

# PROFIL EKSPRESI GEN HIF-1 $\alpha$ PADA JANTUNG TIKUS YANG DIINDUKSI HIPOKSIA KRONIK

oleh :  
Frans Ferdinal<sup>1</sup>

## ABSTRACT

### Gene expression profiles of HIF-1 $\alpha$ in cardiac rats induced by chronic hypoxia

Oxygen is a major determinant of myocardial gene expression, and as myocardial O<sub>2</sub> levels decrease during chronic hypoxia, gene expression patterns in the heart are significantly altered. The aim of the recent study is to observe gene expression profiles of HIF-1 $\alpha$  as master regulatory gene of oxygen homeostasis, in rats cardiac induced by chronic hypoxia. Sprague-Dawley male rats, were randomized into 7 groups (n=4/group): control normoxia exposed to room air, hypoxia group were housed in hypoxic chamber (0,8%) for 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days respectively. The animal is sacrificed and the heart is rapidly excised. Soluble nuclear proteins and total RNA were extracted by nuclear extraction kit and RNA isolation kit, respectively. The activity of HIF-1 $\alpha$  and its expression were detected using an ELISA-base TransBinding HIF-1 $\alpha$  assay kit and real-time RT-PCR, respectively. The result of this research showed that the activity of HIF-1 $\alpha$  and the level of HIF-1 $\alpha$  mRNA were elevated gradually and reach a peak at 21 days of hypoxia, and then decreased at the end of treatment. There was significant correlation between the activity of HIF-1 $\alpha$  and the level of HIF-1 $\alpha$  mRNA. It is concluded that during chronic hypoxia the expression of HIF-1 $\alpha$  were upregulated at multiple levels, at transcription as well as post-transcription levels.

*Key words:* gene expression , HIF-1 $\alpha$  , chronic hypoxia

## ABSTRAK

### Profil ekspresi gen HIF-1 $\alpha$ pada tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

Oksigen merupakan faktor penentu utama pada ekspresi gen jantung. Pada kondisi hipoksia kronik, pola ekspresi gen jantung mengalami perubahan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengamati profil ekspresi gen HIF-1 $\alpha$  , yang merupakan regulator utama homeostasis oksigen, dalam jantung tikus yang diinduksi hipoksia kronik. Tikus *Sprague-Dawley* dibagi dalam 7 kelompok (n=4/kelompok), diberikan perlakuan hipoksia dalam sungkup-hipoksia (8% O<sub>2</sub>) masing-masing selama 1, 3, 7, 14, 21 dan 28 hari, sedangkan kelompok kontrol, normoksia (O<sub>2</sub> atmosfer). Akhir perlakuan tikus dimatikan dan jantung dikeluarkan dengan cepat. Protein inti sel dan total RNA diperiksa masing-masing dengan *nuclear extraction kit* dan *RNA isolation kit*. Aktivitas HIF-1 $\alpha$  dan ekspresinya masing-masing diukur dengan *ELISA-base TransBinding HIF-1 $\alpha$  assay kit* and *real-time RT-PCR*. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas HIF-1 dan konsentrasi mRNA HIF-1 $\alpha$  , meningkat sejak awal perlakuan dan mencapai puncak pada hari ke 21, kemudian menurun pada akhir perlakuan. Terdapat korelasi yang bermakna antara aktivitas HIF-1 $\alpha$  dan konsentrasi mRNA HIF-1 $\alpha$  . Penelitian ini dapat disimpulkan bahwa hipoksia kronik pada tikus menyebabkan upregulasi ekspresi gen HIF-1 $\alpha$  , baik pada tingkat transkripsi, maupun pada tingkat pasca translasi.

