

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**REGULACIÓN DE LA PROTEÍNA DE MATRIZ
EXTRACELULAR TROMBOSPONDINA-1 POR EL GEN
SUPRESOR DE TUMORES VHL Y POR LA HIPOXIA.
ASPECTOS FUNDAMENTALES DE SU REGULACIÓN
EN CÉLULAS DE CARCINOMA RENAL DE CÉLULA
CLARA**

**RAQUEL BIENES MARTÍNEZ
MADRID 2013**

RESUMEN	5
ABSTRACT	9
ABREVIATURAS	13
INTRODUCCIÓN	17
1. SÍNDROME DE VON HIPPEL-LINDAU	19
2. VHL: EL GEN, LA PROTEÍNA Y SUS FUNCIONES.....	24
2.1 El gen.....	24
2.2 La proteína.....	25
2.3 Funciones de pVHL.....	26
3. EL FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA HIF: REGULACIÓN DE HIF POR pVHL Y PHDs	31
4. CARCINOMA RENAL DE CÉLULA CLARA	35
5. TROMBOSPONDINA-1	39
5.1 Estructura de la proteína.....	42
5.2 Regulación de la TSP-1	46
5.3 Implicaciones de la TSP-1 en cáncer.....	49
5.4 Moléculas a través de las cuales TSP-1 ejerce sus funciones.....	51
OBJETIVOS	55
MATERIALES Y MÉTODOS	59
1. Cultivos celulares	61
2. Anticuerpos y reactivos	62
3. Vectores de expresión.....	63
4. Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot.....	65

5. Preparación y concentración de medios condicionados	66
6. Inmunoprecipitación de proteínas	66
7. Preparación de extractos intracelulares	67
8. PCR cuantitativa a tiempo real	67
9. Silenciamiento génico mediante ARN de interferencia	69
10. Purificación y análisis del ARN mensajero en la fracción polisómica y no polisómica	70
11. Análisis del ARN mensajero total de la fracción citosólica y nuclear	71
12. Migración e invasión	72
13. Análisis estadístico	73
RESULTADOS	75
1. PAPEL DE pVHL EN LA REGULACIÓN DE TSP-1	77
2. PAPEL DE LA HIPOXIA EN LA REGULACIÓN DE TSP-1	80
3. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE REGULACIÓN DE TSP-1 POR VHL	84
3.1 La regulación de TSP-1 por VHL no es mediada por una unión directa entre ambas moléculas	84
3.2 La expresión de VHL no regula la secreción de la TSP-1 al medio extracelular.	85
3.3 La pérdida de VHL no produce un aumento en la degradación de TSP-1	88
4. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA TSP-1 POR LA HIPOXIA	92
4.1. La regulación de la TSP-1 por la hipoxia es independiente de HIF.	93

4.2 La hipoxia no regula la secreción de la TSP-1 al medio extracelular.	96
4.3 La hipoxia no produce un aumento en la degradación de TSP-1.	98
4.4 La hipoxia regula el transporte núcleo- citosol del ARN mensajero de la TSP-1.	101
4.5 La disminución de la TSP-1 en hipoxia está modulada por la actividad de las PHDs.....	103
4.6 La vía de señalización de Akt contribuye en la regulación de la TSP-1 por la hipoxia.....	107
5. LA REGULACIÓN DE LA TSP-1 EN ccRCC AFECTA SU CAPACIDAD MIGRATORIA E INVASIVA	113
DISCUSIÓN	121
CONCLUSIONES	135
BIBLIOGRAFÍA	139
ANEXO I	159
ANEXO II.....	163

RESUMEN

La trombospondina-1 (TSP-1) es una proteína de la matriz, multifuncional y con actividad antitumoral. Esto es debido en parte a su capacidad para inhibir la angiogénesis, determinando así la evolución de muchos tumores. Recientemente se ha demostrado que la pérdida de TSP-1 contribuye al fenotipo angiogénico de carcinomas renales (RCC). En estos tumores la falta de expresión del gen supresor de tumores von Hippel-Lindau (*vhl*) y su proteína pVHL, así como la hipoxia contribuyen a la estabilización de los factores inducibles por hipoxia (HIF), los cuales inducen genes que permiten la adaptación de las células tumorales a concentraciones de oxígeno no fisiológicas. Dentro de los genes diana de HIF se encuentran factores que promueven la angiogénesis, siendo esperable la disminución de aquellos factores que por el contrario inhiben la angiogénesis. Hay evidencias que sugieren que la TSP-1 está implicada en el mantenimiento de la angiostasis renal normal, sin embargo, los factores que intervienen en su regulación no están claros. Por tanto, en este trabajo se han analizado los efectos de la pérdida de pVHL y la hipoxia en la expresión de la TSP-1 en varias líneas celulares de carcinoma renal de célula clara (ccRCC). Los resultados mostraron que los niveles de TSP-1 disminuyeron en ausencia de pVHL y en hipoxia, produciéndose una bajada en los niveles de proteína sin que se viesen afectados los niveles de mensajero. Es interesante destacar que esta regulación era independiente de la estabilización de HIF. Sin embargo, observamos que el transporte deficiente de ARN mensajero al citoplasma, la disminución de la actividad de las prolinhidroxilasas (PHDs) y un aumento de la activación de la vía PI3K/Akt en condiciones de hipoxia están implicados en la disminución de la TSP-1. Además, esta regulación es importante para motilidad celular de los ccRCC. Estos datos muestran un patrón de

regulación complejo para la TSP1 en el eje pVHL-hipoxia que demuestra ser importante para el comportamiento de estos carcinomas.

ABSTRACT

Thrombospondin-1 (TSP-1) is a multifunctional matrix protein with potent antitumor activities due in part to its ability to inhibit angiogenesis. Its expression levels determine the fate of many different tumors. Recently it has been shown that TSP-1 loss contributes to the angiogenic phenotype of renal carcinomas (RCC). In these tumors both, the lack of expression of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene (*vhl*) and hypoxic conditions contribute to the stabilization of the Hypoxia Inducible Factors (HIF), which adapt tumor cells to the hypoxic environment. HIF targets include angiogenic factors to result in increased angiogenesis, therefore we hypothesize that antiangiogenic factors should correspondingly be decreased. Several pieces of evidence suggest that TSP-1 expression supports normal kidney angiostasis; however, the factors involved in its regulation remains unclear. Hence, we sought to analyze the effects of VHL loss and hypoxia on TSP-1 expression in several clear cell renal carcinoma cell lines (ccRCC). We found that TSP-1 levels decreased in the absence of VHL and in hypoxia. These conditions only affected TSP-1 protein levels, and no transcriptional regulation was observed. Interestingly, VHL- and hypoxia-mediated TSP1 regulation was HIF-independent. Rather, deficient TSP1 mRNA transport to the cytoplasm, decreased oxygen-dependent prolyhydroxylases (PHDs) activity and increased activation of the PI3K/Akt signaling pathway under hypoxia contributed to decrease TSP-1 levels. Furthermore, TSP1 regulation proved to be important in ccRCC cell motility. These data substantiates a complex regulation pattern for TSP1 in the VHL-hypoxia axis that demonstrates to be important for ccRCC cell behaviour.

ABREVIATURAS

ADAM: A Disintegrin And Metalloproteinase. Una proteína desintegrina y metaloproteinasas.

ADAMTS: a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs. Una proteína desintegrina y metaloproteinasas con motivos de tipo trombospondina

ARNm: Messenger Ribonucleic Acid. Ácido ribonucleico mensajero

ARNT: Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator, Translocador nuclear del receptor para aril hidrocarburos.

bHLH: Basic-Helix-Loop-Helix, Motivo estructural de interacción proteína-proteína y proteína-ADN formado por un dominio básico seguido de hélice-bucle-hélice.

ccRCC: Clear Cell Renal Cell Carcinoma, Carcinoma renal de célula clara.

Cul2: Cullin 2. Culina 2.

EPAS: Endothelial PAS domain protein. Proteína con dominio PAS endotelial.

FIH: Factor Inhibiting HIF-1, Factor inhibidor de HIF-1.

HIF: Hypoxia-Inducible-Factor, Factor inducible por hipoxia.

HRE: Hypoxia Response Element, Elemento de respuesta a hipoxia.

HuR: Human Antigen R. Antígeno humano R

IAP: Integrin Associated Protein, Proteína asociada a integrinas.

IL-2: Interleukin-2, Interleuquina 2.

IL-1 β : Interleukine 1 β , Interlequina 1 β .

IPAS: Inhibitory PAS Domain Protein, Proteína con propiedad inhibitoria del dominio PAS.

LPA: Lysophosphatidic acid, Ácido lisofosfatídico.

MMP: Matrix Metalloproteinase, Metaloproteinasas de matriz.

PHD: Prolyl Hydroxylase Domain containing protein, Proteína que contiene un dominio prolina hidroxilasa.

RCC: Renal Cell Carcinoma, Células de carcinoma renal.

RBX1: Ring-box 1.

siRNA: Small Interference RNA, ARN de interferencia pequeño.

TSP-1,2,3,4,5: Thrombospondin 1,2,3,4,5, Trombospondina 1,2,3,4,5.

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor, Factor de crecimiento del endotelio vascular.

pVHL: von Hippel-Lindau protein, Proteína codificada por el gen supresor de tumores causante del síndrome de von Hippel-Lindau.

vhl: von Hippel-Lindau gen, Gen supresor de tumores causante del síndrome de von Hippel-Lindau.

INTRODUCCIÓN

1. SÍNDROME DE VON HIPPEL-LINDAU

El Síndrome de Von Hippel-Lindau es una enfermedad incluida dentro del grupo de enfermedades raras con herencia autosómica recesiva, aunque clínicamente hablando se considera como una enfermedad autosómica dominante, ya que la mutación del segundo alelo del gen de *vhl* ocurre con facilidad a lo largo de la vida del paciente (Maher and Kaelin 1997). Su incidencia es de 1/36000 nacimientos en el este de Inglaterra, siendo la prevalencia de 1/53000 en esta misma región y 1/39000 en el Suroeste de Alemania (Maher ER 2011). La causa genética de esta enfermedad es una alteración en ambos alelos del gen supresor de tumores von Hippel-Lindau (*vhl*), situado en el brazo corto del cromosoma 3 (Seizinger BR 1988). La mayoría de los pacientes heredan un alelo de *vhl* inactivo de uno de los progenitores y tan solo en el 20% de los casos se producen las dos mutaciones necesarias para la inactivación del gen de manera espontánea (Kaelin 2004; Maher ER 2011). El 30-40% de los casos se deben a deleciones de uno o más exones del gen *vhl*, aunque también se han descrito mutaciones con aparición de codones de terminación (*missense*), pérdida completa del producto del gen o mutaciones que provocan alteraciones considerables en el plegamiento de la proteína (Maher ER 2011). En otros casos, sin embargo, se ha visto una hipermetilación en la región del ADN que codifica para este gen (Kaelin 2004).

Entre las manifestaciones clínicas que caracterizan a este síndrome destacan:

Hemangioblastomas del sistema nervioso central: Es la manifestación más frecuente, apareciendo en el 60-80% de los pacientes que sufren este síndrome. La edad media de diagnóstico es a los 30 años, pudiendo aparecer desde los 9 años hasta los 70 años. Son tumores benignos que aparecen en forma de células neoplásicas alargadas rodeadas de una abundante red capilar, se localizan a lo largo del eje craneoespinal, aunque raramente aparecen en el cerebro. Se caracterizan por poseer un crecimiento lento alternando periodos de crecimiento tumoral con periodos quiescentes. En el 20% de los casos se puede desarrollar una policitemia secundaria (Richard S 2012).

