E 激酶活性, 从而促进 eIF4F 复合体的形成^[5](图 2)。

p70S6K 介导的 HIF-1 α 的翻译机制目前尚有争议, 但 p70S6K 的激活与增加的 HIF-1 α 翻译之间的

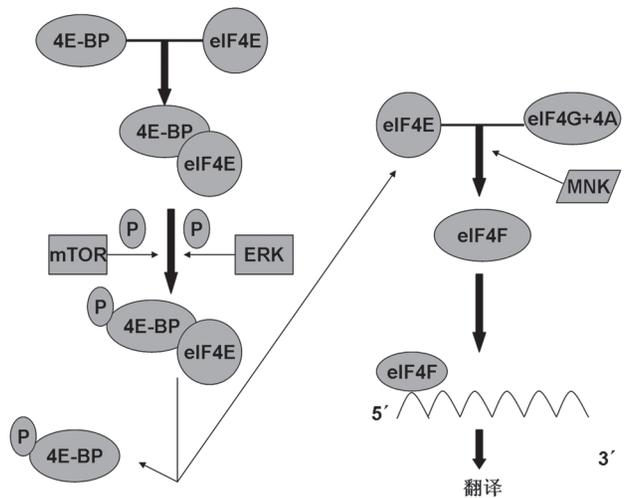


图2 mTOR/ERK介导的HIF-1 α 的合成

关系是广泛被接受的。起初, 研究推测 p70S6K 能通过激活 HIF-1 α mRNA 序列上的 5'-寡嘧啶序列 (5' TOP) 对核糖体的亲和力来刺激 HIF-1 α 的翻译。但是新的研究发现 HIF-1 α mRNA 并不一定存在 5' TOP 序列^[6-7]。因此, 其具体机制有待于进一步研究。

在缺氧条件下, 尽管大部分蛋白质的合成下降, 但是 HIF-1 α mRNA 的翻译是连续的, 因此, 允许缺氧细胞在恶劣的条件下, 激活对细胞存活有关键作用的必要基因的转录。这种整体翻译被抑制而 HIF-1 α 的翻译却连续进行的机制并不清楚。一种可能的机制是与内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES) 有关。IRES 不需要 eIF4F 翻译起始复合体存在就可以启动翻译^[8]。它是一段较短的位于 HIF-1 α 5' 端的 RNA 序列 (150~250 bp), 能折叠成类似于起始 tRNA 的结构, 从而介导核糖体与 HIF-1 α mRNA 结合, 通过帽-非依赖的方式启动其翻译。但是 Young 等^[9]在评估缺氧条件下 IRES 介导的 HIF-1 α 翻译时, 发现只有 <1% 的转录活性是由 IRES 介导的, 这暗示 IRES 的作用并不是主要的。另一种机制与 RNA 结合蛋白 PTB (polypyrimidine tract-binding protein) 和 HuR 有关。Galban 等^[10]发现, 在 COCl₂ 处理的缺氧模型中, PTB 和 HuR 能分别与 HIF-1 α 的 3' 非翻译区 (untranslated region, UTR) 和 5' UTR 结合, 相互协同共同促进 HIF-1 α 的翻译。

MicroRNAs (miRNAs) 在调节 HIF-1 α 翻译方面的作用也越来越引起重视。MiRNAs 是一种小的内源性非编码 RNA 分子, 由 21~25 nt 组成。这些小的 miRNAs 通过与靶基因 mRNA 碱基配对, 利用 RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 来降解 mRNA 或阻碍其翻译。目前发现, miRNA-17-92 簇、-155、-199 及 -519c 等可以直接与 HIF-1 α 的 mRNA 碱基配对来抑制其翻译^[11-14]。miRNA-21 可以间接增强 HIF-1 α 的表达, 主要是通过靶定肿瘤抑制因子 PTEN (phosphatase and tension homolog) 使其表达减少; 而 PTEN 减少可以激活 AKT 和 ERK, 从而增加 HIF-1 α 的表达^[15]。

2.2 HIF-1 α 的降解及稳定

2.2.1 氧依赖性的降解及稳定

在常氧条件下, HIF-1 α 迅速被降解, 其半衰期很短, 几乎不能被检测到。常氧时脯氨酸羟化酶 (prolyl hydroxylases domain-containing protein, PHD) 能使 HIF-1 α ODDD 区 564 位 (Pro564) 和 (或) 402 位的脯氨酸 (Pro402) 发生羟基化, 羟基化的 HIF-1 α