*Kata-kata kunci:* ekspresi gen, HIF-1 $\alpha$  , hipoksia kronik

## PENDAHULUAN

Oksigen merupakan unsur yang esensial bagi semua organisme ekariota untuk menjalankan reaksi fosforilasi oksidatif dalam rantai pernafasan dari mitokondria yang akan menghasilkan energi. Dengan demikian, pasokan oksigen yang konstan ke semua organ, sangat penting dipertahankan dan pada mamalia hal tersebut dilakukan oleh sistem kardiovaskuler. Pasokan oksigen ke jaringan diatur oleh sistem kardiovaskuler, sedangkan kebutuhan ditentukan oleh jumlah sel dalam jaringan.<sup>1</sup> Walaupun udara atmosfer yang masuk ke paru mengandung sekitar 21% O<sub>2</sub>, akan tetapi kadar oksigen dalam jaringan lebih rendah, berkisar antara 0,5 - 12%, tergantung pada vaskularisasi dan konsumsi oksigennya. Sebagai contoh kadar O<sub>2</sub> di dalam, alveoli 14%, darah arteri 12%, vena 5-6%, miokard <10%, hati, jaringan ikat dan sumsum tulang 2 - 8%<sup>90</sup>. Besarnya perbedaan kadar oksigen pada berbagai sel, jaringan dan organ, menyebabkan kesulitan dalam mendefinisikan keadaan hipoksia.

Definisi praktis yang mendekati kondisi fisiologik dan untuk tujuan klinik, hipoksia adalah suatu keadaan bilamana pasokan oksigen tidak mencukupi kebutuhan sel, jaringan atau organ, sehingga mengganggu fungsi biologik.<sup>2,3</sup>

Jantung mamalia merupakan organ aerobik obligat, dengan konsumsi oksigen paling tinggi diantara semua jaringan. Ini berarti bahwa jantung sangat rentan terhadap kondisi hipoksia.<sup>1</sup> Pada hipoksia transpor elektron menjadi terganggu, terjadi deplesi adenosin trifosfat (ATP) sehingga tuntutan energi untuk jantung tidak dapat dipenuhi, beban jantung semakin meningkat sehingga jantung berada dalam kondisi stres. Bila berlangsung lama, hipoksia dapat menyebabkan disfungsi ventrikel dengan kompensasi hipertrofi dan peregangan dinding ventrikel. Hipertrofi dapat bersifat adaptif, atau maladaptif menuju gagal jantung.<sup>4</sup>

Pada mamalia termasuk manusia, hipoksia pada tingkat sistemik, diindra oleh kemoreseptor, sehingga terjadi respons akut terhadap hipoksia.

**Bagian Biokimia dan Biologi Molekuler,  
Fakultas Kedokteran  
Universitas Tarumanagara**  
( dr. Frans Ferdinal, MS)  
Correspondence To:  
 dr. Frans Ferdinal, MS  
Department of Biochemistry  
and Molecular Biology  
Faculty of Medicine,  
Tarumanagara University,  
Jl. S. Parman No.1  
Jakarta 11440  
\*To whom correspondence  
should be addressed,  
E-mail:  
[frafrdl@tarumanagara.ac.id](mailto:frafrdl@tarumanagara.ac.id)

Respons yang terjadi antara lain berupa stimulasi sistem kardiorespiratorik, sehingga terjadi peningkatan frekuensi nafas, denyut dan curah jantung. Respons akut yang bersifat refleks tersebut, berlangsung dalam skala detik sampai beberapa menit.<sup>5-8</sup> Bila hipoksia terus berlanjut, akan berlangsung mekanisme adaptasi di tingkat sel dan molekuler, yaitu terjadi perubahan pola ekspresi gen. Hipoksia berpotensi mempengaruhi ekspresi sekitar 1-2% gen dalam genom. Selain itu hipoksia juga berperan dalam meningkatkan pembentukan ROS (*reactive oxygen species*), yang dapat menginduksi berbagai kerusakan bahkan kematian sel jantung.<sup>9,10</sup> Gen utama yang mengalami upregulasi adalah *Hypoxia Inducible Factor-1* (HIF-1) khususnya pada sel jantung (kardiomiosit).<sup>11,12</sup>