Hemangioblastomas de retina: Se presentan en el 50% de los pacientes con síndrome de von Hippel-Lindau. La edad media de diagnóstico es 25 años, aunque hay casos en los que aparece durante la infancia. Son pequeños tumores que aparecen como un enrojecimiento globular periférico con una arteria dilatada y tortuosa que va desde el disco óptico hasta el tumor. Aunque son de fácil tratamiento y buen pronóstico, la detección tardía o la falta de tratamiento puede conllevar la pérdida de la retina, hemorragia, glaucoma y cataratas que finalmente pueden derivar en ceguera (Richard S 2012).

Carcinoma renal (RCC): Es la mayor complicación del síndrome de von Hippel-Lindau. Tiene lugar en el 75% de los pacientes que sufren este síndrome. La edad media a la que se empiezan a desarrollar estos carcinomas son 39 años, detectándose de manera accidental, y muchas veces en etapas tardías, a los 60 años, puesto que en estadíos tempranos no presenta síntomas (Maher ER 2011; Richard S 2012).

Feocromocitomas: Son tumores neuroendocrinos originados en las células cromafines de la médula suprarrenal, cuyas manifestaciones clínicas se deben a la liberación de catecolaminas (dopamina, epinefrina y norepinefrina) por parte de estos tumores (Domi R 2012). Aparecen

en el 25% de los pacientes, sobre todo en aquellos pacientes que entran dentro de la clasificación de tipo 2 del síndrome de von Hippel-Lindau. La edad media de diagnóstico suele ser los 27 años, aunque también puede aparecer en niños. En el 85% de los casos son sintomáticos, siendo en algunas ocasiones la única manifestación del síndrome. Los feocromocitomas son malignos en el 5% de los pacientes con el síndrome de VHL (Richard S 2012).

Tumores pancreáticos neuroendocrinos (TNE): Son tumores endocrinos que se originan en el páncreas. Es el tipo de tumor neuroendocrino más común. Estos tumores se pueden clasificar en funcionales (liberan un exceso de hormonas) y no funcionales (no producen hipersecreción hormonal), siendo estos últimos los que más morbi-mortalidad producen debido a su capacidad de invasión y metástasis (Ro C 2012). Se observan en el 11-17% de los pacientes con síndrome de von Hippel-Lindau y junto con los carcinomas renales son una de las manifestaciones más graves, pudiendo ser malignos (Richard S 2012).

Cistos pancreáticos: La aparición de múltiples cistos es la manifestación pancreática más común, aproximadamente el 75% de los pacientes de edad avanzada desarrollan estos cistos. Pueden aparecer de forma aislada o formando cistos múltiples, aunque no suelen afectar a la función del páncreas (Richard S 2012; Maher ER 2011).

Cistoadenomas serosos: Son tumores multicísticos calcificados, benignos y sólo un 10% de los pacientes con síndrome de von Hippel-Lindau desarrollan esta manifestación. Al igual que los cistos pancreáticos, estos tampoco tienen implicaciones clínicas (Richard S 2012).

Tumores de la cavidad endolinfática: Son adenocarcinomas papilares altamente vascularizados. Afectan al 10-15% de los pacientes, siendo la

edad media de diagnóstico los 22 años. Aparece en la región del laberinto, considerándose una lesión destructiva puesto que puede llegar a destruir el hueso temporal si llegase a crecer lo suficiente (Richard S 2012).

Cistoadenomas papilares epididimales: Afecta al 50% de los pacientes masculinos que sufren síndrome de von Hippel-Lindau. Son lesiones benignas y asintomáticas que aparecen en el ducto epididimal. Similares a éstos son los que aparecen en las mujeres que sufren el síndrome de VHL y se denominan cistoadenomas del ligamento ancho (Richard S 2012).

Atendiendo a las manifestaciones clínicas, el síndrome de von Hippel-Lindau se clasifica en 3 tipos: tipo 1, tipo 2 y tipo 3 (Tabla 1). El tipo 1 es el más frecuente y los pacientes se caracterizan por manifestar hemangioblastomas de retina y del sistema nervioso central, y carcinoma renal (Maher ER 2011). La enfermedad de von Hippel-Lindau de tipo 2 se caracteriza por la presencia de feocromocitomas. Este grupo a su vez se subdivide en otras 3: 2A, 2B y 2C. Los subtipos 2A y 2B se diferencian por el bajo o alto riesgo de sufrir RCC, respectivamente. Sin embargo los pacientes con el tipo 2C únicamente manifiestan feocromocitomas. Los pacientes con el tipo 3 están afectados por policitemia de Chuvash, caracterizada por un elevado hematocrito, aumento de los niveles en suero de eritropoyetina y VEGF (factor de crecimiento de endotelio vascular), pero no manifiestan ninguno de los demás síntomas del síndrome de VHL revisado por {Calzada, 2010 #403}.

Por otro lado, se ha establecido una correlación entre el genotipo y el fenotipo de la enfermedad (Richard S 2012), así el síndrome de tipo 1

se caracteriza por deleciones o mutaciones que producen una terminación prematura de la traducción de la proteína, lo que da lugar a una alteración en la estructura terciaria de la misma, produciéndose una regulación defectuosa de la subunidad alfa de HIF. En el tipo 2 ocurren mutaciones sin sentido que alteran parcialmente la función de VHL, de manera que las mutaciones de tipo 2A y 2B no poseen la capacidad de regular HIF (Richard S 2012) y de ensamblar fibronectina (Ohh et al. 1998). Sin embargo, el tipo 2C mantiene la capacidad de regular HIF, pero no de ensamblar fibronectina (Hoffman et al. 2001). En el tipo 3 o policitemia de Chuvash, se produce un cambio de una citosina por una timina en el nucleótido 598 que, a su vez, da lugar a un cambio de una arginina por un triptófano en la posición 200 (R200W). Esta mutación afecta a la función de pVHL de regular la subunidad alfa de HIF (Ang SO 2002) (Tabla 1).

Tipo VHL	Mutación	Defecto Molecular	Manifestación clínica
Tipo I 80%	Pérdida de VHL y mutaciones que afectan a la integridad de la proteína	Acumulan HIF Deficiencias en el ensamblaje de matriz extracelular	Hemangioblastoma Carcinoma renal de célula clara
Tipo 2A	Mutaciones puntuales sin sentido	Acumulan HIF Deficiencias en el ensamblaje de matriz extracelular	Hemangioblastoma Feocromocitoma
Tipo 2B	Mutaciones puntuales sin sentido	Acumulan HIF Deficiencias en el ensamblaje de matriz extracelular	Hemangioblastoma Feocromocitoma Carcinoma renal de célula clara
Tipo 2C	Mutaciones puntuales sin sentido	Regulan HIF Deficiencias en el ensamblaje de matriz extracelular	Feocromocitoma
Tipo 3	Mutaciones puntuales sin sentido	Acumulan HIF	Síndrome de Chuvash

Tabla 1. Clasificación y Relación fenotipo-genotipo en el síndrome de von Hippel-Lindau. El síndrome de von Hippel-Lindau se clasifica según las manifestaciones que presentan los pacientes. Dichas manifestaciones se deben a mutaciones que se producen en *vhl* y que producen unas alteraciones a nivel molecular relacionadas con la regulación de HIF y el ensamblaje de fibronectina.

2. VHL: EL GEN, LA PROTEÍNA Y SUS FUNCIONES

2.1 El gen

El gen de VHL (*vhl*) ha sido mapeado en el cromosoma 3p25-26 por Seizinger y colaboradores en 1988 (Seizinger BR 1988), y más tarde fue clonado por Latif y colaboradores (Latif et al. 1993). El gen *vhl* posee 3 exones que por procesamiento alternativo debido a la existencia de un sitio de inicio de la traducción adicional en el codón 54 pueden dar lugar a dos proteínas de tamaño diferente pero funciones similares: una de 213 aminoácidos con un peso molecular de 30 kDa y otra de 160 aminoácidos con un peso molecular de 19 kDa (Maher ER 2011; Richard S 2012; Kaelin 2004; Sufan RI 2004). Las mutaciones en *vhl* tienen lugar a lo largo de toda la secuencia codificante, excepto en los primeros 53 codones, donde no se ha descrito ninguna mutación. En aproximadamente el 30% de las mutaciones que ocurren se produce la pérdida de uno o varios exones, mientras que en el 50% de los casos estas mutaciones producen una pérdida de sentido, inserciones o deleciones que dan lugar a proteínas truncadas (Richard S 2012).

2.2 La proteína

La estructura tridimensional de la proteína (pVHL) revela varios dominios estructurales (Figura 1):

- Un dominio N-terminal ácido que comprende los primeros 53 aminoácidos.
- Un dominio formado por láminas β al que se ha denominado dominio β . Este dominio junto con la porción terminal del dominio α constituye la región de interacción con su sustrato.
- Un dominio C-terminal o dominio α , formado por α hélices y que une los dominios α de la elonguina C, sirviendo de puente para su unión al resto de componentes del complejo ubiquitina ligasa.

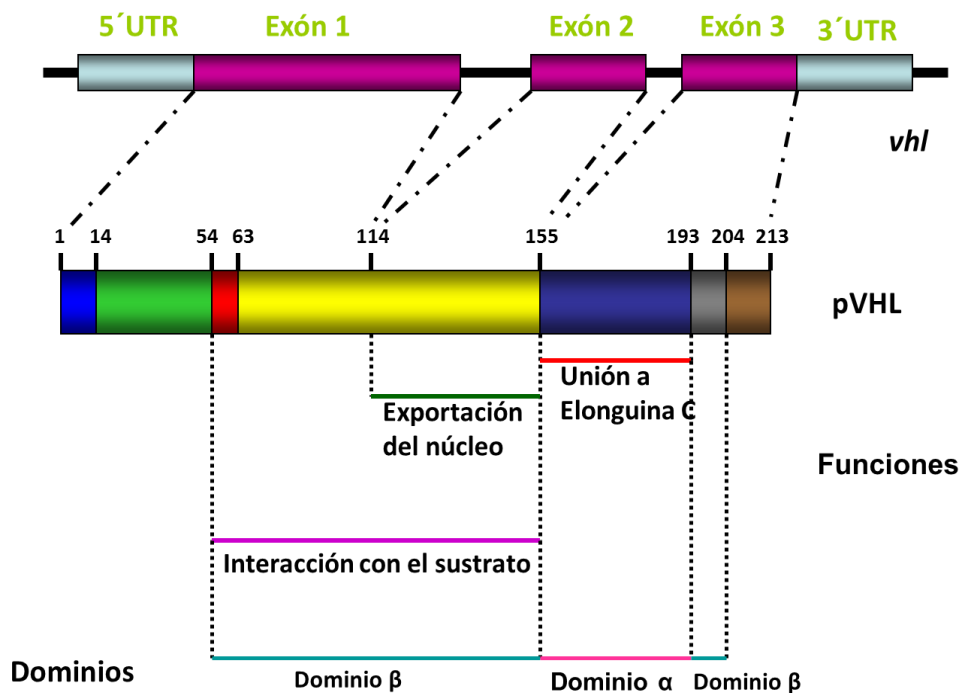


Figura 1. Estructura del gen, proteína y funciones de VHL. El gen de VHL (*vhl*) está formado por tres exones que dan lugar a la proteína de VHL (pVHL), formada por 2 dominios, el dominio α , siendo importante este dominio para la unión con la Elonguina C, y el dominio β , que se encarga de la exportación del núcleo al citosol y de la interacción con el sustrato.

