

doi: 10.7541/2023.2019.261

PHD2基因在鲸类低氧信号通路中的功能

李颖^{1,2} 毕健玲^{1,2} 王丁^{1,3} 肖武汉^{1,3}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049;
3. 中国科学院水生生物多样性与保护重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 为研究鲸类低氧适应的分子机制, 文章克隆了不同低氧耐受能力的3个鲸类物种, 抹香鲸(*Physeter macrocephalus*)、白鲸(*Delphinapterus leucas*)和长江江豚(*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*)的脯氨酸羟化酶2(PHD2)。通过对其序列进行分析, 发现3个物种PHD2的氨基酸序列非常保守。通过对这3个物种的PHD2的功能进行探究发现: 3个物种的PHD2在常氧情况下均可以降解3个物种的HIF- α (包括HIF-1 α 和HIF-2 α)蛋白, 而在低氧(O_2 浓度小于2%)情况下, PHD2则无法明显降解HIF- α 蛋白。在常氧下, 鲸类的PHD2降解HIF- α 是依赖于识别鲸类的HIF-1 α 上LTLLAP和LEMLAP, HIF-2 α 的LAQLAP和LETLP氨基酸片段, 推测PHD2是通过HIF- α 序列中的脯氨酸位点进行羟基化修饰后, 被VHL-E3泛素连接酶复合体所识别, 发生泛素化降解。而在低氧条件下, PHD2的活性受到抑制HIF- α 不能被VHL-E3泛素连接酶复合体识别, 发生降解。研究对3种不同低氧耐受能力的鲸的PHD2功能进行初步探究, 发现3种鲸的PHD2在降解HIF- α (HIF-1 α 和HIF-2 α)的功能与已报道人PHD2功能相似。研究结果为更深入研究鲸类的PHD2与HIF的复杂反馈调控提供依据, 为脯氨酸羟化酶家族(PHDs)其他成员与HIF相互作用提供重要的参考资料, 也为深入研究鲸类的低氧耐受提供基础。

关键词: 抹香鲸; 白鲸; 长江江豚; 低氧耐受; 低氧诱导因子; 脯氨酸羟化酶

中图分类号: Q344⁺.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2023)05-0767-08



脯氨酸羟化酶(Prolyl hydroxylase domain enzymes, PHDs)是一类依赖 O_2 、 Fe^{2+} 和2-酮戊二酸的双加氧酶^[1]。它作为细胞的“氧感受器”, 在细胞和机体低氧感受、适应和耐受中起重要作用^[2], 又被称为Egl Nine Homolog 1(EGLN1)^[3]。PHD2(脯氨酸羟化酶2), 是脯氨酸羟化酶家族的核心成员, 它可催化多种底物的羟基化, 包括HIF1 α -3 α (Hypoxia inducible factor, HIF)^[4]、NF- κ B(Nuclear factor kappa beta)^[5]、激活转录因4^[6]等, 其中, 最为经典的是催化HIF的羟基化。HIF是一种受细胞内氧气浓度变化调节基因表达的转录激活因子, 由氧调节的亚单位HIF- α 和结构亚基HIF-1 β 组成^[7], 对于机体在低氧条件下发生的一系列生理学改变起到关键性调控作用^[8]。它能够转录激活VEGF、GLUT1和BNIP3等基因的表达。在常氧条件下, PHD2具有羟基化

化酶活性, 它可识别HIF- α 降解结构域(Oxygen dependence degradation domain, ODDD)片段中的氨基酸组成为脯氨酸位点, 并催化它发生羟基化, 羟基化后的HIF- α 和pVHL蛋白复合体结合, 促进它发生泛素化降解^[9]。当 O_2 浓度低于5%时, PHDs失活, HIF-1 α 和HIF-2 α 不能发生羟基化, 导致其稳定并与HIF-1 β 结合形成二聚体, 激活下游基因的转录^[10]。研究表明, PHD2基因在多种肿瘤细胞系或肿瘤组织中表达缺失, 提示其可能具有抑癌作用^[11]。目前对于PHD2基因的研究集中在它可作为肿瘤治疗的新靶点上^[12]。

对于用肺进行呼吸的鲸类来说, 长时间潜水诱发的低氧状态是营水生生活的鲸类必须克服的巨大挑战^[13], 因此, 鲸类在辐射到适应不同深度水域环境生活时, 进化出了物种间各异的低氧耐受能

收稿日期: 2021-11-29; 修订日期: 2022-11-14

基金项目: 国家自然科学基金(31430080); 国家重点研发计划(2016YFC0503200)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31430080); Ministry of Science and Technology Key Research and Development Program (2016YFC0503200)]

作者简介: 李颖(1994—), 女, 硕士研究生; 主要从事鲸类保护生物学研究。E-mail: 15715324323@163.com

通信作者: 肖武汉, E-mail: w-xiao@ihb.ac.cn

力。20世纪初,海洋哺乳动物的低氧耐受机制就受到广泛的关注,解剖、生理及细胞水平的协调适应一般认为是其抵抗低氧条件的基础^[14]。为了适应潜水导致的低氧环境,鲸类演化出了独特的呼吸系统,例如具有软骨支持的气管、收缩性很强的胸腔和肺,以提高肺部氧气的储存^[15]。研究表明,鲸类还具有高水平的血红蛋白浓度和较高的血氧储存能力,如宽吻海豚(*Tursiops truncatus*)血氧储存是陆地牛(*Bos taurus*)的3倍多^[16]。迄今,关于鲸类低氧适应的研究主要集中在解剖学和生理学等方面,然而,随着分子生物学和基因组学的发展,从分子或基因水平揭示鲸类适应性进化的分子机制成为可能。2015年和2016年毕健玲等^[17, 18]第一次对鲸类的HIF和pVHL进行报道。由于鲸类多数生活在海洋,且为保护动物,样品获得难度系数大,开展相关研究难度较大,与陆生动物相比,有关鲸类低氧耐受的分子机制方面的研究报道甚少^[19, 20]。