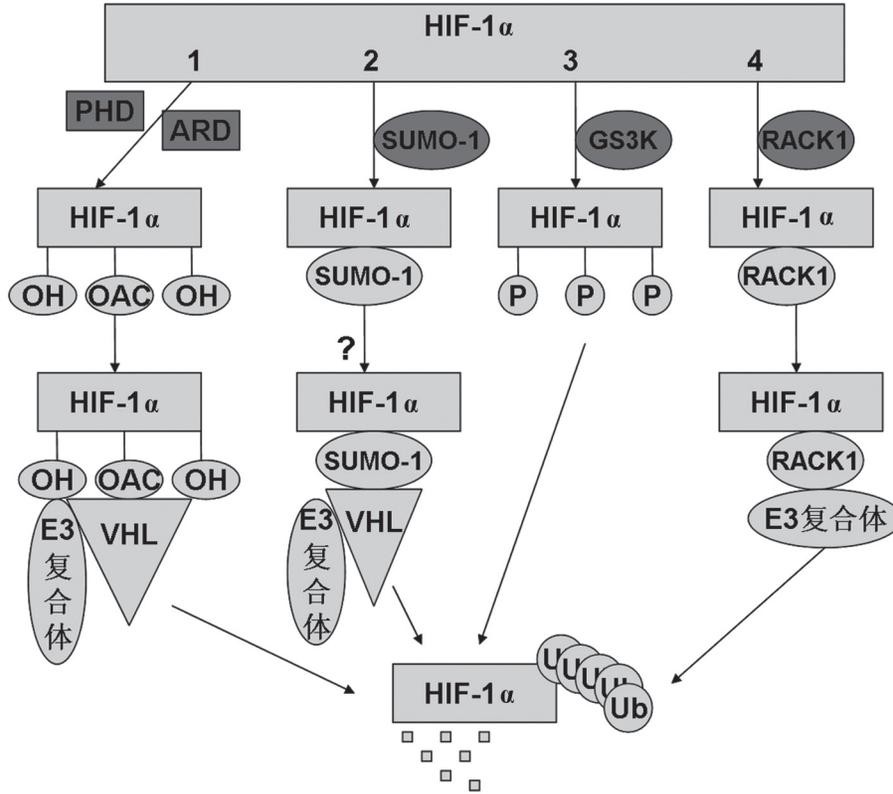
为肿瘤抑制蛋白 VHL (von Hippel-Lindau tumour suppressor protein, pVHL) 与 ODDD 区结合提供了识别信号^[16]。pVHL 具有 E3 泛素蛋白酶活性, 一旦 HIF-1 α 被羟基化, 它就会与 HIF-1 α 的 ODDD 区域结合, 并募集 elonginB、elonginC、cullin-2 和 RBX1 (ring-box 1) 形成 E3 泛素连接酶复合体, 使 HIF-1 α 泛素化, 然后被 26S 蛋白酶体结合并降解。乙酰基转移酶 (acetyl-transferase named arrest-defective-1, ARD1) 能通过催化 HIF-1 α 532 位的赖氨酸 (Lys532) 乙酰化来促进 pVHL 与 HIF-1 α 结合, 从而加速 HIF-1 α 的降解^[17](图 3 通路 1)。

PHDs 是 2-酮戊二酸依赖性的双加氧酶, 其催化过程需要 O₂、Fe²⁺ 和维生素 C。在哺乳动物细胞中发现 3 种脯氨酸羟化酶——PHD1/EGLN2、PHD2/EGLN1 和 PHD3/EGLN3。它们的相对活性大小为 PHD2 > PHD3 > PHD1。常氧时, 用特异性的小干扰 RNA (siRNA) 敲除 PHD2 可以有效地稳定 HIF-1 α 的水平, 然而用同样的方法处理 PHD1 或 PHD3 都不能对 HIF-1 α 产生类似的影响^[18]。由此可见, PHD2 是常氧条件下体内控制 HIF-1 α 循环的关键限制酶^[19]。pVHL 是一种肿瘤抑制因子, 其突变可以引起一种显性遗传的肿瘤综合征, 常见发生肿瘤有中枢神经系统和视网膜成血管细胞瘤、肾透明细胞癌、嗜铬细胞瘤、胰岛细胞瘤和附睾囊肿等^[20]。在缺乏野生型 pVHL 的细胞中, HIF-1 α 在常氧条件下能够保持稳定且有活性, 这导致了缺氧诱导基因的过表达。在缺氧条件下, PHDs 没有活性, 脯氨酸残基没有发生羟基化, pVHL 不能结合, 这导致 HIF-1 α 的稳定及累积。这种对氧气的绝对需要说明 PHDs 是细胞内的氧传感器。