2.3 Funciones de pVHL

Se han descrito diferentes funciones de esta proteína, entre las que se pueden destacar:

Degradación de proteínas vía proteosoma: Para ello pVHL forma parte de un complejo ubiquitin-ligasa E3 junto con elonguina B, elonguina C, Cullina 2 (Cul2), Rbx1 (también conocida como ROC1/Hrt1). A este complejo se le denomina VEC (Kaelin 2004; Sufan RI 2004). Como ya hemos mencionado anteriormente, la proteína pVHL está compuesta por varios dominios con funciones definidas. El dominio α es necesario para la función del complejo E3 ubiquitin ligasa mediante su unión a la elonguina C, mientras que el dominio β es importante para el reconocimiento de sus sustratos (Sufan RI 2004). El modo en que esta proteína se ensambla con el complejo E3 es el siguiente: la elonguina C actúa como puente de unión entre pVHL, Cul 2 y Elonguina B. Por otro lado, Cul 2 se asocia con Elonguina C y Rbx1. Se cree que Rbx1 se une a E2, que es necesaria para la función ligasa del complejo VBC (Sufan RI 2004).

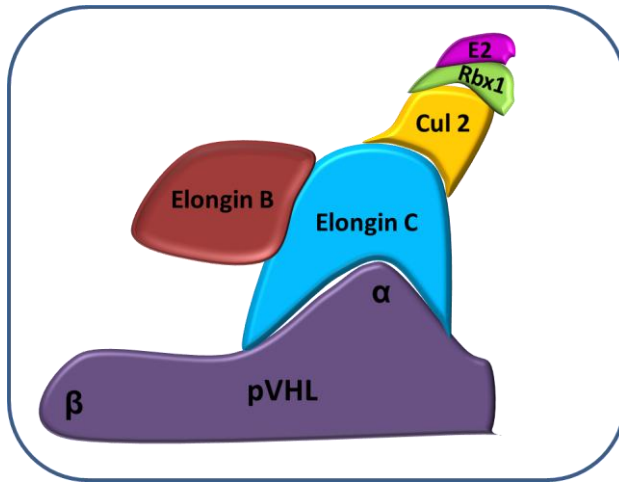


Figura 2. Estructura del complejo VBC. pVHL a través de su dominio α se une a la Elonguina C, que a su vez se une a la Elonguina B y a Cul2. Por otro lado, Cul2 se une a Rbx1, que se une a E2 (Modificado de {Calzada, 2010 #403}).

El complejo pVHL-E3 lleva a cabo la poliubiquitinación de sus sustratos, proceso mediante el cual las proteínas son reconocidas por el proteosoma para su degradación, entre ellas destacamos la degradación del factor inducible por hipoxia (HIF). Esta función se trata con detalle en el apartado 3, dado que es un aspecto importante en esta tesis.

Aunque la participación de pVHL en la degradación de HIF- α es la función más conocida de esta proteína, existen otras moléculas que también son degradadas por pVHL como son los miembros de la familia de proteínas atípicas Quinasa C, enzimas deubiquitinizantes (VDU) y la séptima unidad de la ARN polimerasa II (Rpb7) (Kaelin 2004; Sufan RI 2004).

Estabilización de proteínas: Además de su implicación en la degradación de proteínas, pVHL también se ha visto implicada en la estabilización de proteínas como p53 en células de carcinoma renal (786-O, UOK121 y UMRC6), en las que se ha visto que pVHL favorece la

unión de HuR, cuya función es la estabilización del ARNm, a p53 aumentando así el ARN mensajero de p53 en la fracción polisómica. Esto a su vez produce un aumento de los niveles de proteína sin que se observen cambios significativo en los niveles de ARN mensajero (Galban et al. 2003). Otros autores han demostrado que p53 se une a la subunidad alfa de pVHL impidiendo la unión de pVHL a la Elongina C y por tanto inactivando el complejo pVHL-ubiquitin ligasa. Por otro lado, esta unión también impide la unión de otras ubiquitin ligasas como es Mdm2, favoreciendo así la estabilización de p53 al bloquearse su degradación por el proteosoma. Además, pVHL media la transactivación de p53 mediante la acetilación de lisinas de p53 (Roe et al. 2006). pVHL también es capaz de aumentar la estabilización y la vida media de la proteína pro-apoptótica y supresora del crecimiento Jade-1 {Foy RL, 2012 #553} mediante la unión directa a los motivos de unión a Zinc (Zhou et al. 2004). BIM_{EL} es otra proteína pro-apoptótica cuya estabilidad está regulada por pVHL. En este caso al igual que para p53, la unión directa de pVHL a BIM_{EL} también bloquea la actividad del complejo ubiquitin ligasa y por tanto su posible degradación vía proteosoma (Guo et al. 2009).

Otras funciones:

Además de las funciones de degradación y estabilización de proteínas, se ha visto que pVHL juega un papel importante en el **mantenimiento de la morfología celular**. La interacción célula-célula es importante para mantener su morfología y su cohesión en monocapa, por tanto desajustes en estos mecanismos provocan cambios celulares que pueden afectar a procesos tumorales como puede ser la metástasis (Esteban et al. 2006; Harten et al. 2009). Se ha observado que las células

de carcinoma renal que no expresan pVHL poseen una morfología fibroblástica, mientras que aquellas que si expresan pVHL salvaje muestran una morfología más redondeada formando una monocapa homogénea. Numerosos estudios han demostrado la implicación de pVHL en el mantenimiento de la citoarquitectura epitelial mediante la regulación de las uniones intercelulares y el correcto ensamblaje de las mismas (Davidowitz et al. 2001; Esteban-Barragan et al. 2002). Sin embargo, pVHL parece mediar la regulación de los diferentes componentes de las uniones intercelulares mediante mecanismos que pueden ser dependientes o no de HIF. Así se ha descrito que pVHL regula el ensamblaje de uniones adherentes, concretamente regula la expresión de la E-caderina de forma dependiente de HIF (Esteban et al. 2006; Evans et al. 2007). Por otro lado la regulación de algunos componentes de las uniones ocluyentes no es tan clara que sea totalmente dependiente de HIF. En este sentido algunos autores demuestran que pVHL regula componentes de estas uniones, como son la ocludina y la claudina de forma dependiente de HIF (Almeida et al. 2010). Por otro lado, estudios en nuestro laboratorio demuestran que otros componentes que son importantes para el mantenimiento de las uniones ocluyentes, como son la beta-catenina y miembros de la familia de proteínas de *zonula ocludens*, entre ellos ZO-1, son regulados por pVHL de forma independiente de HIF (Calzada et al. 2006). Además de estos mecanismos mencionados, estudios previos demuestran que hay un nexo entre pVHL y dos funciones celulares que podrían explicar las alteraciones en la polaridad y en la arquitectura celular cuando VHL está ausente. Estas funciones son por un lado la regulación de la **estabilidad de los microtúbulos** (Hergovich et al. 2003; Lolkema et al. 2004) y la **regulación** de algunas proteínas de la **familia** de las **proteínas quinasa tipo C atípicas**. Estas proteínas controlan la polaridad y las

interacciones intercelulares mediante la regulación de proteínas de citoesqueleto (Etienne-Manneville and Hall 2002; Fukata et al. 2003). Una función relacionada con la estabilidad de los microtúbulos en la que también está implicada pVHL es el mantenimiento del cilio primario, estructura especializada en desencadenar la señalización dependiente de calcio en respuesta al flujo de orina, que a su vez afecta a la citoarquitectura y proliferación celular del epitelio renal. Además de regular las uniones intercelulares, pVHL puede inhibir **crecimiento tumoral** mediante la regulación del **ensamblaje de la matriz extracelular** y la interacción célula-matriz (Feijoo-Cuaresma et al. 2008; Lieubeau-Teillet et al. 1998; Ohh et al. 1998). Por otro lado, la estabilización de la matriz extracelular disminuye la liberación del factor de crecimiento de endotelio vascular VEGF por la matriz, afectándose por tanto el crecimiento tumoral (Kurban et al. 2006).

Otro aspecto importante en cuanto al papel de pVHL en la diferenciación celular es su implicación en el **mantenimiento y función del túbulo proximal** (Davidowitz et al. 2001). En ausencia de pVHL, la estabilización de HIF no es el único mecanismo que induce crecimiento tumoral, la presencia de microvellosidades en la superficie celular también es un marcador de diferenciación celular en el túbulo proximal (Lieubeau-Teillet et al. 1998). Recientemente también se ha descrito la implicación de VHL en la **regulación de la energía y homeostasis** durante la progresión tumoral. Este proceso está mediado por la inducción del neuropéptido NMU (Neuromedium U), de manera HIF-dependiente. En ausencia de VHL o en hipoxia se induce NMU promoviendo la progresión de los tumores renales {Harten SK, 2011 #552}. Otro mecanismo mediante el cual pVHL regula el crecimiento y progresión tumoral es mediante la regulación de proteasas de matriz,

como es el caso de las metaloproteasas (MMPs) y de sus inhibidores. Concretamente se ha descrito que inhibe la expresión de MMP2 y MMP9. Por el contrario induce la expresión de inhibidores de MMPs como TIMP-1 y TIMP-2, (Koochekpour et al. 1999). En su conjunto, todos estos procesos en los cuales se ha visto implicada pVHL son importantes para su función como gen supresor de tumores.

3. EL FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA HIF: REGULACIÓN DE HIF POR pVHL Y PHDs

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, la regulación de HIF por parte de pVHL es la función más conocida de esta proteína. En 1995, la búsqueda del factor de transcripción responsable de la inducción del gen de la eritropoyetina en situaciones de hipoxia llevó al descubrimiento del factor de transcripción inducible en hipoxia (HIF) (Wang et al. 1995). Estos factores de transcripción pertenecen a la familia de factores de transcripción bHLH PAS, por presentar en su región N-terminal un dominio bHLH (de *basic helix loop helix*) y otro de tipo PAS (de homología con los factores Per, ARNT y SIM) (Wang and Semenza 1993). Estos dominios están implicados tanto en la heterodimerización entre los miembros de la familia, como en la unión al ADN (Jiang et al. 1996). Los factores HIF forman heterodímeros con una subunidad α y una β . Hasta la fecha se han descrito tres isoformas diferentes, HIF-1 α o MOP1, HIF-2 α , también conocida como EPAS o MOP2 y HIF3 α . La subunidad HIF-3 α es de la que menos se conoce, pero se sabe que existen varias isoformas generadas por procesamiento alternativo. Algunas de estas isoformas comparten los dominios regulados por el oxígeno con HIF-1 α y HIF-2 α , pero otras carecen de

los dominios de transactivación. Una de estas se ha denominado IPAS, y funciona como dominante negativo natural de HIF-1 α en el epitelio corneal, al dimerizar con HIF-1 α e impedir la formación de heterodímeros funcionales α/β (Makino et al. 2001). La subunidad β , también conocida como ARNT (de *Aryl hydrocarbon receptor (Ahr) nuclear translocator*) se expresa de manera constitutiva y sólo presenta un dominio de transactivación (TAD) en su extremo c-terminal (Huang et al. 1996). La subunidad α sin embargo se regula de manera dependiente de oxígeno o de la presencia o no de pVHL. Así, en presencia de oxígeno, la subunidad α de HIF es hidroxilada por la acción de las prolihidroxilasas (PHDs). Estas enzimas pertenecen a una familia de dioxigenasas cuya actividad es dependiente de 2-oxoglutarato, Fe²⁺ y oxígeno, de ahí que hayan sido consideradas por muchos como los sensores del oxígeno (Bruick and McKnight 2001; Epstein et al. 2001). En mamíferos se han identificado tres isoformas distintas, PHD1, PHD2 y PHD3 (Epstein et al. 2001) que reconocen prolina en un contexto que incluye una secuencia muy conservada, LXXLAP (Landázuri et al. 2006). Estas proteínas hidroxilan 2 residuos de prolina que se encuentran en las posiciones 402 y 564 en HIF-1 α y, 405 y 531 en HIF-2 α (Jaakkola et al. 2001; Masson et al. 2001). Una vez que la subunidad α es hidroxilada, HIF es reconocido por la subunidad β de pVHL (Sufan RI 2004), uniéndose a HIF- α entre los aminoácidos 91 y 113 (Richard S 2012). Posteriormente se lleva a cabo una poliubiquitinación del mismo, marcando así la proteína para su degradación por la subunidad 26S del proteosoma (Cockman et al. 2000). En condiciones de hipoxia (bajos niveles de oxígeno) las PHDs se inactivan, no pudiendo hidroxilar HIF- α , lo cual impide la unión de VHL y, por tanto, su degradación. Cuando esto sucede, la subunidad α de HIF se estabiliza, se une a la subunidad β

y se traslocan al núcleo, donde se unirán a secuencias específicas del ADN denominadas “elementos de respuesta a hipoxia” (HRE), que se encuentran en el ADN de los genes diana de HIF, favoreciéndose así su transcripción. Dentro de los genes diana de HIF se encuentran genes implicados en la angiogénesis, metabolismo energético, apoptosis, migración, proliferación, metástasis, eritropoyesis, ciclo celular y diferenciación celular entre otros (revisado por (Calzada y del Peso 2007; Wenger 2002) (Figura 4). Aunque la principal vía de degradación de la subunidad α de HIF es la descrita anteriormente, hay evidencias que ponen de manifiesto la existencia de otras vías de degradación independientes del eje pVHL-proteosoma {Olmos G, 2009 #554}.