Protein HIF-1 merupakan faktor transkripsi heterodimer yang terdiri atas subunit HIF-1 $\alpha$  dan HIF-1 $\beta$ . Kedua jenis protein tersebut disintesis secara konstitutif oleh semua sel. Akan tetapi, HIF-1 $\alpha$  segera mengalami hidroksilasi (modifikasi pascatranslasi) oleh enzim *prolyl hydroxylase domain-containing* (PHD) pada residu Prolin546 dan Prolin402. Hidroksilasi tersebut menyebabkan HIF-1 $\alpha$  dikenal dan diikat oleh *protein von hippel lindau* (pVHL), selanjutnya didegradasi oleh sistem ubiquitin-proteasom.<sup>13</sup>

Pada hipoksia enzim PHD tidak aktif, sehingga HIF-1 $\alpha$  stabil dan berakumulasi untuk berpasangan (dimerisasi) dengan HIF-1 $\beta$ , membentuk HIF-1 dan translokasi ke inti sel untuk mengaktifkan transkripsi berbagai gen, yang dibutuhkan untuk beradaptasi terhadap kondisi hipoksia. Melalui aktivitas HIF-1, ekspresi sejumlah gen akan mengalami peningkatan guna mengurangi

ketergantungan sel terhadap O<sub>2</sub> sekaligus meningkatkan pasokan O<sub>2</sub> ke jaringan. Gen yang ditranskripsikan antara lain gen yang terlibat dalam angiogenesis, eritropoiesis, metabolisme dan transport glukosa.<sup>11,12</sup> Di samping menghambat degradasi (stabilitas meningkat), tergantung derajat hipoksia, ekspresi HIF-1 $\alpha$  dapat pula dipacu pada tingkat transkripsi.<sup>14,15</sup> Tujuan penelitian ini, untuk mengamati profil ekspresi gen HIF-1 $\alpha$  pada jantung tikus yang diinduksi hipoksia kronik.

## METODOLOGI PENELITIAN

### Disain Penelitian

Studi ini merupakan penelitian eksprimen *in vivo*, menggunakan tikus *Sprague Dawley* jantan, dengan berat badan 220-250 gram. Tikus dibagi secara acak ke dalam tujuh kelompok (n=4/kelompok). Kelompok pertama adalah kelompok kontrol atau tanpa perlakuan (P1). Enam kelompok lainnya, adalah kelompok perlakuan yaitu P2 - P7. Kelompok perlakuan secara berurutan dipaparkan terhadap hipoksia (8% O<sub>2</sub>, 92% N<sub>2</sub>), masing-masing selama 1, 3, 7, 14, 21 dan 28 hari di dalam sungkup-hipoksia. Selama perlakuan tikus dapat makan dan minum secara *ad libitum*, di samping itu setiap dua hari secara berkala sungkup dibersihkan, pakan dan minuman diganti. Selama dibersihkan (5-10 menit) tikus dipindahkan ke sungkup-kecil yang sudah dipersiapkan sebelumnya dalam kondisi hipoksia. Pada akhir masa perlakuan satu per satu tikus dikeluarkan dari sungkup dan segera ditimbang. Tikus kemudian dipindahkan ke dalam sungkup kecil yang sudah dioptimasi sebelumnya. Dalam sungkup tersebut tikus dimatikan dengan menggunakan eter. Tikus kelompok kontrol (P1) dipelihara

dengan kondisi yang mirip dengan kelompok perlakuan, bedanya menggunakan udara atmosfer dan pada hari ke-28 tikus ditimbang, kemudian dimatikan.