2.2.2 HIF-1 α 氧非依赖性的降解及稳定

氧依赖的 pVHL 通路不是导致 HIF-1 α 降解的唯一通路, 还有一些蛋白可以影响 HIF-1 α 的稳定。

小泛素蛋白样修饰蛋白 (small ubiquitin-like modifier, SUMO) 是泛素样蛋白家族的一员, 可共价结合许多靶底物蛋白, 并对其进行翻译后修饰, 该过程称为 SUMO 化。起初发现, SUMO-1 可以使 HIF-1 α 发生 SUMO 化, 在常氧和缺氧情况下过表达 SUMO-1, 能增加 HIF-1 α 的稳定性及其转录活性^[21], 其机制可能是由于 HIF-1 α 的 Ψ KxE (Ψ 代表大的疏水性残基; x 代表任意氨基酸) 序列中第 391 位和 477 位赖氨酸 (Lys391 和 Lys477) 残基是 SUMO 化的修饰位点, SUMO 化可能与泛素化共同竞争 HIF-1 α 的同一修饰位点: Lys391 和 Lys477,

图3 HIF-1 α 的降解

阻碍 HIF-1 α 通过泛素化蛋白酶体系统的途径降解, 进而增加 HIF-1 α 的稳定性及转录活性^[22]。但是新的证据表明, HIF-1 α 的 SUMO 化能导致 HIF-1 α 降解。缺氧时 SUMO 化的 HIF-1 α 通过与 pVHL 的 β 亚基结合, 形成氧非依赖性的 HIF-1 α -pVHL-E3 连接酶复合体, 导致 HIF-1 α 泛素蛋白化及降解^[23](图 3 通路 2)。当脯氨酸羟化酶缺失时, pVHL 也能通过以上途径与 HIF-1 α 结合。因此, SUMO 对 HIF-1 α 的作用是有争议的, 有待于进一步研究。

PI3K/Akt 信号通路不仅参与 HIF-1 α 的合成, 也能通过不同的机制来调节 HIF-1 α 的降解。一种机制是通过糖原合成酶激酶 3 (GSK3) 来介导的。GSK3 由 α 和 β 两个亚基组成, 有两种存在形式: 丝氨酸-9 (Ser-9) 磷酸化是其失活形式, 酪氨酸-216 (Tyr-216) 磷酸化是其活性形式。活性的 GSK3 能使 HIF-1 α 上 551 位丝氨酸 (Ser551)、555 位苏氨酸 (Thr555)、589 位丝氨酸 (Ser589) 磷酸化, 磷酸化后 HIF-1 α 发生泛素蛋白化并且降解^[24](图 3 通路 3)。短暂的缺氧能激活 PI3K-Akt 通路, 后者能使 GSK3 以失活的 Ser-9 磷酸化形式存在, 从而阻止 HIF-1 α 降解; 而长期缺氧能抑制 PI3K/Akt 通路, GSK3 上 Ser-9 磷酸化减少进而允许 GSK3 以酪氨酸-216

(Tyr-216) 磷酸化的活性形式存在, 后者诱导 HIF-1 α 降解^[25]。另一种机制是通过叉头样转录因子 (fork-head box O4, FOXO4) 来实现的。PI3K-Akt 能使 FOXO4 磷酸化从而阻止其进入细胞核, 而 FOXO4 进入细胞核后可以诱导 HIF-1 α 泛素蛋白化及降解^[26]。