本研究选取3种潜水能力差异巨大的物种,长江江豚(*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*)、白鲸(*Delphinapterus leucas*)和抹香鲸(*Physeter macrocephalus*)。其中抹香鲸潜水深度可至3000 m,潜水时长可达73min^[21];白鲸可在水下500 m停留15min^[22],而长江江豚只能下潜至水下20—50 m处,停留不超过2min^[23]。我们克隆了3种鲸类的PHD2基因的序列并进行分析,对3种鲸类的PHD2在低氧信号通路中的功能进行初步探究。

1 材料与方法

1.1 材料

长江江豚样品来自鄱阳湖救助2d后死亡的新鲜样品,抹香鲸样品采集于广东惠州大亚湾搁浅死亡的抹香鲸,白鲸样品取自湖北武汉极地海洋世界白鲸体检所取的血液。

1.2 方法

RNA提取和cDNA制备 取冻存于-80℃抹香鲸和长江江豚组织,利用TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)进行RNA的提取,使用QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)试剂盒提取白鲸血液RNA,提取的RNA溶解于RNA-free的水中,保存于-80℃。利用Thermo公司的反转录试剂盒合成抹香鲸、长江江豚和白鲸的cDNA,保存于-80℃备用。

基因克隆 参照NCBI上的虎鲸(*Orcinus orca*)、瓶鼻海豚(*Bottlenose ballphins*)、白暨豚(*Lipotes vexillifer*)及牛的核酸序列保守区,利用Primer Premier version 5.00 (Premier Biosoft Interna-

tional, Palo Alto, California)设计引物(虎鲸XM_004281591;瓶鼻海豚XM_004310255;牛NM_001206046;白暨豚XM_007466989.1)。由于PHD2序列的前端GC含量太高,难以一次扩增全长序列,分析序列后按照表1的引物分两段扩增长江江豚的PHD2基因,利用I-5TM 2×High Fidelity Master Mix高保真酶(擎科生物)反应体系:1.0 μL cDNA模板(100 ng/μL)、1.5 μL上游引物(10 μmol/L)、1.5 μL下游引物(10 μmol/L)、20 μL PCR MasterMix (含染料)和16 μL ddH₂O;扩增程序设定为:98℃ 5min预变性;98℃ 15s, 58℃ 30s, 72℃ 25s, 35个循环;72℃延伸7min。

表1 扩增长江江豚、白鲸和抹香鲸PHD2的引物

Tab. 1 PCR primers used to amplify Yangtze finless porpoise, beluga whale and sperm whale PHD2

引物 Primer	序列 Sequence (5'—3')	扩增片段长度 Product (bp)
FP-PHD2-Q-F	ATGGACAGCCCGTGCCA GCC	564
FP-PHD2-Q-R	CAGCGGCTTCGTCTGCCC GTT	
FP-PHD2-H-F	AACGGGCAGACGAAGCC GCTG	738
FP-PHD2-H-R	CTAGGTGGGCGTAGTCG GCTGTGA	

质粒构建 将得到的长江江豚的PHD2的全基因序列,插入到pCMV-HA中,构建带有标签的可表达质粒pCMV-Ha-FP-PHD2。由于抹香鲸和白鲸样品PHD2序列扩增出部分序列,根据NCBI上的PHD2氨基酸序列(抹香鲸XM_007127611.2;白鲸XM_022553237.1),进行合成,在擎科生物(北京)合成抹香鲸的PHD2质粒,即pCMV-MYC-SW-PHD2。在奥科生物(北京)合成白鲸的PHD2质粒,即pCMV-MYC-BW-PHD2。

将抹香鲸、白鲸和长江江豚的HIF-1α和HIF-2α的ODDD区的LXXLAP片段中的脯氨酸Pro突变为丙氨酸Ala^[24, 25],构建相关的突变体质粒。将抹香鲸、白鲸和长江江豚的PHD2的酶催化区域的组氨酸His(密码子为)突变为丙氨酸Ala^[26, 27],构建相关的突变体质粒。

细胞培养 由于缺少标准化的鲸类细胞系,故而使用人类肾源上皮细胞(HEK293T)细胞进行实验。HEK293T细胞使用终浓度为10%的胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS, Hyclone),高糖DMEM培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco)于37℃、5% CO₂的培养箱中进行培养。

细胞转染 接种HEK293T细胞于培养皿中,参照VigoFect(Vigorous Biotech, Beijing, China)说明书,在1.5 mL EP管中使用80 μL DMEM培养基稀释0.4—1.2 μL VigoFect,充分混匀,室温静置5min;

在另一个EP管中使用80 μ L未加血清DMEM培养基稀释1—3 μ g质粒DNA(质粒:VigoFect=1:0.4)。室温静置5min后,将两种溶液混合均匀,制备DNA-脂质体复合物,室温孵育15min后,将其均匀滴加至培养的细胞中。

荧光素酶活性分析 将HEK293T细胞按照合适比例分至24孔板中,待细胞密度长至80%—90%,每孔转染100 ng的Promoter-HRE(Hypoxia response element)、10 ng的内参pTK-renilla和200 ng的目的质粒,包括空白对照的空载体、3种鲸的*PHD2*质粒、*HIF-1 α* /*HIF-2 α* 及*PHD2*质粒与*HIF-1 α* /*HIF-2 α* 共转染,每组设置3个重复孔。24h后,吸去培养基,每孔加入1 $\times$ passive lysis buffer,放置于摇床,裂解30min后,使用荧光检测仪分别测取加入荧光底物LARII和Stop(Promega)荧光值,记录,分析。

蛋白质免疫印迹实验 将HEK293T细胞按照合适比例分至2个相同的6孔板中,待细胞密度长至80%—90%,每孔转染500 ng各个物种*PHD2*或者MYC-empty/HA-empty,2000 ng对应物种的*HIF-1 α* /*HIF-2 α* ,转染6h后,将一盘6孔板置于低氧工作站(37 $^{\circ}$ C 2%O₂),18h后,取出细胞培养箱和低氧工作站的6孔板,吸除培养基,加入细胞裂解液,4 $^{\circ}$ C裂解30min后,收细胞,4 $^{\circ}$ C 12000 $\times$ g离心15min后,吸取50 μ L的蛋白样品,加入等体积的2 $\times$ 上样缓冲液(2 $\times$ loading buffer)和5%体积的 β -巯基乙醇(武汉天源生物),将样品放入沸水中加热6min得到制备好的蛋白样品。将蛋白样品和蛋白marker(Thermo),200 V恒压下进行SDS-PAGE电泳,待蛋白marker电泳分出清晰的条带后,150 mA恒流转膜3h,将PAGE凝胶上的蛋白转移到PVDF膜上。根据目的基因所带标签使用对应的抗体孵育,在孵育结束之后,使用荧光成像系统(Fuji Film LAS4000 mini luminescent)进行显色和拍照。