### Bahan dan Cara

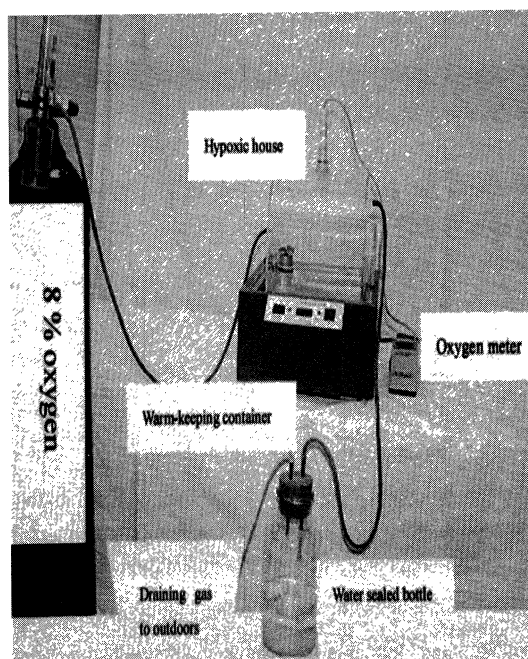
Aktivitas transkripsi HIF-1 $\alpha$ , dimulai dengan isolasi protein inti sel ventrikel jantung, dengan *nuclear extraction kit*, sedangkan pengujian aktivitas transkripsi HIF-1 $\alpha$  dilakukan dengan teknik *TransBinding*, menggunakan *Transbinding HIF-1 $\alpha$  assay kit* (Panomics Inc). Pengukuran perubahan ekspresi gen, dimulai dengan isolasi total RNA dengan *AquaPure RNA isolation kit* (Bio-Rad), selanjutnya konsentrasi mRNA HIF- $\alpha$  ditetapkan

dengan *Quantitative Real-Time RT-PCR* menggunakan reagensia *iScript One-Step RT-PCR kit with SYBR Green* (Bio-Rad). Dua pasang primer masing-masing untuk HIF-1 $\alpha$  dan  $\beta$ -Aktin sebagai kontrol endogen diperoleh dari *1st BASE Pte Ltd*, Singapore, adalah:

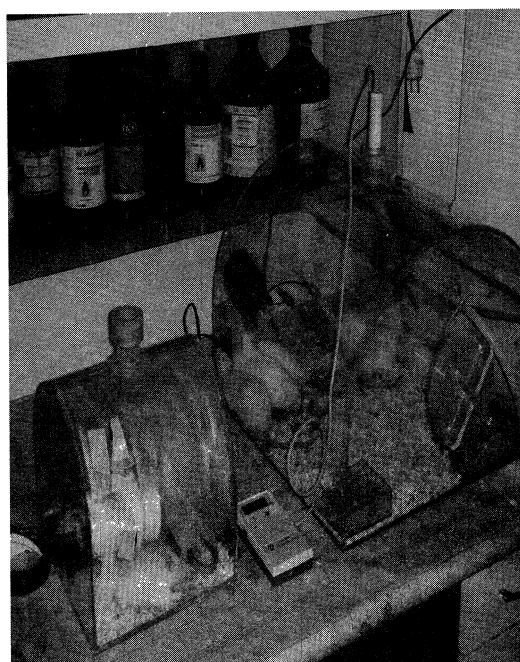
HIF-1 $\alpha$ F SynthID:1346451, Seq: 5'-ACA-GTG-GTA-CTC-ACA-GTC-GG-3'  
HIF-1 $\alpha$ R SynthID:1346452, Seq: 5'-CCC-TGC-AGT-AGG-TTT-CTG-CT-3'  
 $\beta$ -AktinF SynthID:1346453, Seq: 5'-ACC-ACA-GCT-GAG-AGG-GAA-ATC-G-3'

$\beta$ -AktinR SynthID:1346454, Seq: 5'-AGA-GGT-CTT-TAC-GGA-TGT-CAA-CG-3'

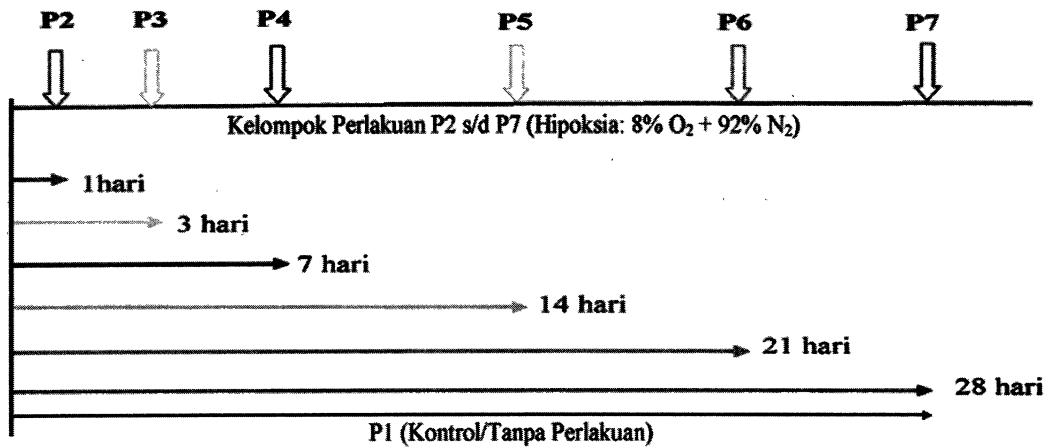
Gambar 1 dan 2 di bawah ini adalah sungkup hipoksia yang digunakan dalam penelitian, sedangkan gambar 3 adalah skema diagram protokol perlakuan pada hewan-coba.