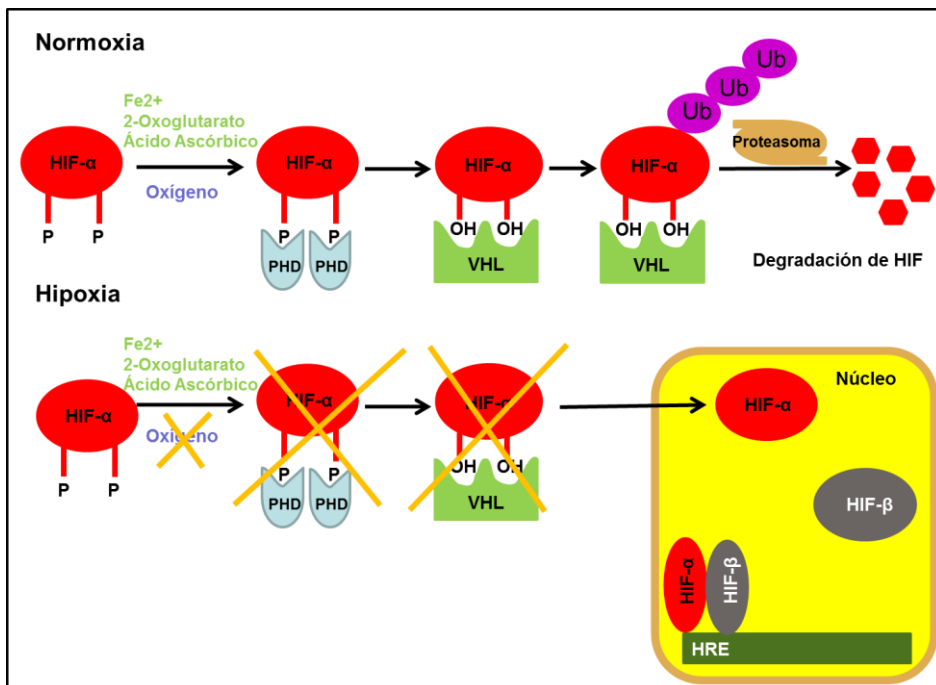


Figura 3. Regulación de la subunidad α de HIF por pVHL y las PHDs. En condiciones de normoxia la subunidad alfa de HIF es hidroxilada por las PHDs, favoreciendo el reconocimiento de HIF por parte de pVHL, esta promueve la poliubiquitinación de la misma marcándola para su posterior degradación por la vía del

proteasoma. Sin embargo, bajo condiciones de hipoxia, las PHDs se encuentran inactivadas, no pudiendo hidroxilar HIF y bloqueando así la unión de pVHL y su degradación por el proteosoma. En este caso, la subunidad α estabilizada se une con la subunidad β , formando un heterodímero capaz de unirse a los sitios HRE en el ADN de los genes diana, induciendo la transcripción de los mismos.

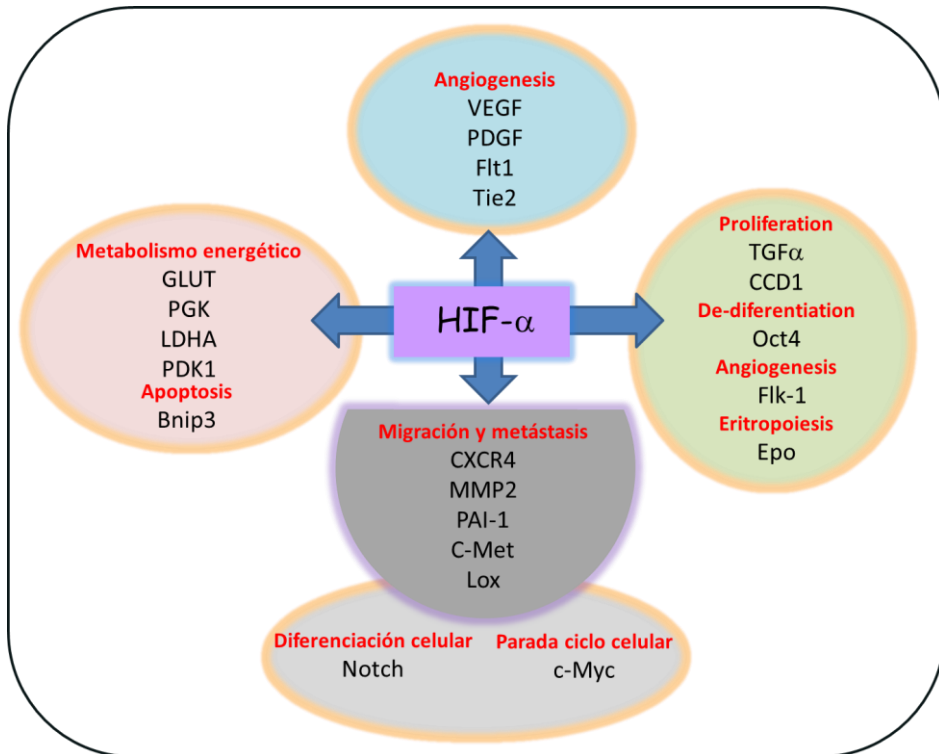


Figura 4. Diagrama de los genes diana de HIF. HIF se une a los sitios HRE en el ADN de genes implicados en la angiogénesis, metabolismo energético, proliferación, migración y metástasis, y ciclo celular.

Por tanto la expresión o no de pVHL es importante para que se dé la regulación de genes dependientes de HIF, aunque pVHL también regula genes de forma independiente de HIF, como hemos visto en apartados anteriores 2.3 “Funciones de VHL”. En su conjunto, todas estas funciones de pVHL, tanto las dependientes de HIF, como aquellas que son independientes de estos factores, contribuyen a controlar el

crecimiento tumoral y la progresión de la enfermedad en pacientes con von Hippel-Lindau. De todas las patologías mencionadas en pacientes con esta enfermedad, es el carcinoma renal de célula clara el que más muertes produce entre los pacientes con la enfermedad de von Hippel-Lindau. Es por ello por lo que ha suscitado mayor atención y gran parte de los estudios se han centrado en esclarecer las funciones de pVHL en este tipo de tumores.

4. CARCINOMA RENAL DE CÉLULA CLARA

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, los carcinomas renales (RCC) son una de las mayores complicaciones del síndrome de von Hippel-Lindau además de ser una de las principales, puesto que el 75% de los pacientes con dicho síndrome presentan RCC. La mayoría de los cánceres de riñón son tumores epiteliales, de los cuales predominan los carcinomas renales (Sufan RI 2004). De estos carcinomas renales el 75-88% son carcinomas renales de célula clara (ccRCC) (Linehan WM 2003) y en el artículo publicado por Cohen RJ y colaboradores en <http://emedicine.medscape.com/article/1612043-overview>. El mayor número de casos de carcinoma renal de célula clara se ha detectado en el norte de Europa y norte de América, encontrándose la tasa menor en Asia y África. Existe una mayor prevalencia en hombres que en mujeres (con ratios entre 1,5: 1 y 2:1). Por otro lado, los individuos de raza negra son más propensos a desarrollar este tipo de cánceres que los de raza blanca y los que viven en áreas urbanas más que los que viven en zonas rurales. La edad media a la que se detecta los carcinomas renales de célula clara es entre los 60 y los 64 años. Sólo el 7% de los carcinomas renales de célula clara esporádicos se detecta en pacientes menores de 40

años (en el artículo publicado por Cohen RJ y colaboradores en <http://emedicine.medscape.com/article/1612043-overview> ;Grignon DJ 2005).

Los ccRCC a **nivel microscópico** se caracteriza por la presencia de acúmulos de glucógeno, fosfolípidos y lípidos neutros como es el colesterol éster (Gebhard RL 1987), poseen una membrana plasmática bien definida, un estroma altamente vascularizado y pueden aparecer células con citoplasma granular eosinofílico (Patard JJ 2009). La cantidad de estas células es variable, aunque rara vez llegan a ser el tipo celular predominante (Grignon DJ 2005).

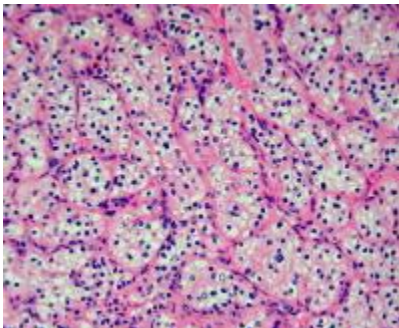


Figura 5. Imagen a nivel microscópico del células de carcinoma renal de célula clara (modificada del artículo publicado por Cohen RJ y colaboradores en Mescape Reference <http://emedicine.medscape.com/article/1612043-overview>)

A **nivel macroscópico** son masas tumorales bien delimitadas por una cápsula o pseudocápsula. En un corte del tumor se observa coloración dorada, debido al acúmulo de lípidos en las células malignas, zonas hemorrágicas, fibrosis, áreas necróticas y degeneración cística (Grignon DJ 2005).



Figura 6. Imagen macroscópica de un carcinoma renal de célula clara en el que se observa una masa dorada (debido al acúmulo de lípidos), zonas hemorrágicas y necróticas. (Imagen modificada del

artículo publicado por Cohen y colaboradores en 2011 en medscape <http://emedicine.medscape.com/article/1612043-overview>)

A **nivel genético** se caracteriza por la pérdida cromosómica, siendo el más común (80-90% de los casos) la pérdida del brazo corto del cromosoma 3 (Höglund M 2004), como ocurre en el Síndrome de von Hippel-Lindau. A parte de dicho síndrome existen otros factores de riesgo internos que pueden dar lugar a ccRCC como son alteraciones familiares debido a translocaciones entre el cromosoma 3 y los cromosomas 6, 8 y 11 (Foster RE 2007; Sufan RI 2004). En otros casos, aparece lo que se conoce como carcinoma renal de célula clara familiar no sindrómica, en los que aparecen los marcadores de tumores hereditarios como son la multifocalidad, bilateralidad y aparición a una edad temprana, pero no se han descrito causas genéticas previas. También existen factores externos como son el tabaco, la obesidad y la hipertensión (Grignon DJ 2005).