所用抗体: anti-Myc (9E10, 1:1000 for IB analysis, Santa Cruz), anti-HA antibody (1:5000 for IB analysis, Covance), anti-GAPDH antibody (SC-47724, 1:1000, Santa Cruz)

数据分析 对于荧光素酶活性分析,每组设计3个重复组,记录每孔添加LARII和Stop之后的值,计算二者比值,利用GraphPad Prism 5(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)软件进行数据分析。

2 结果

2.1 长江江豚、抹香鲸和白鲸的*PHD2*序列是十分保守的

本研究对长江江豚、白鲸和抹香鲸的*PHD2*的

编码蛋白区(Coding sequence)进行了扩增、测序和比对分析,发现长江江豚的*PHD2*编码序列全长为1278个碱基,编码426个氨基酸;白鲸的*PHD2*有1317个碱基,编码438个氨基酸;抹香鲸的*PHD2*有1314个碱基,编码436个氨基酸。参照人的*PHD2*的结构域,对3个物种的*PHD2*的结构进行了分析:发现3个鲸的*PHD2*和人的*PHD2*一样,都具有锌指结构域(氨基酸21—58)和酶活性功能域(氨基酸205—391),并且这两个区域氨基酸序列极其保守。3种鲸的*PHD2*和人的*PHD2*在两个结构域的氨基酸保守型高达97%,说明在适应环境的进化过程中,*PHD2*保留了重要的功能结构域,这可能与*PHD2*功能十分重要有关。

2.2 长江江豚、抹香鲸和白鲸的*PHD2*与*HIF*的相互作用

在常氧下, *PHD2*可以抑制*HIF- α* 下游基因的转录活性 在常氧下,过表达鲸类的*HIF-1 α* /*HIF-2 α* ,会增强*HIF-1 α* /*HIF-2 α* 下游低氧反应元件(Hypoxia response element, HRE)的转录活性,抹香鲸的*HIF-1 α* 较长江江豚和白鲸对下游基因的转录作用更强,同时过表达3种鲸类的*HIF-1 α* /*HIF-2 α* 和*PHD2*,通过比较发现:转染*PHD2*会明显抑制低氧诱导因子HIF下游基因的转录活动(图1)。人类*PHD2*可以在蛋白水平对其*HIF-1 α* /*HIF-2 α* 进行修饰,故对3种鲸类的*PHD2*和其*HIF-1 α* /*HIF-2 α* 进行蛋白水平研究。

鲸类*PHD2*在常氧下降解*HIF- α* 蛋白 在常氧和低氧条件下,分别检测江豚、白鲸和抹香鲸的*PHD2*对江豚、白鲸和抹香鲸*HIF-1 α* /*HIF-2 α* 蛋白水平的影响,发现在常氧情况下,3个物种的*PHD2*均会降解本物种的*HIF-1 α* /*HIF-2 α* ,这与上述luciferase分析结果一致。而在低氧情况下,这种降解则不明显(图2),可能是由于*PHD2*降解了部分的*HIF-1 α* /*HIF-2 α* 蛋白,导致了*HIF-1 α* /*HIF-2 α* 的蛋白减少,从而抑制了HIF下游基因的转录活性。

长江江豚、白鲸和抹香鲸的*PHD2*对*HIF- α* 羟基化修饰位点 *PHD2*进行羟基化修饰作用的序列片段为LXXLAP(X表示任意氨基酸)。我们分别将江豚、抹香鲸和白鲸的*HIF-1 α* 和*HIF-2 α* 对应LXXLAP的脯氨酸(Proline, P)突变为丙氨酸(alanine, A)。在常氧和低氧条件下,检测FP-*PHD2*、BW-*PHD2*和SW-*PHD2*对FP/BW/SW的*HIF-1 α* 双突变体和*HIF-2 α* 双突变体蛋白水平的影响,发现3种鲸类的*PHD2*无论常氧或者低氧均无法降解*HIF-1 α* 双突变体和*HIF-2 α* 双突变体(图3),这说明3种鲸的*HIF-1 α* 和*HIF-2 α* 上被*PHD2*羟基化修饰的位点即

为突变的位点(图4)。当被HIF-1 α 和HIF-2 α 修饰的位点的脯氨酸被突变成为丙氨酸之后, PHD2未能对其进行标记修饰, 因此HIF蛋白积累。

2.3 长江江豚、抹香鲸和白鲸的PHD2酶活性位点

脯氨酸羟化酶2作为氧气敏感的蛋白酶, 与Fe²⁺等金属离子结合, 存在关键性的酶活性位点。根据相关的文献报道, 我们构建了江豚、白鲸和抹香鲸的PHD2催化区域组氨酸突变丙氨酸的突变体, FP-PHD2 H313A、FP-PHD2 H374A、BW-PHD2 H326A、BW-PHD2 H386A、SW-PHD2 H324A和SW-PHD2 H384A, 检测PHD2的野生型以及突变体对于各自HIF-1 α 和HIF-2 α 蛋白水平的降解情况, 发现: PHD2催化区域的任何一个组氨酸的突变均能导致PHD2失去明显降解HIF1 α 和HIF-2 α 的能力(图5)。