此外, 接头蛋白 RACK1 (receptor for activated protein C kinase 1) 和热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP90) 也可以通过类似 pVHL 通路的方式来调节 HIF-1 α 的稳定性。RACK1 同源二聚化后可以与 HIF-1 α 的 PAS 区域结合, 然后募集 elongin C 及 E3 连接酶复合体的其他成分, 导致 HIF-1 α 泛素蛋白化及降解 (图 3 通路 4)。而 HSP90 可以与 RACK1 竞争结合 HIF-1 α 的 PAS 区域, 阻止 HIF-1 α 的泛素化降解^[27]。

总之, 通过翻译后的降解对 HIF-1 α 蛋白质水平的调节非常复杂, 包括许多通路和调节因子, 有一些还没有完全证明, 还需要更进一步的工作来为这些通路提供一个清晰的思路。

2.3 HIF-1 α 的细胞核转运

一种蛋白在细胞核积累的程度依赖于其细胞核输入和输出的相对比例^[28]。经典的 HIF-1 α 的细胞

核输入是通过细胞核输入蛋白 (importin) 介导的。Importin 是一种 NLS 的受体蛋白, 有 α 和 β 两种亚基组成, 可与核蛋白上的 NLS 结合, 帮助核蛋白进入细胞核。细胞质中的 HIF-1 α 能通过其 C 端 -NLS 与 importin α/β 结合进入细胞核, 而 N 端 -NES 则无此功能^[29]。Chachami 等^[30] 发现除了经典的 C-NLS-importin α/β 通路外, importin 4 和 7 也可以介导 HIF-1 α 的细胞核输入。它们可以直接与 HIF-1 α 结合, 促进其进入细胞核。两条通路的不同在于 importin α/β 可能是在内层核膜的周围释放 HIF-1 α ; 而 importin 4 和 7 是在细胞核的里面释放 HIF-1 α , 即 importin 4 和 7 只有遇到 ARNT 和 (或) HRE 结合位点时才会释放 HIF-1 α , 这与一项研究结果相一致: importin7 是与 HIF-1 α 的 1~251 aa 结合, 而这部分氨基酸包含 bHLH 和 PAS 区域, 后两者介导 HIF-1 α 的异二聚化及与靶基因结合^[30]。

HIF-1 α 的细胞核输出涉及到 MAPK 通路。起先有学者发现 HIF-1 α 蛋白在 SDS-PAGE 胶上总是出现相对分子质量比预期大小 104 kDa 多 20 kDa 的弥散条带。随后发现, 无论在常氧还是低氧条件下, 磷酸化都能改变 HIF-1 α 在胶上的迁移率, 并证实是 P42/P44 MAPK 在起作用, 它能在体内外磷酸化 HIF-1 α 并增加其转录激活活性, 而且不同细胞具有不同的 P42/P44 MAPK 活性基础水平, 这与磷酸化的 HIF-1 α 水平变化具有相关性。在大多数

文献报道中, MAPK 并不改变 HIF-1 α 蛋白表达、稳定性及 DNA 结合活性, 而是促进 HIF-1 α 的转录活性。MAPK 使 HIF-1 α 转录活性增加涉及到不同机制, 其中一种机制涉及到 HIF-1 α 的细胞核输出。HIF-1 α 细胞核输出的主要成分位于 HIF-1 α C 端 -NES, 它是一种不典型的疏水性的细胞核输出因子 1(nuclear exporting factor 1, CRM1)- 依赖的信号。细胞核内的 HIF-1 α 可以通过其 NES 与 CRM1 结合, 使其从细胞核中输出; 但是当 NES 邻近的 641 (Ser641) 和 (或) 643 位丝氨酸 (Ser643) 位点被 MAPK 磷酸化时, NES 就被掩盖起来, 不能与 CRM1 结合, 从而使得磷酸化的 HIF-1 α 在细胞核积累^[31](图 4)。

2.4 HIF-1 α 的异二聚化、转录激活及与其他蛋白质相互作用

HIF-1 α 的稳定及细胞核移位对其功能的发挥是必要的, 但是仅仅有这些是不够的。磷酸化的 HIF-1 α 必须与 HIF-1 β 异二聚化形成 HIF-1, 然后通过其活性区域 N-TAD 和 C-TAD 与 P300/CBP (CREB-binding protein) 等辅激活因子结合形成活性复合体, 后者与靶基因上的 HRE 结合, 从而发挥其转录激活活性。P300/CBP 有较强的组蛋白乙酰化功能, 能调节局部染色质的结构重塑及增加 DNA 与其他调节因子的结合^[32]。