**Gambar 1.** Sungkup-hipoksia ukuran kecil  
Shanghai Institute for Pediatric Research, China



**Gambar 2.** Sungkup-hipoksia ukuran besar  
Modifikasi berdasarkan gambar 1



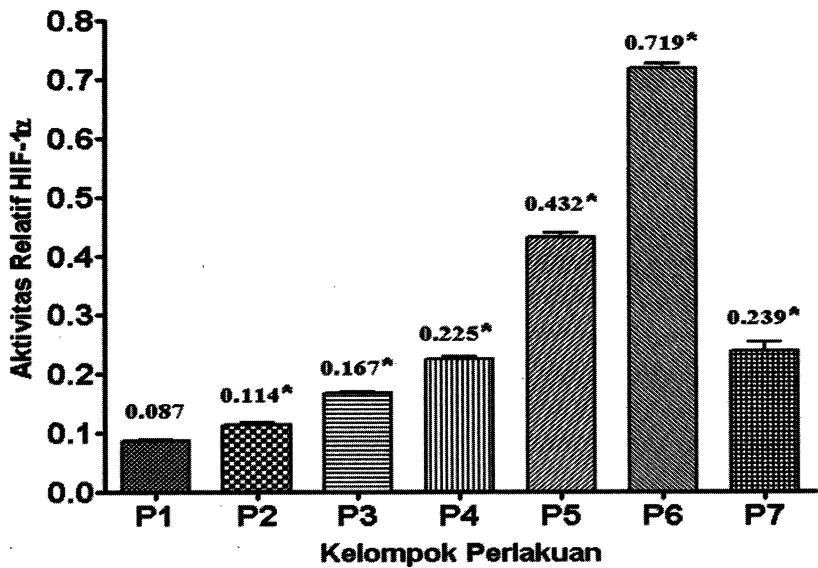
Gambar 3. Skema diagram protokol perlakuan pada hewan-coba

Keterangan: ↓ tikus dimatikan.

**HASIL**

Pengujian aktivitas faktor transkripsi HIF-1 $\alpha$ , dengan teknik *transbinding* ini dilaporkan tanpa satuan. Jadi, hasil yang diperoleh adalah aktivitas relatif dengan membandingkan hasil pembacaan serapan sampel dengan serapan tanpa perlakuan (P1). Sebagai kontrol positif digunakan ekstrak inti sel HeLa yang sudah dipaparkan terhadap

CoCl<sub>2</sub>. Terlihat aktivitas naik secara berangsur, sejak hari pertama sampai hari ke 14 (P5) sejalan dengan lamanya perlakuan. Akan tetapi pada hari ke 21 (P6), terjadi kenaikan yang mencolok dan mencapai puncak, yaitu 8.2 kali dibanding P1. Selanjutnya, pada akhir perlakuan (P7), aktivitas turun kembali secara tajam, yaitu sekitar 2.75 kali dibanding kontrol P1 (Gambar 4).