3 讨论

哺乳动物细胞对于缺氧的适应性调节是通过一系列基因表达改变来实现的, 调控这些基因表达最重要的转录因子是HIF^[28]。HIF直接或间接调控的基因有100多种。这些基因参与体内糖的能量代谢, 红细胞生成, 血管发生, 核苷、氨基酸、pH调节和铁、铜代谢, 细胞存活及凋亡等多个方面^[29]。PHD2作为调控HIF的关键酶, 具有重要的意义。目前研究表明, PHD2在适应高海拔低氧环境的人群中存在很强的正向选择性, 它是居住在高海拔环境人们(包括欧亚人群和安第斯人群)共同存在的与低氧环境适应性相关的基因之一^[30, 31]。有报道发现: PHD2基因5'UTR区和内含子区13个SNPs位点的纯合型个体在高原藏族和汉族之间存在显著差异^[32]。

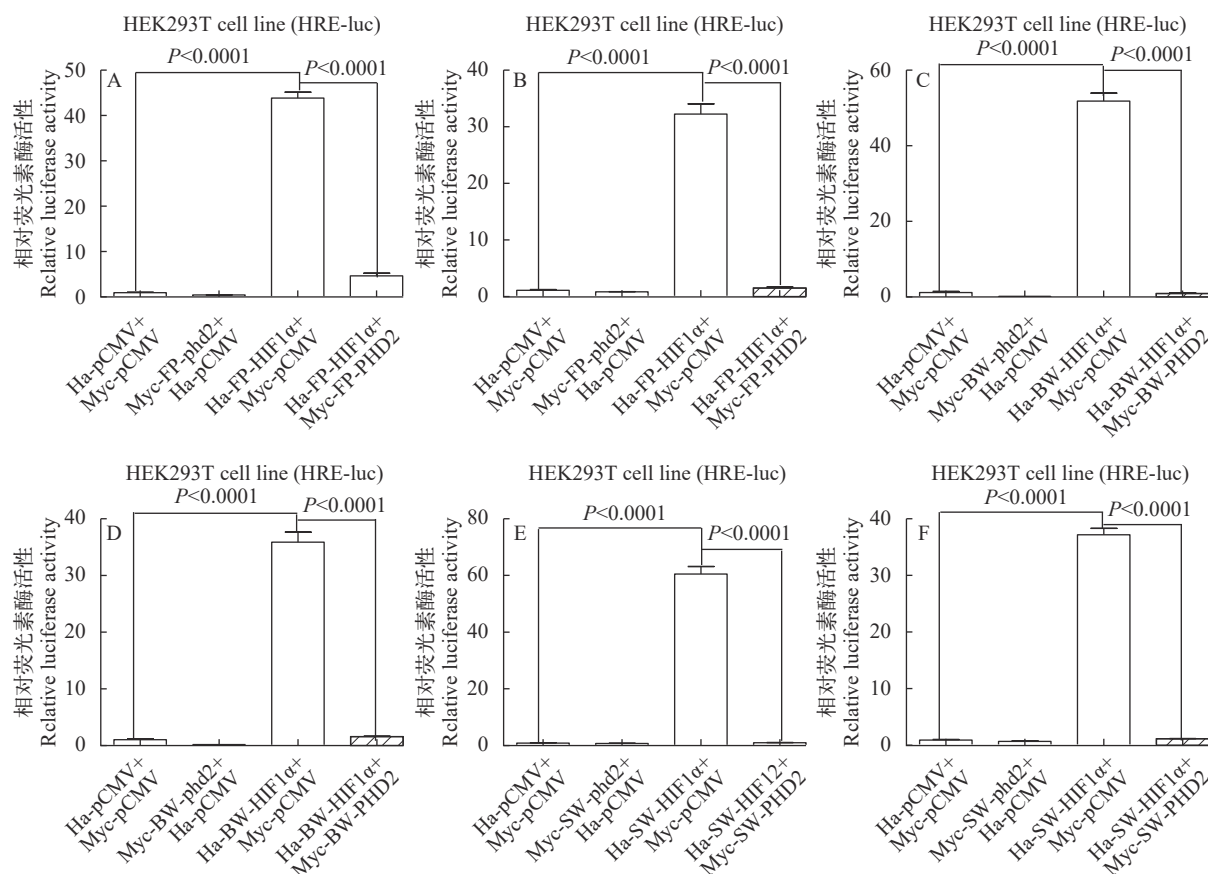


图1 长江江豚、抹香鲸和白鲸的PHD2对HIF- α 转录活性的影响

Fig. 1 The effect of PHD2 from FP, BW, and SW PHD2 on HIF- α transcriptional activity under normoxia conditions.-under normoxic condition

在常氧下, 在HEK293T细胞系中转染江豚(FP)的HIF-1 α /HIF-2 α 和MYC-empty或者FP-PHD2质粒, 分析FP-PHD2对HIF- α 下游基因启动子的影响(A, B); 在常氧下, 在HEK293T细胞系中转染白鲸(BW)的HIF-1 α /HIF-2 α 和MYC-empty或者BW-PHD2, 分析BW-PHD2对HIF- α 下游基因启动子的影响(C, D); 在常氧下, 在HEK293T细胞系中转染抹香鲸(SW)的HIF-1 α /HIF-2 α 和MYC-empty或者SW-PHD2, 分析SW-PHD2对HIF- α 下游基因启动子的影响(E, F)

HEK293T cells are transfected with FP PHD2 or MYC-empty together with FP HIF- α under normoxic conditions (A, B); HEK293T cells are transfected with BW PHD2 or MYC-empty together with BW HIF- α under normoxic conditions (C, D); HEK293T cells are transfected with SW PHD2 or MYC-empty together with SW HIF- α under normoxic conditions (E, F)

这些研究结果均表明*PHD2*在高原动物的低氧耐受中扮演一定的角色。本研究仅对3种鲸的*PHD2*蛋白编码序列进行了分析,对于*PHD2*是否在低氧耐受能力差异巨大的鲸类各物种之间,存在SNP位点的差异,需要后续更多样品的深入分析。

低氧适应是一个极其复杂的过程,尤其是经过

数万年的进化,鲸类低氧信号通路调节机制可能会出现一定的独特性^[33-36]。由于鲸类研究条件的局限性,目前,对于其生物学功能,特别是在体生物学功能的认识还十分有限。随着细胞培养技术、遗传操作技术和动物模型的应用,我们对于鲸类低氧适应和耐受机制的认识将逐步加深^[37, 38]。