常氧条件下, 低氧诱导因子 -1 抑制因子 (factor

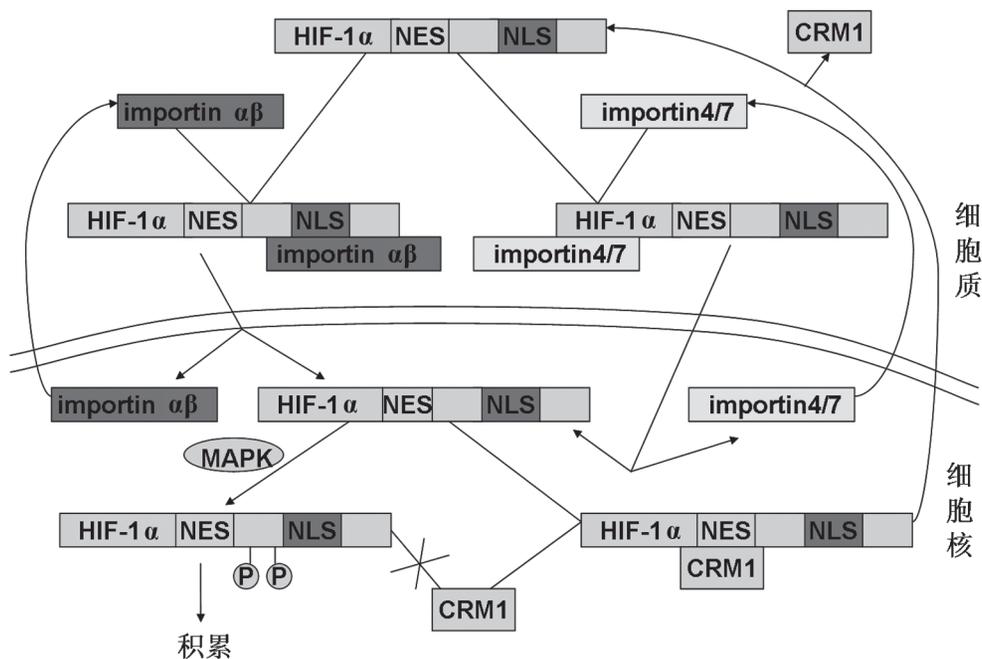


图4 HIF-1 α 的细胞核转运

inhibiting HIF-1, FIH-1) 的 N 端能与 HIF-1 α 的 ID 区域结合, 而其 C 端虽不能与 HIF-1 α 结合但具有天冬酰胺羟化酶活性, 能催化 C-TAD 上的 803 位天冬酰胺 (Asn803) 羟基化, 这可以阻止 HIF-1 α 与 P300/CBP 结合^[33]。缺氧能取消 Asn803 羟基化, 进而允许 P300/CBP 与 HIF-1 α 的 C-TAD 有效结合, 激活靶基因的转录。

与 PHDs 一样, FIH-1 也是一个 2- 酮戊二酸依赖的, 需要 O₂、Fe²⁺ 及维生素 C 作为辅助因子的双加氧酶, 但是它们对于维持活性的氧浓度需求是不同的。在体外, PHDs 对氧的米氏常数 (K_m) 是 FIH-1 的 3 倍多。因此, 在轻度缺氧条件下 (1%~5% O₂) PHDs 即可灭活, 而此时 FIH-1 仍有活性。只有在严重缺氧条件下, FIH-1 才会被灭活^[34]。而且, PHDs 和 FIH-1 引起的三个位点的羟基化 (Pro402、Pro564、Asn803) 对缺氧的敏感性也有显著不同, 它们被缺氧抑制的顺序是 Pro402 > Pro564 > Asn803^[35]。

Li 等^[36]发现, pVHL 也能调节 FIH-1 的活性, 且 FIH-1 能与 pVHL 的 β 区域 (63~155 aa) 结合。在常氧条件下, HIF-1 α C-TAD 的 Asn803 被 FIH-1 羟基化, 而 pVHL 与 FIH-1 的结合能增强这种作用。在适度缺氧条件下, PHDs 失去活性, 这使得 HIF-1 α 积累。而且, FIH-pVHL 复合体解聚, 减弱了 FIH-1 与 C-TAD 的结合, 从而部分激活了 C-TAD。在严重缺氧条件下, FIH-1 和 PHDs 完全灭活, 因此 C-TAD 被充分激活^[36]。这也使得我们推测当氧浓度开始下降时, 细胞首先表达一系列由 N-TAD 调控的基因; 当氧浓度更低时, C-TAD 调控的基因才得以表达。