El tratamiento principal de estos ccRCC es la nefrectomía, aumentando la supervivencia del paciente sin recaídas. Sin embargo, en los casos en los que existe metástasis el pronóstico y tratamiento es peor, ya que son carcinomas bastante resistentes a quimioterapia y la inmunoterapia con interleuquina 2 (IL-2) e interferón alfa (IFN- α) ha

dado también resultados poco efectivos (Clark 2009). Además son tumores altamente vascularizados con expresión elevada de factores proangiogénicos. Esto está provocado tanto por la pérdida de pVHL como por la presencia de focos hipóxicos que se generan en los ccRCC por ser tumores sólidos. Ambas situaciones producen una acumulación de HIF, como se ha explicado en el apartado de “Funciones de pVHL”, lo que favorece un incremento de la transcripción de sus genes diana entre los que se encuentra VEGF. Por tanto, otro abordaje terapéutico utilizado en estos tumores es la inhibición de la angiogénesis. Para ello se han utilizado anticuerpos bloqueantes de VEGF (Bevacizumab) o también inhibidores de las vías de señalización de RAF-MEK-ERK y PI3K-Akt-mTOR (Sunitinib y Sorafenib), que se encuentran en la cascada de señalización activadas tras la unión de VEGF a su receptor, o inhibiendo directamente mTOR (Temsitrolimus y Everolimus), puesto que la activación de mTOR a su vez produce un aumento de HIF (Clark 2009). Sin embargo, aunque estas terapias han probado eficacia antitumoral, en algunos casos los efectos secundarios contrarrestan su efectividad. Además, aunque el aumento de la expresión de factores angiogénicos como es VEGF es un mecanismo propuesto para la explicación de esta alta vascularización, esta inducción no parece ser suficiente para producir el crecimiento de los tumores, debiendo existir otros mecanismos adicionales. Con respecto a esto se han descrito funciones de pVHL independientes de HIF necesarias para el crecimiento tumoral (revisado por (Calzada 2010)), en concreto la regulación de la homeostasis de la matriz extracelular por parte de pVHL se ha demostrado que juega un papel importante en la progresión tumoral (Kurban et al. 2006). Por otro lado, la disminución de aquellos factores anti-angiogénicos sería una parte importante del programa de desarrollo tumoral, aunque poco hay descrito sobre su papel en el

crecimiento tumoral. En este sentido se ha descrito una relación inversa entre la proteína de matriz extracelular y factor anti-angiogénico trombospondina 1 (TSP-1) y la progresión tumoral de los ccRCC (Zubac et al. 2009), con una mayor secreción de TSP-1 en células de riñón sanas en comparación con las células de carcinoma renal (Veliceasa et al. 2007). Además, también se ha observado una reducción de esta proteína en células endoteliales derivadas de tumor en comparación con células endoteliales sanas (Bussolati et al. 2006). Por todo esto sería interesante estudiar la regulación de la TSP-1 en los ccRCC, ya que un mayor conocimiento de la biología de estos tumores puede ayudar a un diagnóstico precoz y a un tratamiento más efectivo.

5. TROMBOSPONDINA-1

Las Trombospondinas son una familia de glicoproteínas extracelulares altamente conservadas, oligoméricas y con múltiples dominios (Adams JC 2011), cuya principal característica se encuentra en los 650 aminoácidos del extremo C-terminal, puesto que es la región más conservada y consta de las repeticiones tipo 2 o tipo EGF, las repeticiones tipo 3 o dominio de unión a calcio y el extremo carboxi-terminal (Adams and Lawler 2004) y es lo que se ha denominado “dominio de identidad”, del que más tarde hablaremos (Adams JC 2011). Esta familia está formada por 5 miembros que se subdividen en 2 subgrupos según el estado de oligomerización y la estructura molecular (Adams J 1993):

- Subclase A: TSP-1 y TSP-2. Forman trímeros (Adams 2001).
Otra característica de este grupo es la existencia de

repeticiones tipo 1 o dominios tipo properdina en su estructura (Adams and Lawler 2004)

- Subclase B: TSP-3, TSP-4 y TSP-5 o COMP. Las trombosponidnas de este subgrupo forman pentámeros (Adams 2001). Una característica de este subgrupo es la presencia de un canal hidrófobo, formado por el ensamblaje de los dominios de unión, cuya estructura es similar a los canales de iones. Además se ha visto que se puede unir a vitamina D y al ácido retinoico todo-trans (Adams and Lawler 2004).

La trombospondina-1 (TSP-1) es una glicoproteína homotrimérica de 450 KDa (Bornstein 1992), que se encuentra en la matriz extracelular y está implicada en una gran variedad de procesos fisiológicos como son proliferación celular, diferenciación, adhesión celular, angiogénesis, interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Fue descrita por primera vez en 1971 por Baenziger y colaboradores (Baenziger NL 1971) con el nombre “Proteína sensible a trombina” (Thrombin-sensitive protein), puesto que era liberada por la plaquetas cuando éstas eran estimuladas por trombina (Baenziger NL 1971, 1972). La TSP-1 fue el primer factor anti-angiogénico descrito (Good et al. 1990).

La TSP-1 se expresa durante el desarrollo de tejidos y órganos (Adams y Lawler 2004). Su expresión se encuentra alterada en patologías como en los fibroblastos del estroma y células endoteliales de tumores, en los que se observa un aumento de la misma. La importancia de la TSP-1 se pone de manifiesto en los ratones que se han modificado genéticamente para que no expresen dicha proteína, siendo Lawler y colaboradores en 1998 los primeros que consiguieron un ratón de estas

características (Lawler J 1998). Desde ese momento no han dejado de estudiarse las consecuencias que tiene la no expresión de TSP-1 en las células, entre las que se pueden destacar:

- *Disminución de la viabilidad embrionaria
- *Lordosis espinal
- *Neumonía a partir del primer mes de nacimiento
- *Reducción de la activación del TGF- β en pulmón y páncreas
- *Disminución de la supervivencia y aumento de osteosarcoma en ratones que no expresan p53
- *Retraso en la curación de heridas cutáneas
- *Aumento de la densidad vascular durante el desarrollo de la retina
- *Reducción de la inflamación y proteinuria en glomerulonefritis experimental
- *Aumento de la respuesta inflamatoria y de la granulación en tejido miocárdico infartado
- *Disminución de la adhesión de las plaquetas a la pared vascular y formación de trombos en daño endotelial
- *Disminución de la activación de células de músculo liso y formación de la capa neoíntima tras la ligación de la arteria carotídea
- *Reducción de la activación de TGF- β en el glomérulo tras nefropatía diabética experimental
- *Aumento de la supervivencia celular tras daño isquémico
- *Disminución de la susceptibilidad al daño isquémico asociado a la edad
- *Resistencia de tejidos blandos al daño por radiación
- *Aumento de la susceptibilidad y respuesta angiogénica tras enfermedad inflamatoria intestinal experimental
- *Aceleración de la maduración de la placa aterosclerótica en ratones

que no expresan ApoE

*Aumento de la capilaridad y capacidad de ejercicio en músculo esquelético y cardiaco

5.1 Estructura de la proteína

La trombospondina 1 también conocida como TSP-1 o THBS, en humanos se encuentra codificada por el gen *thbs1* que se encuentra en el cromosoma 15q15 (Jaffe E 1990). El gen de la TSP-1 consta de 22 exones de los cuales el primero, que corresponde al extremo 5'UTR, no se traduce y el segundo, en el que se encuentra el principio de la traducción, se traduce parcialmente. El gen posee un único marco de lectura que codifica 1170 aminoácidos, incluido el péptido señal de 18 aminoácidos. Los exones 3 y 4 codifican para el dominio de unión a heparina. El exón 5 codifica 2 cisteínas que están implicadas en la unión entre las moléculas de TSP-1 mediante puentes disulfuro, mientras que los exones 6 y 7 corresponden al dominio de procolágeno. Las repeticiones tipo I se encuentran codificadas por los exones 8 al 10. Las repeticiones de tipo II o dominios de tipo EGF están codificados por los exones 11, 12 y 13. Los exones 14 al 18 codifican para las repeticiones tipo III o dominio de unión a calcio. El extremo C-terminal se encuentra codificado por los exones 19, 20 y 21. Por último el extremo 3'UTR es codificado por el exón 22 (Bornstein 1992).

Entrando un poco más en detalle en la estructura de la TSP-1, el **extremo N-terminal** posee una estructura en β -sandwich que se compone de 13 estructuras β antiparalelas, 1 segmento “strandlike” y 6 α -hélices, de las cuales la $\alpha 3$ es la más larga y cruza por encima de las 2

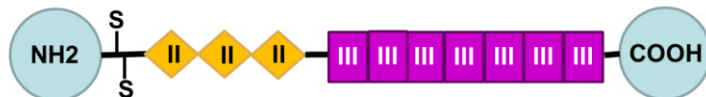
láminas β . Existe una α hélice adicional localizada en el extremo C-terminal del dominio N-terminal. Esta hélice en la posición 214 contiene la cisteína 214 (Cys214) que se une con la cisteína en la posición 153 (Cys153) localizada en el bucle de las estructuras β 11 y β 12, lo que favorece que el extremo C-terminal del dominio se encuentre más próximo al resto del dominio. El **dominio de oligomerización** se encuentra a continuación del extremo N-terminal. Aunque este dominio se encuentra presente en las 5 TSPs, difiere entre las que se clasifican en el grupo A (oligomerizan formando trímeros) de las del grupo B (oligomerizan formando pentámeros). En esta introducción nos vamos a centrar en las primeras, concretamente en la TSP-1, dado que es el único miembro de esta familia que se ha relacionado con los carcinomas renales. Cada una de las cadenas que forman el trímero de la TSP-1 posee 2 cisteínas, que aunque no son esenciales para formar el trímero, se sabe que estabilizan los puentes disulfuro entre las cadenas. Además de los puentes disulfuro, existen otros tipos de uniones entre las cadenas que también tienen lugar en este dominio, como son los puentes de hidrógeno entre la amida de las cisteína 7 y el grupo carboxilo de la cisteína 5, entre la serina 9 y el ácido glutámico 6, formando puentes de hidrógeno. Todo esto da lugar a un core o núcleo hidrofóbico. Localizado en el extremo C-terminal de este dominio se encuentra el **dominio de procolágeno fibrilar N-terminal**, también conocido como dominio von Willebrand tipo C o repetición rica en cisteínas de tipo cordina, puesto que posee 10 residuos de dicho aminoácido. Es una secuencia poco conservada, excepto la secuencia CXXCXC y CCXXC que se encuentran empezando en la segunda cisteína y en la octava cisteína, respectivamente. Es un módulo glicosilado en el que todas las cisteínas están implicadas en puentes disulfuro que estabilizan la proteína. Este dominio está implicado además en la actividad anti-

angiogénica de la TSP-1. A continuación se encuentran las **repeticiones tipo I, TSR o repeticiones tipo properdina**. Es importante anotar que las trombospondinas que se encuentran en el grupo B (TSP-3, TSP-4 y TSP-5) no poseen este dominio y las del grupo A (TSP-1 y TSP-2) poseen 3 repeticiones de este tipo. Tiene una longitud de 60 aminoácidos aproximadamente, entre los que se encuentran 12 residuos conservados que contienen 6 cisteínas, 2 residuos conservados de arginina, 3 residuos de glicina y 2 ó 3 residuos de triptófano separados por 2 ó 4 aminoácidos. Puede sufrir c-manosilaciones u o-fucosilación. La c-manosilación tiene lugar durante la traducción en la secuencia TSRWXXW y está mediado por la dolido-P-manosa. Por otro lado, la o-fucosilación es una modificación post-traducciona que se produce en la secuencia CSX(S/T)C, está mediada por la O-fucosiltransferasa 2, siendo esta última modificación crítica para la maduración y secreción de la proteína. La primera repetición del dominio tipo I tiene apariencia de rizo y contiene un residuo conservado WXXWXXW, mientras que la segunda y la tercera tienen una estructura β . Las funciones atribuidas a estas repeticiones son adhesión celular, interacción proteína-proteína y proteína-glicosaminoglicano, y las 2 segundas repeticiones están implicadas en la inhibición de la angiogénesis. Tras las repeticiones tipo I se encuentran las **repeticiones tipo II o repeticiones de tipo EGF**. Tanto las TSPs del grupo A como las del grupo B poseen repeticiones de tipo EGF. Estas repeticiones tienen la capacidad de propagar los cambios que se originan en el dominio de identidad, formado por las repeticiones de tipo EGF, las repeticiones de unión a calcio y el módulo C-terminal de tipo lectina de los que hablaremos más adelante, al resto de la proteína. Las repeticiones de los dominios de tipo EGF pueden poseer sitios de unión a calcio o no. En la TSP-1 existen secuencias consenso de unión a calcio, siendo dicha secuencia ZXZZ-C-X_{variable}-C-X_{variable}-C-X-