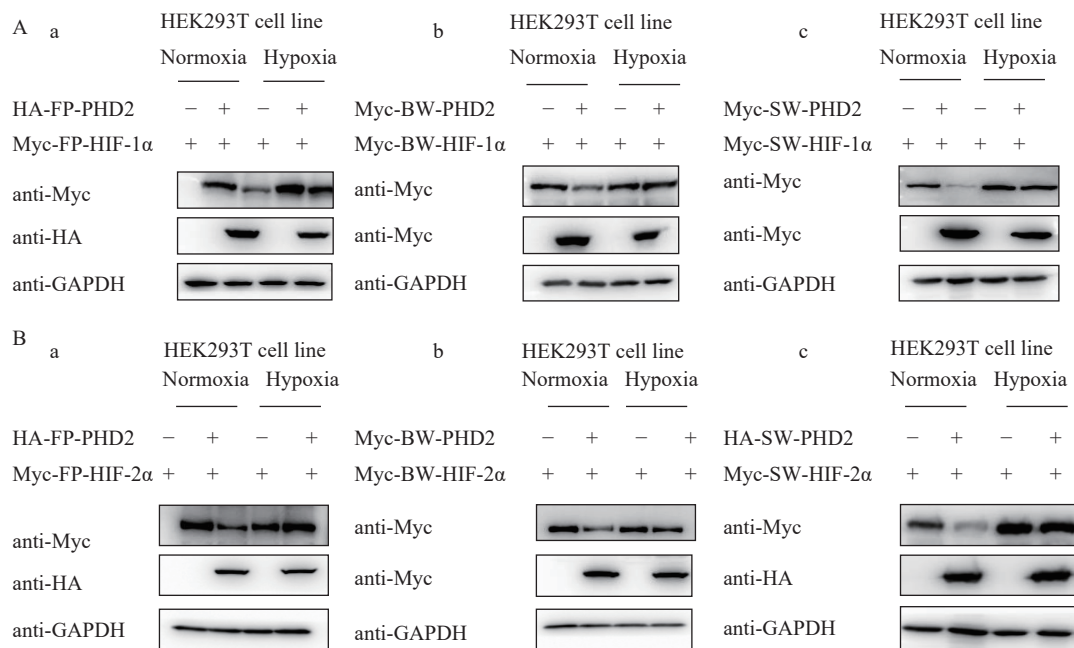


图2 江豚、白鲸和抹香鲸的*PHD2*对本物种的HIF-1α与HIF2α蛋白水平影响

Fig. 2 Effect of *PHD2* on cetacean HIF-1α and HIF-2α under normoxic and hypoxic conditions

A. 江豚、白鲸和抹香鲸的*PHD2*在常氧下降解各自的HIF-1α,低氧下则未能明显降解; B. 江豚、白鲸和抹香鲸的*PHD2*在常氧下降解各自的HIF-2α,低氧下则未能明显降解

A. FP(a), BW(b) and SW(c) *PHD2* can degrade their HIF-1α only under normoxic condition; B. FP(a), BW(b) and SW(c) *PHD2* can degrade their HIF-2α only under normoxic condition

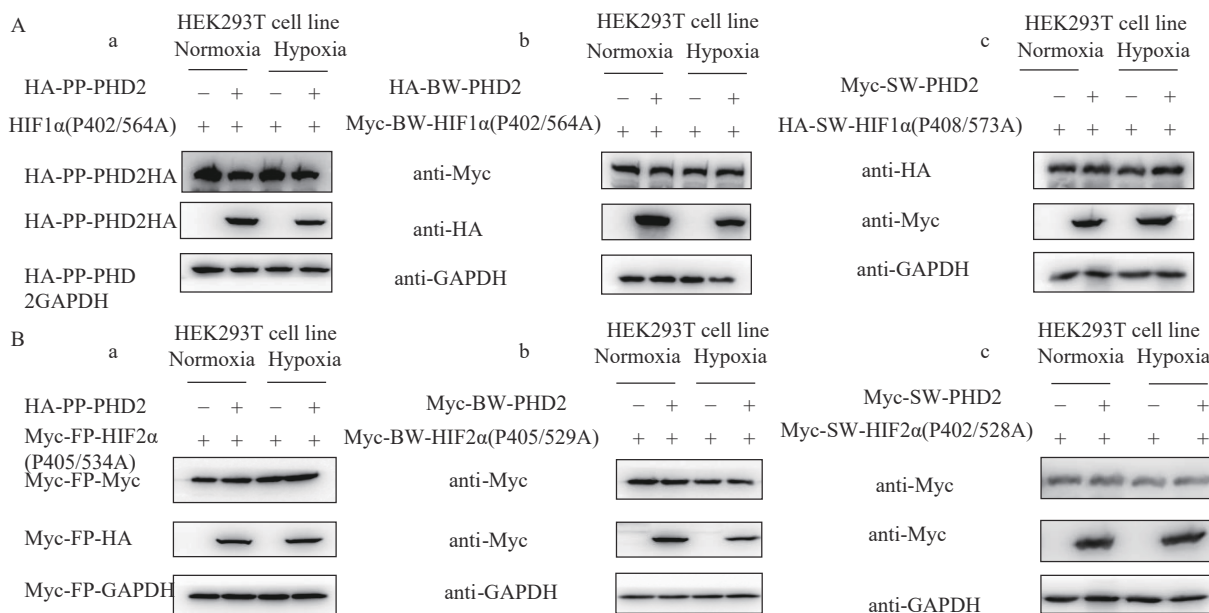


图3 在常氧和低氧条件下,江豚(a)、白鲸(b)和抹香鲸(c)的*PHD2*对HIF-1α(A)和HIF-2α(B)突变体蛋白的影响

Fig. 3 The effect of FP(a), BW(b), SW(c)-*PHD2* on mutant cetaceans HIF-1α(A) and HIF-2α(B)