以往的研究认为, 只有 C-TAD 需要通过募集转录辅激活因子 p300/CBP 来发挥作用, 但是 Ruas 等^[37]研究发现, N-TAD 介导的转录活性也需要 CBP 的参与。不同的是, C-TAD 是与 CBP 的 CH1 区域结合, 而 N-TAD 是与其 CH3 区域结合。而且, Sang 等^[38]发现 MAPK 能增加 P300/CBP 募集到 HIF-1 α 上。可能是因为 P300 和 CBP 是 MAPK 的直接磷酸化底物, 也可能是因为 MAPK 能导致 P300/CBP- 相互作用因子池的磷酸化。这两种磷酸化都能对 P300/CBP 和不同蛋白因子的亲和力产生特定的影响, 从而导致 P300/CBP 在相互作用因子的复合体中重新分配。特别是, 因为 MAPK 信号能刺激 P300/CBP 的转录活性, 磷酸化事件很可能增加 P300/CBP 和基本转录机制的相互作用。

除了 MAPK 外, PI3K/Akt 通路也能间接调节 HIF-1 α 与 p300/CBP 的结合。PI3K/Akt 能使 FOXO3a (fork-head box O3a) 磷酸化, 从而诱导 14-3-3 蛋白的结合, 阻止 FOXO3a 进入细胞核。FOXO3a 进入细胞核后可以干扰 p300 募集到 HIF-1 α 上, 从而负性调节其转录激活活性^[39]。

3 展望

HIF-1 是维持细胞内氧平衡的关键调节因子, 在缺血诱导的血管生成、缺血后细胞代谢、肿瘤的发生、炎症反应以及细胞自噬等方面都起着非常重要的作用。因此, 了解其调节过程可为许多疾病的治疗提供靶点。但是还有很多 HIF-1 的调节机制并不完全清楚, 有待于进一步的研究和探索。

[参 考 文 献]

- [1] Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*, 2006, 25, 441(7092): 437-43
- [2] Jiang BH, Liu LZ. Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment. *Drug Resis Updat*, 2008, 11: 63-76
- [3] Reiling JH, Sabatini DM. Stress and mTOR signaling. *Oncogene*, 2006, 25: 6373-83
- [4] Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, et al. Molecular characterization and chromosomal localization of a third a-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 α . *Gene Expr*, 1998, 7: 205-13
- [5] O'Loughlen A, González VM, Piñero D, et al. Identification and molecular characterization of Mnk1b, a splice variant of human MAP kinase-interacting kinase Mnk1. *Exp Cell Res*, 2004, 299(2): 343-55
- [6] Thomas GV, Tran C, Mellingshoff IK, et al. Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. *Nat Med*, 2006, 12: 122-7
- [7] Yee KM, Spivak-Kroizman TR, Powis G. HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem Sci*, 2008, 33: 526-34
- [8] Zhou J, Callapina M, Goodall GJ, et al. Functional integrity of nuclear factor κ B, phosphatidylinositol 3'-kinase, and mitogen-activated protein kinase signaling allows tumor necrosis factor α -evoked Bcl-2 expression to provoke internal ribosome entry site-dependent translation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Cancer Res*, 2004, 64: 9041-8
- [9] Young RM, Wang SJ, Gordan JD, et al. Hypoxia-mediated selective mRNA translation by an internal ribosome entry site-independent mechanism. *J Biol Chem*, 2008, 283: 16309-19
- [10] Galban S, Kuwano Y, Pullmann R Jr, et al. RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Mol Cell Biol*, 2008, 28: 93-107