D/N-X₄-Y/F-X-C, donde Z puede ser aspartamo, glutamato, asparragina o glutamina. Dicha secuencia se encuentra en la segunda repetición de tipo EGF, uniéndose el calcio en la interfase entre la primera y la segunda repetición de tipo EGF y probablemente estabiliza la unión entre los módulos. A parte de las repeticiones de tipo EGF, la TSP-1 también posee 13 **repeticiones de unión a calcio**, responsables de mantener el dominio de identidad más compacto. Por último se encuentra el extremo C-terminal tipo lectina, formado por 2 láminas β y una α hélice (Carlson CB 2008).



Grupo A: TSP-1 y TSP-2



Grupo B: TSP-3, TSP-4 y TSP-5 o COMP

Figura 6. Esquema de la estructura de las TSPs. Esquema de las TSPs del grupo A, que poseen el extremo N-terminal (NH₂), el dominio de tipo pro-colágeno (PC), las repeticiones de tipo I o tipo properdina o TSR (I), las repeticiones de tipo II o de tipo EGF (II), las repeticiones de tipo III o de unión a calcio (III) y el extremo C-terminal de tipo lectina (COOH) comparadas con las que pertenecen al grupo B, que no poseen ni el dominio pro-colágeno (PC) ni las repeticiones tipo I (I). Modificado de (Bornstein 1995)

5.2 Regulación de la TSP-1

Se ha visto que la TSP-1 puede estar regulada por factores internos capaces de modular la expresión de la TSP-1 como es la concentración de glucosa. En este sentido está descrito que la hiperglicemia regula TSP-1 a nivel post-transcripcional, puesto que un aumento de glucosa produce una alteración de la cantidad de ARNm de TSP-1 que se encuentra en la fracción polisómica (Bhattacharyya et al. 2008). En células de músculo liso vascular la hiperglicemia también produce un aumento de la expresión de TSP-1 mediante mecanismos transcripcionales (Raman et al. 2007) y en células endoteliales de vasos largos procedentes de ratas diabéticas (Stenina et al. 2003). También se ha visto que genes supresores de tumores como p53, PTEN, SMAD4 mantienen niveles normales o altos de expresión de TSP-1, siendo objeto de esta tesis el estudiar el efecto de la pérdida del gen supresor de tumores pVHL sobre la regulación de la TSP-1, mientras que oncogenes como Id-1, Jun, Myc, Ras y Src reprimen la expresión de TSP-1. Las proteínas de unión a regiones AU también están implicadas en la regulación de la TSP-1, puesto que esta proteína posee 8 regiones altamente conservadas en elementos ricos en AU (AREs) en la región sin traducir 3'UTR (McGray et al. 2010). De manera que proteínas como AUF1 pueden disminuir la estabilidad del ARNm de la TSP-1 (McGray et al. 2010) y proteínas como HuR pueden aumentar su estabilidad (Mazan-Mamczarz et al. 2008). Otra molécula capaz de regular la TSP-1 son el calcio, puesto que es un elemento crítico para el correcto plegamiento y secreción de la TSP-1, de manera que una disminución en la concentración de calcio intracelular produce la retención de la TSP-1 en el retículo endoplasmático, reduciéndose así su secreción (Veliceasa et al. 2007). Por otro lado, se ha descrito que la TSP-1 también puede ser

regulada a nivel post-traducciona, regulándose la estabilidad de la proteína. En este sentido, existen diversas proteasa capaces de degradar la TSP-1 como es el caso de ADAMTS-1, que pertenece a la familia de las ADAMTS, un subgrupo de ADAM (a disintegrin and metalloproteinase). Esta molécula es capaz de romper TSP-1 entre el ácido glutámico que se encuentra en la posición 311 y la leucina en la posición 312, dando lugar a un fragmento de 36 KDa y otro de 140 KDa (según la revisión de (Iruela-Arispe 2008)) o 110 KDa (según el artículo de (Nathan V Lee 2006)), siendo la causa de estas diferencias el empleo de condiciones reductoras, en el caso del fragmento de 140 KDa o no reductoras para el de 110 KDa. El de mayor peso molecular (140 KDa) corresponde al extremo N-terminal que conserva la estructura trimérica, dejando expuestas en el extremo C-terminal (25 KDa) las repeticiones tipo I, capaces de unirse a CD36 y ejercer el efecto anti-angiogénico de la TSP-1 (Iruela-Arispe 2008). Por otro lado, se ha visto que ambos fragmentos son capaces de inhibir la proliferación inducida por VEGF y FGF-2 (Nathan V Lee 2006). Otras proteasas capaces de afectar a la integridad de la TSP-1 son la trombina, cuya acción afecta al dominio de tipo procolágeno, dando lugar a dos fragmentos, uno de 25 KDa y otro de 160 KDa, que corresponde a la región C-terminal de la estructura trimérica (Iruela-Arispe 2008). La catepsina G, que produce la ruptura en la región amino-terminal, de manera que se liberan 2 fragmentos: uno de 28 KDa, que incluye el dominio de unión a heparina, y otro de 165 KDa, que conserva la estructura trimérica. Este último fragmento es capaz de mediar la agregación plaquetaria. Las elastasas y plasminas también son capaces de degradar TSP-1 (Iruela-Arispe 2008).

Otra molécula implicada en la regulación de la TSP-1 es Akt, cuya fosforilación se ha observado que produce una disminución de la

expresión de la TSP-1 en células de piel humana y en queratinocitos (Kim MS 2006), en las células endoteliales que se encuentran formando parte del estroma de los tumores renales (Bussolati et al. 2006) y en células endoteliales de la microvasculatura (Niu et al. 2004). Sin embargo en las células mesangiales de rata (Gao L 2006), en células endoteliales procedentes de ratones Akt^{-/-} (Chen et al. 2005a) y en las células de carcinoma de tiroides folicular (Soula-Rothhut M 2005) se ha descrito una relación positiva entre la expresión de Akt y TSP-1. Por otro lado, en ratones que no expresan TSP-1 se observa una reducción en los niveles de Akt fosforilado (Sun J 2009). La expresión de TSP-1 está aumentada en respuesta al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), al factor de crecimiento epidérmico (EGF), al factor de crecimiento transformante (TGF- β) y al factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (Soula-Rothhut M 2005). Estímulos como la interleuquina-1 β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el factor de crecimiento hepático (HGF/SF), bFGF y al interferón gamma son capaces de producir una bajada en los niveles de TSP-1 (Soula-Rothhut M 2005).

También se ha visto que existen factores externos capaces de regular la TSP-1. Dentro de estos factores se encuentra la regulación de la TSP-1 es la **temperatura**, puesto que en células HeLa y H1H3T3 un choque térmico aumenta la expresión de TSP-1 mediante el incremento de la estabilidad del ARNm de TSP-1, siendo la región entre los residuos 968 y 1258 en el codón de terminación de la región 3'UTR del ARNm de la TSP-1 (Kang JH 2006). Otra condición externa que puede afectar es la **concentración de oxígeno**, observándose un aumento de esta proteína en células endoteliales (Faller 1999 ,Phelan et al. 1998), en células de músculo liso vascular (Osada-Oka et al. 2008), en fibroblastos

tanto sanos como aquellos procedentes de pacientes con esclerosis sistémica (Distler et al. 2007) cuando son sometidas a condiciones de hipoxia, produciéndose un aumento de los niveles de ARN mensajero (ARNm), por mecanismos post-transcripcional. Sin embargo se produce una disminución del ARNm de TSP-1 en células de glioblastoma humano cuando éstas son sometidas a anoxia (Tenan et al. 2000) y en fibroblastos de ratón embrionarios cuando son sometidos a hipoxia (Laderoute et al. 2000). Por tanto, los mecanismos por los cuales la TSP-1 está regulada por la hipoxia parecen ser dependientes del tipo celular. Es por tanto, objeto de esta tesis el estudio del mecanismo por el cual la hipoxia regula la TSP-1 en líneas celulares de ccRCC, siendo éste un tema que se abordará en esta memoria de Tesis Doctoral.

5.3 Implicaciones de la TSP-1 en cáncer

La función de la TSP-1 en tumores es compleja y existe gran controversia puesto que se han descrito tanto efectos estimulatorios como inhibitorios (Soula-Rothhut M 2005). Así en ccRCC se ha visto que la presencia de TSP-1 disminuye la progresión tumoral (Zubac et al. 2009) y por el contrario en células de carcinoma tiroideo aumenta la agresividad del tumor, ya que aumenta la capacidad de invasión de estas células (Sid B 2008).

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, TSP-1 es un potente agente anti-angiogénico, ya que favorece la apoptosis de las células endoteliales y regula el número de precursores endoteliales circulantes. Aunque esta molécula también es capaz de modular el comportamiento tumoral mediante la regulación de otras funciones

celulares como son la **migración** y la **invasión**, no sólo aumentando ésta última en células de carcinoma tiroideo como se ha comentado en el párrafo anterior (Sid B 2008; Nucera C 2010), sino también en células de adenocarcinoma de mama a través del aumento de la expresión de TIMP-1 (inhibidor tisular de las metaloproteinasas 1) (John et al. 2009), en células de carcinoma oral escamoso y tumores de células epiteliales de la glándula salivar la TSP-1 también estimula la migración (Motegi K 2008). Estos resultados se correlacionan con algunos datos in vivo obtenidos en tumores mamarios procedentes de ratones que no expresan la TSP-1 (TSP-1 $-/-$) comparados con aquellos que sí la expresan (TSP-1 $+/+$), apareciendo un menor número de metástasis en TSP-1 $-/-$ que en TSP $+/+$ (Yee et al. 2009). Por el contrario cuando se sobreexpresa la TSP-1 en NIH3T3 (fibroblastos activados) se disminuye la invasión hacia las células tumorales (Wu MP 2008), lo mismo se observa en células de meduloblastoma en los que se expresa TSP-1 de manera ectópica (Zhou L 2010). Estos datos ponen de manifiesto que la función de TSP-1 en los tumores es dependiente del tipo celular.

La TSP-1 también es capaz de regular la progresión tumoral actuando sobre la **respuesta inmune**, puesto que es capaz de aumentar el reclutamiento de macrófagos M1 en la zona tumoral (Martin-Manso et al. 2008) y la regulación del **flujo sanguíneo** mediante el bloqueo de la vía del óxido nítrico (NO), produciendo una contracción de las células endoteliales (Isenberg et al. 2008). Con respecto al **crecimiento tumoral**, se ha visto que en células de meduloblastoma la expresión ectópica de TSP-1 disminuye el crecimiento de colonia en soft agar (Zhou L 2010), sin embargo en cáncer papilar tiroideo se ha observado que TSP-1 regula de manera positiva proliferación, adhesión (Nucera C 2010).