综上所述,本研究首次克隆获得了长江江豚、抹香鲸和白鲸的*PHD2*基因的CDS全长序列,本实验结果为进一步揭示鲸类低氧适应性的分子机制

提供了基础数据。鲸类作为一个独特的低氧适应和耐受的群体,准确了解它们低氧适应和耐受的分子机制,对于人类低氧适应和低氧环境引起的相关

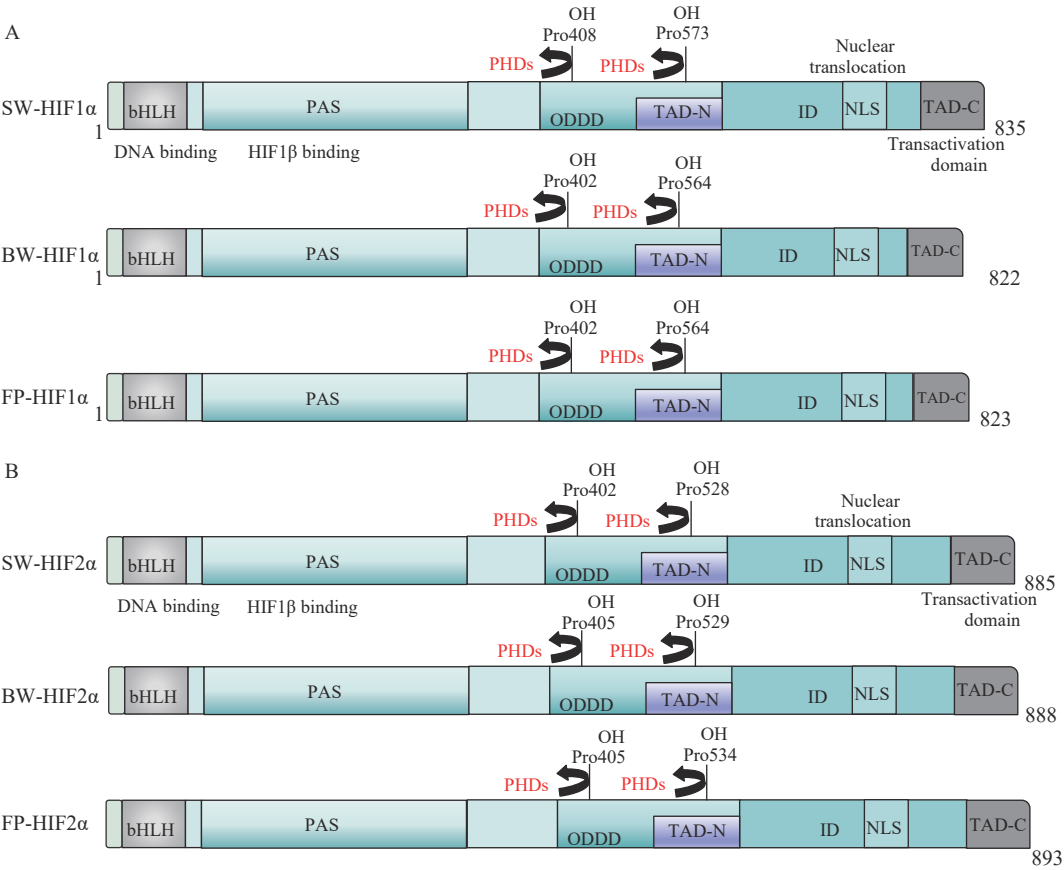


图 4 在常氧和低氧条件下,江豚、白鲸和抹香鲸的PHD2羟基化HIF-1α(A)和HIF-2α(B)位点示意图
Fig. 4 Diagram of site information about hydroxylation of HIF-1α(A) and HIF-2α(B) by FP, BW and SW-PHD2

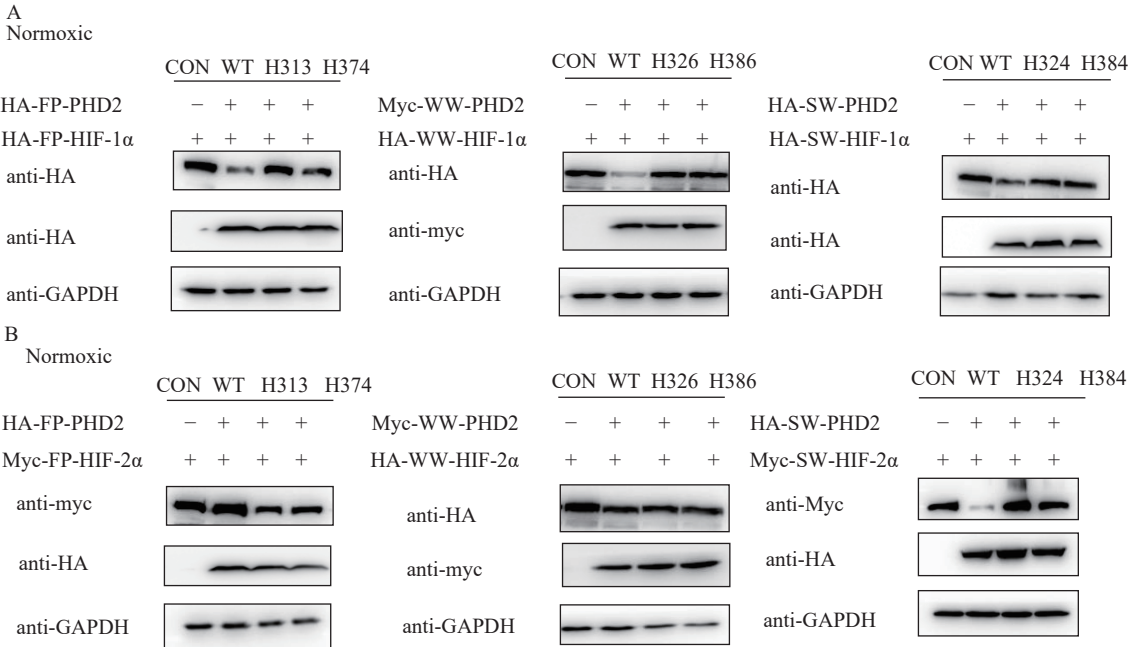


图 5 江豚(FP)、白鲸(BW)、抹香鲸(SW)PHD2与突变体对鲸类的HIF1α(A)和HIF2α(B)蛋白的影响
Fig. 5 The effect of FP, BW, SW-PHD2 and PHD2 mutant on cetacean HIF1α(A) and HIF2α(B)