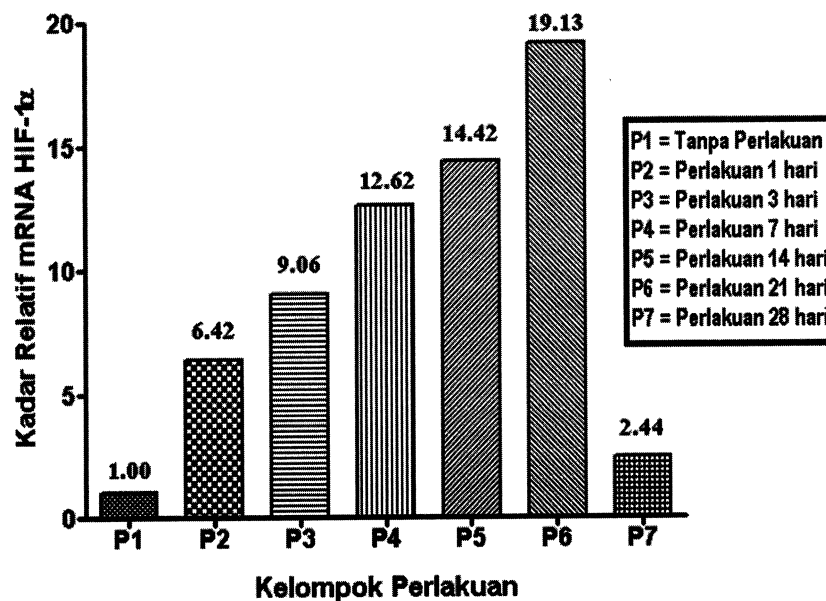


Gambar 4. Aktivitas Relatif HIF-1 $\alpha$

\*perbedaan bermakna dibanding normoksia ( $P < 0.05$ , uji Mann Whitney)

*Real Time RT-PCR*, dilakukan untuk mengukur ekspresi gen HIF-1 $\alpha$  pada tingkat transkripsi, yaitu dengan mengukur konsentrasi mRNA HIF-1 $\alpha$ . Sebagai kontrol endogen digunakan gen  $\beta$ -Aktin, sedangkan analisis hasil RT-PCR dilakukan dengan metoda Livak-Schmittgen, yang dikenal sebagai metoda komparatif.<sup>16</sup> Hasil menunjukkan bahwa konsentrasi mRNA HIF-1 $\alpha$  meningkat (upregulasi)

dengan tajam sejak awal perlakuan seperti terlihat pada gambar 5. Setelah satu hari perlakuan (P2) konsentrasi mRNA naik menjadi 6.42 kali lipat (*fold changed*) dibandingkan tanpa perlakuan. Selanjutnya, konsentrasinya naik terus sehingga mencapai puncak pada hari ke 21 (P6), yaitu 19.13 kali lipat dan kemudian menurun secara tajam pada akhir perlakuan.



Gambar 5. Perubahan Ekspresi Gen HIF-1 $\alpha$

## PEMBAHASAN

Kenaikan aktivitas HIF-1 $\alpha$  menunjukan hewan-coba berada dalam kondisi stres yang berat, sebagai akibat hipoksia kronik. Terutama pada kelompok P6, dengan aktivitas 8.2 kali dibanding kontrol (P1), akumulasi HIF-1 $\alpha$  menjadi maksimal dan bersama dengan HIF-1 $\alpha$  membentuk faktor transkripsi HIF-1 untuk berperan sebagai *regulator* homeostasis oksigen dan bekerja secara optimal untuk beradaptasi dan mempertahankan kelangsungan hidup. Berbagai usaha

kompensasi dilakukan HIF-1 untuk menanggulangi turunnya pasokan oksigen, antara lain aktivasi transkripsi gen *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan *erythropoietin* (EPO) untuk meningkatkan transport oksigen. Di samping itu, transkripsi enzim-enzim glikolisis dan glukosa transporters dipacu, dengan tujuan mengubah pola metabolisme menjadi lebih bersifat anaerob.<sup>11,12</sup>