- [11] Taguchi A, Yanagisawa K, Tanaka M, et al. Identification of hypoxia-inducible factor-1 α as a novel target for miR-17-92 microRNA cluster. *Cancer Res*, 2008, 68: 5540-5
- [12] Bruning U, Cerone L, Neufeld Z, et al. MicroRNA-155 promotes resolution of hypoxia-inducible factor 1 α activity during prolonged hypoxia. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(19): 4087-96
- [13] Yeligar S, Tsukamoto H, Kalra VK. Ethanol-induced expression of ET-1 and ET-BR in liver sinusoidal endothelial cells and human endothelial cells involves and α hypoxia-inducible factor-1 microRNA-199. *J Immunol*, 2009, 183: 5232-23
- [14] Cha ST, Chen PS, Johansson G, et al. MicroRNA-519c suppresses hypoxia-inducible factor-1 α expression and tumor angiogenesis. *Cancer Res*, 2010, 70: 2675-85
- [15] Liu LZ, Li CY, Chen Q, et al. MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 α expression. *PLoS ONE*, 2011, 6(4): 19139
- [16] Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF-1 α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 2001, 292(5516): 468-72
- [17] Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, et al. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, 2002, 111: 709-20
- [18] Berra E, Benizri E, Ginouves A, et al. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J*, 2003, 22(16): 4082-90
- [19] Su Y, Loos M, Giese N, et al. Prolyl hydroxylase-2 (PHD2) exerts tumor-suppressive activity in pancreatic cancer. *Cancer*, 2012, 118(4): 960-72
- [20] Ivan M, Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, 11: 27-34
- [21] Bae SH. Sumoylation increases HIF-1 α stability and its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 324: 394-400
- [22] Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, et al. RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1 α during hypoxia. *Cell*, 2007, 131: 309-23
- [23] Cheng J, Kang X, Zhang S, et al. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1 α during hypoxia. *Cell*, 2007, 131: 584-95
- [24] Flugel D, Goriach A, Michiels C, et al. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1 α and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Mol Cell Biol*, 2007, 27: 3253-65
- [25] Mottet D, Dumont V, Deccache Y, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 β pathway in HepG2 cells. *J Biol Chem*, 2003, 278: 31277-85
- [26] Tang TT, Lasky LA. The forkhead transcription factor FOXO4 induces the down-regulation of hypoxia-inducible factor 1 α by a von Hippel-Lindau protein-independent mechanism. *J Biol Chem*, 2003, 278: 30125-35
- [27] Liu YV, Baek JH, Zhang H, et al. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1 α and is required for O₂-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1 α . *Mol Cell*, 2007, 25: 207-17
- [28] Pemberton LF, Paschal BM. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic*, 2005, 6: 187-98
- [29] Depping R, Steinhoff A, Schindler SG, et al. Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): Involvement of the classical importin α/β pathway. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783: 394-404
- [30] Chachami G, Paraskevac E, Mingot JM, et al. Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1 α into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 390: 235-40
- [31] Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, et al. Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by MAPK. *J Biol Chem*, 2008, 283(41): 27620-7
- [32] Bannister AJ, Kouzarides T. The CBP co-activated is a histone acetyltransferase. *Nature*, 1996, 384: 641-3
- [33] Sang NL, Fang J, Srinivas V, et al. Carboxyl-terminal transactivation activity of hypoxia-inducible factor 1 α is governed by a von hippel-lindau protein-independent, hydroxylation-regulated association with p300/CBP. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(9): 2984-92
- [34] Koivunen E, Hirsila MJ, Gunzler V, et al. Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl4-hydroxylases. *J Biol Chem*, 2004, 279(11): 9899-904
- [35] Tian YM, Yeoh KK, Lee MK, et al. Differential sensitivity of hypoxia inducible factor hydroxylation sites to hypoxia and hydroxylase inhibitors. *J Biol Chem*, 2011, 286(15): 13041-51
- [36] Li SH, Chun YS, Lim JH, et al. von Hippel-Lindau protein adjusts oxygen sensing of the FIH asparaginyl hydroxylase. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43: 795-804
- [37] Ruas JL, Berchner-Pfannschmidt U, Malik S, et al. Complex regulation of the transactivation function of hypoxia-inducible factor-1 by direct interaction with two distinct domains of the CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem*, 2010, 285(4): 2601-9
- [38] Sang NL, Stiehl DP, Bohensky J, et al. MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem*, 2003, 278(16): 14013-9
- [39] Emerling BM, Weinberh F, Liu JL, et al. PTEN regulates p300-dependent hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activity through Forkhead transcription factor 3 (FOXO3a). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 2622-7