疾病发生机制的认识将会有重要的参考价值。

参考文献:

- [1] McDonough M A, Loenarz C, Chowdhury R, *et al.* Structural studies on human 2-oxoglutarate dependent oxygenases [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2010, **20**(6): 659-672.
- [2] Yu X T. Effect of hypoxia preconditioning on the expression of PHD2 and HIF-1 α in retina of light damage mouse [D]. Qingdao: Qingdao University, 2008: 1. [于秀婷. 低氧预适应对小鼠光损伤视网膜 PHD2, HIF-1 α 表达的影响 [D]. 青岛: 青岛大学, 2008: 1.]
- [3] Andrew C E, Jonathan M G, Luke A, *et al.* *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation [J]. *Cell*, 2001, **107**(1): 43-54.
- [4] Li S, Sheng R, Hu Y Z. Recent progress of prolyl hydroxylase domain inhibitors [J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2015, **32**(10): 1277-1285. [李珊, 盛荣, 胡永洲. 脯氨酸羟化酶抑制剂的进展 [J]. *中国现代应用药学*, 2015, **32**(10): 1277-1285.]
- [5] Oliver K M, Taylor C T, Cummins E P. Hypoxia. Regulation of NF κ B signaling during inflammation: the role of hydroxylases [J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2009, **11**(1): 1-8.
- [6] Koditz J, Nesper J, Wottawa M, *et al.* Oxygen-dependent ATF-4 stability is mediated by the PHD3 oxygen sensor [J]. *Blood*, 2007, **110**(10): 3610-3617.
- [7] Xing Y Q, Xu J, Li L, *et al.* Progress in the structure, regulation and target genes of hypoxia-inducible factor (HIF-1) [J]. *Chinese Journal of Laboratory Diagnosis*, 2011, **15**(1): 177-179. [邢英琦, 徐静, 李琳, 等. 缺氧诱导因子 (HIF-1) 的结构、调节与靶基因研究进展 [J]. *中国实验诊断学*, 2011, **15**(1): 177-179.]
- [8] Wang G L, Jiang B H, Rue E A, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, **92**(12): 5510-5514.
- [9] Jaakkola P, Mole D R, Tian Y M, *et al.* Targeting of HIF-1 α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation [J]. *Science*, 2001, **292**(5516): 468-472.
- [10] Semenza G L. HIF-1, O₂, and the 3 PHDs: How animal cells signal hypoxia to the nucleus [J]. *Cell*, 2001, **107**(1): 1-3.
- [11] Xie G F, Zheng L, Ou J J, *et al.* Low expression of prolyl hydroxylase 2 is associated with tumor grade and poor prognosis in patients with colorectal cancer [J]. *Experimental Biology and Medicine Maywood*, 2012, **237**(7): 860-866.
- [12] Li Z, Ning S J, Zhang S J. Tumor PHD2 expression is correlated with clinical features and prognosis of patients with HCC receiving liver resection [J]. *Medicine*, 2014, **93**(29): e179.
- [13] Tian R, Wang Z F, Niu X. Evolutionary genetics of hypoxia tolerance in cetaceans during diving [J]. *Genome Biology and Evolution*, 2016, **8**(3): 827-839.
- [14] Irving L. Respiration in diving mammals [J]. *Physiological Reviews*, 1939, **19**(1): 112-134.
- [15] Tian R. Evolutionary genetics of hypoxia tolerance in cetaceans during diving [D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2018: 14. [田然. 鲸类低氧耐受分子进化机制 [D]. 南京: 南京师范大学, 2008: 14.]
- [16] Snyder G K. Respiratory adaptations in diving mammals [J]. *Respiration Physiology*, 1983, **54**(3): 269-294.
- [17] Bi J, Hu B, Zheng J, *et al.* Characterization of the hypoxia-inducible factor 1 α gene in the sperm whale, beluga whale, and Yangtze finless porpoise [J]. *Marine Biology*, 2015, **162**(6): 1201-1213.
- [18] Bi J, Hu B, Wang J, *et al.* Beluga whale pVHL enhances HIF-2 α activity via inducing HIF-2 α proteasomal degradation under hypoxia [J]. *Oncotarget*, 2017, **8**(26): 42272-42287.
- [19] Lü P, Fan J, Xi H J. Association of polymorphisms of rs479200 and rs480902 in *EGLN1* gene with hypoxia adaptation in high altitude in Tibetans [J]. *Acta Anatomica Sinica*, 2013, **44**(3): 419-422. [吕坡, 范杰, 席焕久. *EGLN1* 基因两个位点多态性与藏族人群高原低氧适应的关系 [J]. *解剖学报*, 2013, **44**(3): 419-422.]
- [20] Yang X, Hu M, Zhang Z L, *et al.* Genetic polymorphism of SNPs in EPAS1/*EGLN1* among Tibetan and Han populations [J]. *Forensic Science and Technology*, 2016, **41**(4): 340-344. [杨鑫, 胡萌, 张子龙, 等. 藏汉人群 EPAS1、*EGLN1* 基因特异的 SNP 位点遗传多态性 [J]. *刑事技术*, 2016, **41**(4): 340-344.]
- [21] Watkins W A, Daher M A, Fristrup K M, *et al.* Sperm whales tagged with transponders and tracked underwater by sonar [J]. *Marine Mammal Science*, 1993, **9**(1): 55-67.
- [22] Ridgway S, Bowers C, Miller D, *et al.* Diving and blood oxygen in the white whale [J]. *Canadian Journal of Zoology*, 1984, **62**(11): 2349-2351.
- [23] Akamatsu T, Wang D, Wang K X, *et al.* Diving behaviour of freshwater finless porpoises (*Neophocaena phocaenoides*) in an oxbow of the Yangtze River, China [J]. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 2002, **59**(2): 438-443.
- [24] Kamura T, Sato S, Iwai K, *et al.* Activation of HIF1 α ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, **97**(19): 10430-10435.
- [25] Fong G H, Takeda K. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2008, **15**(4): 635-641.
- [26] Minervini G, Quaglia F, Tosatto S C. Computational analysis of prolyl hydroxylase domain-containing protein 2 (PHD2) mutations promoting polycythemia insurgence in humans [J]. *Scientific Reports*, 2016, **6**(1): 18716-18724.
- [27] Chowdhury R, Leung I K H, Tian Y M, *et al.* Structural basis for oxygen degradation domain selectivity of the HIF prolyl hydroxylases [J]. *Nature Communications*, 2016(7): 12673.
- [28] Li A, Zhang Y, Wang Z, *et al.* The roles and signaling pathways of prolyl-4-hydroxylase 2 in the tumor microenvironment [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2019(303): 40-49.