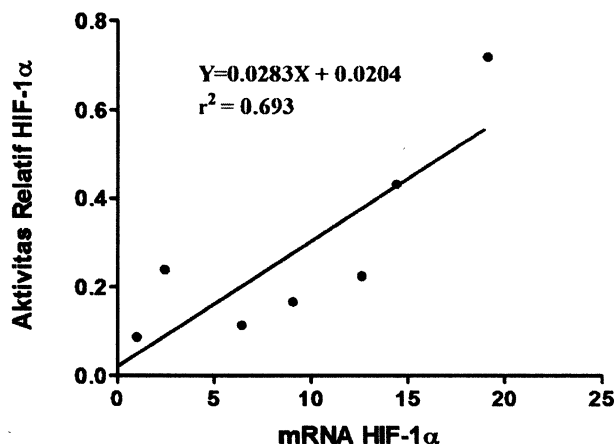
*Hypoxia Inducible Factor-1* merupakan protein yang sangat dipertahankan, karena terdapat pada berbagai organisme dengan rentangan

yang luas, mulai nematoda sampai mamalia. *Hypoxia Inducible Factor-1* mengatur respons seluler dan sistemik terhadap keadaan hipoksia, melalui upregulasi berbagai gen untuk membantu organisme dalam beradaptasi dan mempertahankan kelangsungan hidup. HIF-1 dipandang sebagai *master regulatory gene*, karena menstimulasi transkripsi sejumlah gen (lebih dari 100 gen).<sup>17</sup>

Konsentrasi mRNA HIF-1 $\alpha$  yang meningkat dengan puncaknya 19.13 kali lipat (P6) memperlihatkan bahwa, perubahan ekspresi HIF-1 $\alpha$  pada hipoksia kronik, bukan hanya disebabkan peningkatan stabilitas HIF-1 $\alpha$ . Akan tetapi, keadaan tersebut juga sebagai akibat dari peningkatan mRNA HIF-1 $\alpha$ , dengan perkataan lain, regulasi HIF-1 $\alpha$  pada hipoksia kronik, terjadi pada tingkat transkripsi dan pascatranslasi (degradasi dihambat). Penurunan aktivitas dan konsentrasi mRNA pada akhir perlakuan (P7), diduga pada saat itu hewan-coba sudah mengalami hipoksia yang sangat berat atau bahkan sudah berada pada kondisi anoksia. Pada kondisi tersebut, gangguan fungsi jantung menjadi lebih parah, karena konsentrasi protein p53 meningkat

dengan pesat dan bersaing dengan HIF-1 $\alpha$  dalam memperebutkan ko-aktivator transkripsi CBP/p300. Kekalahan dalam persaingan tersebut menyebabkan HIF-1 $\alpha$  diikat oleh protein Mdm2 dan selanjutnya didegradasi oleh proteasom, sedangkan p53 menjadi aktif dan berperan utama dalam menimbulkan kematian sel (apoptosis).<sup>18,19</sup>

Analisis statistik menunjukkan terdapat korelasi yang cukup kuat antara konsentrasi mRNA HIF-1 $\alpha$  dengan aktivitas HIF-1 $\alpha$ . Pada uji regresi linear didapatkan  $r^2 = 0.693$ , sedangkan uji korelasi Spearman didapatkan  $r = 0.786$ , dengan nilai  $P$  (*two-tailed*) = 0.048, seperti terlihat pada gambar 6. Korelasi tersebut secara tidak langsung menunjukkan sekali lagi bahwa pada hipoksia kronik, peningkatan ekspresi HIF-1 $\alpha$  bukan hanya karena degradasinya dihambat, tetapi transkripsi dan translasinya juga ditingkatkan. Jalur sinyal yang berperan adalah PI3K/Akt/mTOR dan Ras/MAPK/MEK, melalui aktivasi reseptor tirosin kinase (RTK) dari *growth factor*. Kedua jalur transduksi sinyal tersebut sangat penting untuk proliferasi, metabolisme serta kelangsungan hidup sel.<sup>20</sup>



Gambar 6. Uji regresi linear antara mRNA HIF-1 $\alpha$  dan Aktivitas HIF-1 $\alpha$   
Korelasi Spearman:  $r = 0.786$ , nilai  $P$  (*two-tailed*) = 0.048

## KESIMPULAN

Pada tikus yang diinduksi hipoksia kronik, ekspresi HIF-1 $\alpha$  mengalami upregulasi di tingkat pascatranslasi, karena degradasinya dihambat atau stabilitasnya ditingkatkan, sehingga aktivitasnya sebagai faktor transkripsi, meningkat. Peningkatan mRNA HIF-1 $\alpha$  menunjukkan bahwa upregulasi juga terjadi pada tingkat transkripsi. Akan tetapi bila hipoksia berkelanjutan atau terjadi anoksia, akan terjadi *downregulation*.