A parte de estas funciones, la TSP-1 puede tener otras como son agregante plaquetario, diferenciación, organización del citoesqueleto y crecimiento de neuritas. Esta molécula es capaz de regular todas estas funciones no sólo debido a la gran variedad de receptores a los que se une, sino también porque estos receptores se expresan en múltiples tipos celulares, como por ejemplo células tumorales, células endoteliales, células del estroma o células del sistema inmune, influenciando de esta manera el comportamiento de cada tipo celular (Roberts 1996). Dada esta variedad de respuestas dependiendo del tipo celular, sería muy interesante estudiar la implicación de la TSP-1 en las ccRCC.

5.4 Moléculas a través de las cuales TSP-1 ejerce sus funciones

La TSP-1 es capaz de unirse al **factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)** a través de las repeticiones tipo I o TSR. Las secuencias de la TSP-1 implicadas en la unión y activación del TGF- β son WSXWSPW y KRFK, respectivamente. Las secuencias de unión se encuentran en todos los TSR, sin embargo la secuencia de activación se encuentra en el comienzo del segundo TSR (Yee KO 2004). En un primer momento la secuencia WSXWSPW de la TSP-1 se une a la secuencia VLAL del TGF- β . Esta unión permite que la secuencia KRFK interactúe con la secuencia LSKL del TGF- β , lo que produce un cambio conformacional en dicha molécula, de manera que favorece la unión del TGF- β a su receptor, ejerciendo así su efecto (Kazerounian S 2008). La activación de TGF- β produce una inhibición de la proliferación y migración en células endoteliales, un aumento de la síntesis y deposición

de componentes de matriz extracelular (fibronectina, colágeno y TSP-1) y la inducción de apoptosis en células endoteliales (Yee KO 2004). A través de sus repeticiones tipo 1 o dominios tipo properdina TSP-1 se une a **CD36**, induciendo la fosforilación de Fyn y la actividad de p38, lo que a su vez produce un aumento de la apoptosis en células endoteliales (Jimenez et al. 2000). Otro mecanismo propuesto para la regulación de la apoptosis es induciendo la interacción de CD36 a fyn, disminuyendo la fosforilación de Akt y, por tanto, produce apoptosis (Sun J 2009). La TSP-1 es capaz de inhibir la angiogénesis mediante su unión directa a **VEGF** a través de las repeticiones tipo 1 y 3 (Kazerounian S 2008), o de manera indirecta compitiendo con VEGF por su unión a **heparan sulfato** a través del dominio de unión a heparina (Gupta K 1999). En 2007, el grupo de Petrik J, demostró que en el ovario de ratón la unión directa de la TSP-1 a VEGF producía una disminución de los niveles de la TSP-1 debido a la internalización del complejo a través de LRP-1 (Greenaway J 2007). A pesar de que la TSP-1 se ha descrito como un potente inhibidor de la angiogénesis, principalmente mediante la inducción de la apoptosis, algunos estudios demuestran que la TSP-1 también puede tener efectos pro-angiogénicos, como se ha visto mediante la interacción de su extremo N-terminal con las integrinas **$\alpha 3\beta 1$** (Chandrasekaran et al. 2000) y con la integrina **$\alpha 4\beta 1$** {Calzada, 2004 #174}. En el caso de la integrina $\alpha 3\beta 1$ se ha observado que su actuación está regulada por moléculas como CD98, VE-Caderina, el receptor del factor de crecimiento-1 tipo insulina (IGFR) (en carcinoma de mama) y EGF (carcinoma de pulmón), de manera que a mayor confluencia las moléculas como VE-Caderina, IGFR o EGF están activadas, lo que produce una disminución de la activación de $\alpha 3\beta 1$ y, por tanto, del reconocimiento de ésta por parte de TSP-1 (Chandrasekaran et al. 2000). Esta integrina favorece el anclaje de las

células endoteliales y la quimiotaxis de las células endoteliales hacia TSP- y TSP-2, aumentando por tanto, la motilidad celular y la proliferación (Chandrasekaran et al. 2000). Mientras que la integrina $\alpha 4\beta 1$ media la adhesión de las células endoteliales a la TSP-1 en la macrovasculatura {Calzada, 2004 #174}, otra integrina, la $\alpha 6\beta 1$ media dicho efecto en las células endoteliales de la microvasculatura, siendo fundamental para esta acción el ácido glutámico que se encuentra en la posición 90 (Glu90) del extremo N-terminal de la TSP-1 {Calzada, 2003 #175}.

Como ya se comentó en el apartado anterior, TSP-1 regula el flujo sanguíneo mediante la unión a CD47 o IAP (proteína asociada a integrinas) a través de su extremo C-terminal (revisado en (Roberts DD 2012), bloqueando la vía del óxido nítrico. Se ha visto que a concentraciones fisiológicas (picomolar), la unión de TSP-1 a CD47 es capaz de inhibir la señalización de VEGF mediante la inhibición de la ruta del óxido nítrico (NO).

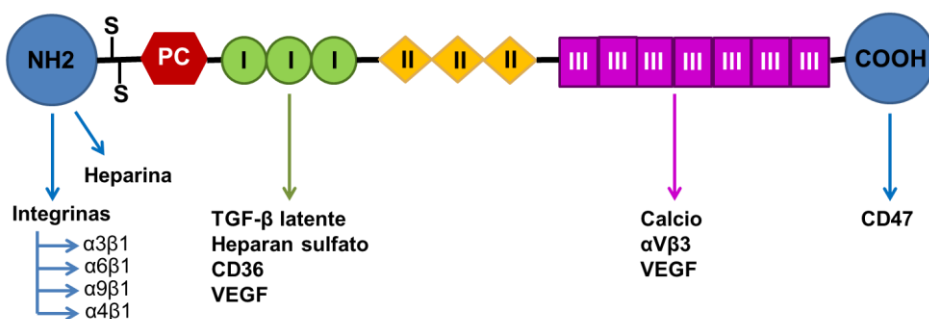


Figura 7. Esquema de la unión de la TSP-1 a distintas moléculas. Se representa los distintos dominios de la TSP-1 y su correspondencia funcional mediante su unión a diferentes moléculas y receptores.

Como ya se ha descrito anteriormente, la TSP-1 es importante para mantener la angiostasis del riñón y su pérdida está relacionada con el fenotipo angiogénico de los carcinomas renales de célula clara, pero poco hay descrito sobre su regulación por dos de las características más importantes de estos carcinomas, la pérdida de VHL y la hipoxia. En esta tesis se ha visto que tanto la hipoxia como la pérdida de VHL disminuyen la expresión de TSP-1 a nivel de proteína, pero no de ARN mensajero, siendo esta regulación un proceso multifactorial. Además, dicha bajada afecta a la capacidad migratoria e invasiva de las células.

OBJETIVOS

Los carcinomas renales son tumores altamente vascularizados debido en parte a la pérdida de la expresión de pVHL y en parte a los focos hipóxicos que se producen como consecuencia de un aporte sanguíneo inadecuado. Como resultado de esta vascularización irregular, estos carcinomas son resistentes a la quimioterapia y, aunque cada vez los tratamientos son más efectivos aún queda mucho por avanzar en este terreno. Esto, junto con que los pacientes son diagnosticados en estadíos tardíos hace necesario un mayor estudio de la biología de estos tumores, para favorecer avances en la terapéutica o en el diagnóstico precoz. Tanto la hipoxia como la ausencia de pVHL producen un aumento de la familia de factores de transcripción HIF, que a su vez, favorecen la transcripción de sus genes diana entre los que se encuentran aquellos que favorecen la angiogénesis, como VEGF. En la literatura podemos encontrar un gran número de estudios sobre estos factores, aunque también se ha observado que el aumento de VEGF por sí solo no es suficiente para favorecer el crecimiento del tumor, sino que otros factores como el mantenimiento de la homeostasis de la matriz extracelular puede jugar también un papel importante en el desarrollo tumoral. Dada la importancia de factores angiogénicos y de la matriz extracelular nuestra hipótesis es que además del aumento de factores proangiogénicos en estos tumores, es posible que también se produzca una disminución de aquellos factores que inhiben la angiogénesis. En esta tesis doctoral hemos centrado nuestro interés en la proteína de matriz con función anti-angiogénica trombospondina-1 (TSP-1), estudiando su regulación y función en diferentes líneas de carcinoma renal de célula clara. Para ello se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- 1. Caracterización de la regulación de la TSP-1 por pVHL en líneas de carcinoma renal de célula clara (ccRCC).**
- 2. Caracterización de la regulación de la TSP-1 por la hipoxia en ccRCC.**
- 3. Estudio de la función de la TSP-1 en la biología de estos tumores.**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

Se utilizaron varias líneas celulares de carcinoma renal de célula clara deficientes en la expresión de la proteína supresora de tumores pVHL. La línea 786-O se obtuvo de la American Type Culture Collection (Rockville, MD, EEUU); las RCC4 fueron cedidas por el laboratorio del Dr. Michael Ohh (Universidad de Toronto, Canadá). Estas células poseen mutaciones en *vhl*, de manera que las 786-O no expresan ninguna de las isoformas de pVHL, mientras que las RCC4 expresan la subunidad de 19 kDa con la mutación S65W, afectando ésta a su función. Estas líneas se utilizaron para generar revertientes que expresaban pVHL de forma estable. Mediante transducción lentiviral se les introdujo pVHL salvaje (786-O-VHL, RCC4-VHL) o el vector vacío solo (786-O, RCC4). Además se usaron clones de la línea 786-O que expresaban de forma estable mutantes de pVHL, entre ellos el mutante en la subunidad alfa (VHL-L188V) y un mutante de la subunidad beta (VHL-Y112H), donados por el Dr. Michael Ohh (Universidad de Toronto, Canada). En el laboratorio se generaron, mediante transducción retroviral las construcciones que expresaban formas mutadas de la proteína HIF2 α sobre la base genética de 786-O-VHL. Estos mutantes incluían mutaciones en las dos prolinas susceptibles de hidroxilación por las PHDs (HIF-2 α P405; P531A o HIF-2 α PP), no pudiendo ser hidroxilados por las PHDs y por tanto no siendo reconocidos por el complejo VHL-E3 ubiquitin ligasa siendo así resistentes a degradación por el proteosoma. Además se generaron clones estables que incluían una mutación adicional en la región de unión al ADN (HIF-2 α P405; P531A; bHLH o HIF-2 α bHLH). Estos mutantes a pesar de ser resistentes a degradación, no tenían actividad transcripcional y por tanto se impedía la inducción de sus genes diana. Todas las células se

cultivaron en RPMI 1640 con GLUTAMAX-I (Invitrogen, San Diego, CA), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 unidades/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin, 1mg/ml de Neomicina (G418) y mantenidas a 37°C en presencia de 5% de CO_2 y 21% O_2 (normoxia).

Los experimentos realizados en condiciones de hipoxia (al 1% o al 0,1% O_2) se realizaron en una cámara de hipoxia (modelo Invivo 400 hypoxia Workstation, Ruskin Technology, West Yorkshire, Reino Unido) en las condiciones habituales de cultivo, 37°C y 5% de CO_2 .

Para los experimentos de hipoxia-reoxigenación, las células se sembraron a una confluencia entre el 10-20% y posteriormente se sometieron a condiciones de hipoxia (1% O_2) o normoxia durante 48 horas. Tras este tratamiento, las células se expusieron a condiciones de normoxia por períodos de 6-24 horas.