- [29] Song Y Q, Zhou B J. Recent progress on the mechanism of energy metabolism of hypoxia-inducible factor 1-driven skeletal [J]. *Acta Anatomica Sinica*, 2017, **48**(2): 236-240. [宋亚琼, 周播江. 低氧诱导因子-1在调控骨骼肌缺氧时能量代谢发生适应性变化的机制研究进展 [J]. *解剖学报*, 2017, **48**(2): 236-240.]
- [30] Xu S, Li S, Yang Y. A genome wide search for signals of high altitude adaptation in Tibetans [J]. *Molecular Biology*, 2011, **28**(2): 1003-1011.
- [31] Wang B, Zhang Y B, Zhang F, *et al.* On the origin of Tibetan sand their genetic basis in adapting high-altitude environments [J]. *PLoS One*, 2011, **6**(2): e17002.
- [32] Li Q. Association between genetic poly [D]. Beijing: Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, 2013: 56. [李骞. 藏族低氧适应与遗传多态性的相关性研究 [D]. 北京: 北京协和医学院中国医学科学院, 2013: 56.]
- [33] Yang X Y, Zheng K D, Lin K, *et al.* Energy metabolism disorder as a contributing factor of rheumatoid arthritis: a comparative proteomic and metabolomic study [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(7): e0132695.
- [34] Nunezomara A, Gerpe-pita A, Pozo S, *et al.* PHD3-SUMO conjugation represses HIF₁ transcriptional activity independently of PHD3 catalytic activity [J]. *Journal Cell Science*, 2015, **128**(1): 40-49.
- [35] Klotzsche-Von Ameln A, Prade I, Grosser M, *et al.* PHD4 stimulates tumor angiogenesis in osteosarcoma cells via TGF- α [J]. *Molecular Cancer Research*, 2013, **11**(11): 1337-1348.
- [36] Bi J L. The hypoxia inducible factor pathway in cetaceans [D]. Wuhan: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 2016: 24. [毕健玲. 鲸类低氧信号通路初探 [D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2016: 24.]
- [37] Yu X Y, Yang F, Zhu J M, *et al.* The development of in vitro models and their applications in cetacean research [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2018, **38**(6): 597-607. [于学颖, 杨峰, 朱静敏, 等. 体外模型的发展及其在鲸豚研究中的应用 [J]. *兽类学报*, 2018, **38**(6): 597-607.]
- [38] Kadoi K, Mochizuki A, Ikeda T, *et al.* Susceptibility of a line of dolphin kidney cell culture to several herpesviruses [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 1992, **32**(4): 227-232.

PRIMARY ANALYSIS OF *PHD2* FROM THREE DIFFERENT CETACEANS IN HYPOXIA SIGNAL PATHWAY

LI Ying^{1,2}, BI Jian-Ling^{1,2}, WANG Ding^{1,3} and XIAO Wu-Han^{1,3}

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. The Key Laboratory of Aquatic Biodiversity and Conservation of Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: Hypoxia was a major challenge faced by cetaceans during the process of prolonged diving in the secondary aquatic adaption. Although physiological and anatomical traits of hypoxia tolerance of cetaceans have been well characterized, the molecular basic behind their adaption remain unknown. Proline hydroxylase domain enzyme 2 (PHD2), one of the pivotal regulators of the molecular response in hypoxic stress, can utilize oxygen to hydroxylate and mediate the stability and transcriptional activity of the alpha submit of HIF. In this study, the *PHD2* gene was cloned from three species with different duration, the sperm whale (*Physeter macrocephalus*), the beluga whale (*Delphinapterus leucas*), and the Yangtze finless porpoise (*Neophocaena phocaenoids asiaeorientalis*). Sequence analyses revealed that the sequences of PHD2 from these three species were highly evolutionarily conserved, with few deletions and substitutions. In addition, we analyzed PHD2 in these three species in the hypoxia signaling pathway. Under normoxia, PHD2 of three species can degrade HIF- α (including HIF-1 α and HIF-2 α) protein of three species. Under hypoxia (O₂ concentration less than 2%), the HIF- α proteins can accumulate. Furthermore, the degradation of HIF- α by PHD2 in cetaceans is relying on the recognition of the amino acid motif LTLLAP and LEM LAP on HIF-1 α , the LAQLAP and LET LAP amino acid motif of HIF-2 α , as well as the proline hydroxylase efficiency of PHD2. It is speculated that PHD2 use oxygen as a substrate to hydroxylate designated proline residues within the conserved motif LXX LAP of HIF-1 α and HIF-2 α , allowing von Hippel-Lindau protein (pVHL), the substrate recognition component of an E3 ubiquitin ligase complex, to bind to hydroxylated HIF-1 α and HIF-2 α and target them for proteasomal degradation. Without the oxygen, the activity of PHD2 is restrained and the function is not fully utilized. This study is a preliminary exploration on the PHD2 function of three different hypoxia-tolerant whales, aiming to provide a basis for further study of the complex feedback regulation of PHD2 and HIF. Future investigations on another PHD isoforms over HIF pathways are able to be achieved. Thus, it also provide the basis for in-depth study on adaptive mechanisms of hypoxic tolerance in cetaceans.

Key words: Sperm whale; Beluga whale; Yangtze finless porpoise; Hypoxia Tolerance; Hypoxia-Inducible Factor; Prolyl-hydroxylase domain enzyme 2