Tidak diragukan, HIF-1 $\alpha$  mempunyai peranan penting dalam menginduksi respons yang kompleks terhadap berbagai stres dan berkontribusi dalam mempertahankan homeostasis sistemik dan seluler. Hipoksia dan proses yang menyertai hipoksia terlibat pada perkembangan embrio, proses fisiologi dan berbagai

keadaan patologi seperti kanker, kardiovaskuler, stroke, anemia, penyakit paru kronik, inflamasi, diabetes, penyembuhan luka dan aklimasi ketinggian. Dengan demikian, keberadaan HIF-1 $\alpha$  sebagai faktor transkripsi yang berperan sentral dalam beradaptasi terhadap hipoksia, membuatnya menjadi kandidat yang menarik dalam mengembangkan strategi terapi. *Hypoxia Inducible Factor-1* dapat menjadi sasaran penting, baik untuk manipulasi inhibisi maupun induksi. Inhibisi HIF-1 $\alpha$  dapat menekan angiogenesis tumor dan untuk menghambat adaptasi dari sel tumor terhadap hipoksia. Di lain pihak, stimulasi aktivitas HIF-1 $\alpha$  bermanfaat pada situasi di mana angiogenesis-baru merupakan efek yang diinginkan, misalnya pada stroke atau penyakit kardiovaskuler

## DAFTAR PUSTAKA

1. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 2005; 115: 500-8.
2. Roy S, Khanna S, Bickerstaff AA, Subramanian SV, Atalay M, et al. Oxygen sensing by primary cardiac fibroblasts: a key role of p21(Waf1/Cip1/Sdi1). *Circ Res* 2003; 92: 264-71.
3. Humar R, Kiefer FN, Berns H, Resink TJ, Battegay EJ. Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis *in vitro* via rapamycin (mTOR)-dependent signaling. *Faseb J* 2002; 16: 771-80.
4. Braunwald E, Bristow MR. Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circulation* 2000;102:IV-14"IV-23.
5. Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes & Development* 2004;18:2183-94.
6. Sharp FR, Bernaudin M. HIF-1 and oxygen sensing in the brain. *Neuroscience* 2004 Jun; 5: 437-46.
7. Peers C, Kemp PJ. Acute oxygen sensing: diverse but convergent mechanisms in airway and arterial chemoreceptors. *Respir Res* 2001;2:145-9.
8. Zagorska A, Dulak J. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochimica Polonica* 2004;51:563-78.
9. Byrne JA, Grieve DJ, Cave AC, Shah AM. Oxidative stress and heart failure. *Archives Des Maladies Du Cœur Et Des Vaisseaux* 2003;96:214-20.
10. Petrovič D. Cytopathological basis of heart failure – cardiomyocyte apoptosis, interstitial fibrosis and inflammatory cell response. *Folia Biologica Praha* 2004;50:58-62.



11. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)  $\alpha$ : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 2004; 36: 1-12.
12. Zarembek KA, Malech HL. HIF-1 $\alpha$ : a master regulator of innate host defenses? *J Clin Invest* 2004; 115: 1702-4.
13. Wenger RH. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol* 2000; 203: 1253-63.
14. Zagorska A, Dulak J. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochimica Polonica* 2004; 51: 563- 78.
15. Metzen E, Ratcliffe PJ. HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing 2004; 385: 223-30.
16. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_T$  method. *Elsevier Science Methods* 2002; 25: 402-8.
17. Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level 2004; 19: 176-182.
18. Schmid T, Jie Z, Brune B. HIF-1 and p53 : Communication of transcription factors under hypoxia. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 423-31.
19. D'Angelo G, Duplan E, Boyer N, Vigne P, Frelin C. Hypoxia upregulates prolyl hydroxylase activity: a feedback mechanism that limits HIF-1 responses during reoxygenation. *J Biol Chem* 2003; 278: 38183-7.
20. Proud CG. Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research* 2004; 63: 403-13.