2. Anticuerpos y reactivos

Los anticuerpos empleados para la detección de proteínas mediante Western Blot fueron: anticuerpo monoclonal anti-TSP-1 Ab-11 (clones D4.6, AG1, MBC 200.1) de Neomarkers Lab Vision (Freemont, CA), anticuerpo policlonal anti-HIF-2 α de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Heidelberg, GE), anticuerpo monoclonal anti-tubulina, de Sigma (St. Louis, MO), anticuerpo monoclonal anti HIF-1 α de BD Transduction Laboratories (San José, CA), anticuerpo monoclonal anti-VHL de BD PharMingen (San Diego, CA), los anticuerpos policlonales anti-fosfoAKt y anti-AKt de Cell Signalling (Danvers, MA), anticuerpos anti-PHD1, anti-PHD2 y anti-PHD3 fueron de Bethyl (Montgomery, TX). Los anticuerpos se usaron a las concentraciones sugeridas por el fabricante. Para la detección de los anticuerpos primarios se utilizó un

anticuerpo policlonal de GE Healthcare (Pittsburgh, PA) o un anticuerpo monoclonal de ratón de Dako (Carpinteria, CA), ambos acoplados a HRP (Horseradish peroxidase). La detección por quimioluminiscencia (ECL) se hizo mediante el kit IMMUNO-Star™ WesternC™ (Bio-Rad, Hertfordshire, UK).

Los reactivos empleados para realizar los distintos ensayos fueron: inhibidor de PI3k LY294002 de Merck (Whitehouse Station, NJ), ácido oleoil-L-alfa lisofosfatídico (LPA) de Sigma, dimetil oxaloil glicina (DMOG) de Enzo Life Sciences (Farmingale, NY), inhibidor del proteosoma MG 132 de Sigma (St. Louis, MO).

Los ARN de interferencia frente a HIF-1 y HIF-2 alfa, PHDs, VHL y TSP-1 fueron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Heidelberg, GE). El ARN de interferencia de HuR fue de Ambion (Paisley, UK).

3. Vectores de expresión

Expresión transitoria:

Las construcciones para sobre-expresar Akt fueron cedidas por la Dra. Ana Clara Carrera (Centro Nacional de Biotecnología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España). Las células fueron transfectadas con el reactivo jetPEI (polímero catiónico derivado de la polietilenimina), de Polyplus transfection (New York, NY). Las células RCC4 y 786-O se transfectaron con el plásmido pcMV6-gagAkt para la sobre-expresión de Akt constitutivamente activo, así como con el plásmido vacío (pcMV6). Para ello las células se crecieron al 50-70% de

confluencia en placas de 60mm (p60), para el estudio de las proteínas mediante Western Blot, o en placas de 150mm (p150), para la realización de los experimentos de fraccionamiento núcleo-citosol. Por placa se transfectaron 3µg de ADN en las placas p60 y 18µg de ADN en las p150. Los plásmidos se disolvieron en 150 mM de NaCl hasta un volumen final de 100 µl para las p60 y 250 µl para las p100. Por otro lado, 6 µl o 20 µl (para p60 o p100 respectivamente) del reactivo de transfección jetPEI se disolvieron en 150 mM de NaCl hasta un volumen final de 100 o 250 µl (para p60 o p100 respectivamente). Las mezclas resultantes se agitaron suavemente, se mezclaron con el ADN del plásmido y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se añadieron las mezclas y se incubaron durante 36 horas. Transcurrido este período se realizaron los análisis necesarios.

Transducción celular mediante infección retroviral

La expresión estable de las formas mutadas de HIF-2 α y la forma salvaje de VHL se hizo mediante transducción retroviral. Se emplearon células empaquetadoras 293T (CLONTECH, Saint-Germain-en-Laye, Francia) que fueron transfectadas con lipofectamina (invitrogen) en placas p60 con 3,5 µg de los vectores retrovirales que codifican para HIF-2 α P405A;P531A (HIF-2 α PP), HIF-2 α P405A;P531A;bHLH (HIF-2 α bHLH), VHL salvaje, o los vectores vacíos (pBabe para el caso de HIF-2 α o pRV para el caso de VHL), 4 µg de un vector de expresión que codifica para gag/pol (pNGLV-MLV-gag-pol) y 2 µg de otro vector que codifica para la proteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (pVSV-G). Tras 24 horas de transfección se les cambió el medio y 48 horas postransfección se recogió el sobrenadante celular conteniendo el virus. Dicho sobrenadante se filtró con filtros de 0,22 µm

y se diluyó 1:2 con medio fresco y posteriormente se añadió polibreno a una concentración final de 6 µg/ml. Las células de carcinoma renal se cultivaron a una confluencia del 20 % en p60 y en estas condiciones se añadió un volumen de 1,5 ml del sobrenadante con los retrovirus. Las 786-O-VHL se infectaron con las formas mutadas de HIF-2 α , y las 786-O o las RCC4 (ambas pVHL negativas) se infectaron con los retrovirus que expresaban la forma salvaje de VHL. A continuación las células se incubaron con los retrovirus y tras 24 horas se les cambió el medio, seguido de un período de recuperación durante 48 horas, a partir de las cuales se seleccionaron las células infectadas añadiendo puromicina (1mg/ml), en el caso de las infecciones para las distintas formas mutadas de HIF-2 α , o neomicina (1mg/ml), en el caso de las infecciones para la forma salvaje de VHL.

4. Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot

El análisis de proteínas tras finalizar los diferentes tratamientos se hizo mediante inmunodetección. Las células se lavaron con suero fisiológico frío y se lisaron con Laemmli (2% SDS, 10% glicerol, 10mM DTT, 62 mM Tris pH 6,8 y 0,004% de azul de bromofenol). Las proteínas así solubilizadas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS al 8%, o al 10% en el caso de las PHDs, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0,45 µm (Bio-Rad). Posteriormente se bloquearon durante 1 hora con 5% de leche en polvo desnatada en TBS-T (50mM Tris pH 7.6, 150mM NaCl, 0,1% Tween-20) y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante 12 horas a 4°C o 4 horas a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo primario se eliminó con varios lavados con TSB-T y se

incubaron con los anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras varios lavados con TBS-T las membranas se trataron con reactivo ECL (IMMUNO-Star™ WesternC™) y la señal se visualizó en el ImageQuant Las 4000 (GE Healthcare Bio-Sciences). Para la cuantificación de la proteína se utilizó el programa de análisis de imagen Image Quant™ TL 7.0.

5. Preparación y concentración de medios condicionados

Para la detección de la TSP-1 secretada en los medios condicionados, las células se cultivaron durante 48 horas en el medio habitual sin suero. Tras el tratamiento se recogieron los medios condicionados y se trataron con inhibidores de proteasas (complete, EDTA-free), de Roche (Indianapolis, IN). Para eliminar posibles restos celulares los medios condicionados se centrifugaron a 335 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación se concentraron 50 veces y se dializaron con PBS mediante el uso de Centricones de Amicon Ultra (Millipore, Billerica, MA) con membranas de 100 KDa de tamaño de exclusión. Finalmente se analizaron los niveles de la TSP-1 por western blot.

6. Inmunoprecipitación de proteínas

Para la inmunoprecipitación de la TSP-1 o de pVHL las células se crecieron en placas de 150 mm (p150) y se lisaron con tampón RIPA (NaCl 150mM, Tris HCl 10mM pH 7,4, Nonidex P40 1 %, Deoxicolato sódico 0,5 %, SDS 1 %, Inhibidores de fosfatasa y proteasas (Roche)). La inmunoprecipitación se realizó partiendo de 500 µg de proteína total,

realizándose un pre-clareo con 30 μ l de proteína G (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) al 50 %, previamente equilibrada con tampón RIPA durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se centrifugó a 380 x g durante 3 minutos, incubando el sobrenadante con una mezcla de proteína G e Inmunoglobulina G inespecífica (Santa Cruz) a 4°C durante 1 hora. A continuación se centrifugó la muestra a 380 x g durante 3 minutos. El sobrenadante se incubó con una concentración final de anticuerpo de 1 μ l por cada 100 μ g de proteína a 4°C durante 16 horas, usándose el precipitado como control negativo. Seguidamente, dicha muestra se incubó con 30 μ l de proteína G previamente equilibrada durante 2 horas a 4°C, y se centrifugó a 380 x g durante 3 minutos, eliminando el sobrenadante. El precipitado se lavó 3 veces con tampón RIPA y finalmente se solubilizó con Laemmli 2x, procediéndose a su análisis mediante western blot.

7. Preparación de extractos intracelulares

Para la detección de la TSP-1 intracelular, las células se crecieron en p60 en condiciones de normoxia o hipoxia (1% O₂) durante 48 horas. Tras el tratamiento, las células se tripsinizaron, neutralizándose la tripsina con medio con suero (FBS). Con el fin de eliminar los restos de FBS, las células se centrifugaron a 335 x g y se lavaron 2 veces con suero fisiológico estéril. Por último, las células se lisaron con Laemmli 1x y se congelaron a -20°C hasta su utilización.

8. PCR cuantitativa a tiempo real

El análisis del ARN mensajero se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Tras los tratamientos, las células se lavaron

con suero fisiológico frío y se guardaron a -80°C al menos durante 30 minutos. Para la purificación del ARN mensajero (ARNm) se empleó 1 ml de Ultraspec (Biotechx, Houston, Tx) o 1 ml de TRIzol (Invitrogen) en el caso del fraccionamiento polisómico-no polisómico y del fraccionamiento núcleo-citosol. Las placas se incubaron durante 5 minutos con cualquiera de los reactivos y posteriormente se añadieron 200 μl de cloroformo. Dicha mezcla se agitó en un vortex durante 15 segundos. Pasado ese tiempo las muestras se centrifugaron a 23000 x g durante 15 minutos a 4°C . El ARN contenido en la fase acuosa se recuperó y se mezcló con 500 μl de isopropanol. Tras una breve agitación las muestras se guardaron a -80°C durante 12 horas para una mayor precipitación del ARN. Posteriormente el ARN se centrifugó a 23000 x g durante 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El pellet con el ARN se lavó con etanol al 70% (2 veces) y finalmente se solubilizó en agua libre de endonucleasas. Para la valoración de la concentración y pureza del ARN se realizó una lectura en espectrofotómetro NanoDrop 100 (Thermo Scientific) a 260, 230 y 280 nm. Se retrotranscribió a ADNc 1 μg del ARNm extraído usando el kit Improm II RT (Promega, Madison, WI). Del ADNc resultante se utilizó 1 μl como molde para las amplificaciones llevadas a cabo con las parejas de oligonucleótidos específicos. Como sonda de detección se usó el fluoróforo SYBR-Green junto con la mezcla de reacción (Power SYBR[®] Green PCR Master Mix). La fluorescencia se cuantificó en StepOne Plus (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Los ciclos de temperatura empleados fueron: 10 minutos para desnaturalizar el ADN a 95°C , 15 segundos para desnaturalizar a 95°C y 1 minuto a 60°C para hibridación. Estos ciclos se repitieron 40 x veces. Las curvas de melting se realizaron a 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto y 95°C durante 15 segundos.

Las parejas de oligonucleótidos se diseñaron con el programa Primer Express (Applied Biosystems) de tal manera que hibridaran en distintos exones para evitar amplificaciones de ADN genómico. Las parejas de oligonucleótidos empleados para amplificar los diferentes genes fueron: TSP-1, sentido ACTGGGTTGTACGCCATCAGG y el antisentido CTACAGCGAGTCCAGGATCAC; para amplificar HPRT, sentido ATTGTAATGACCAGTCAACAGGG y el antisentido GCATTGTTT TGCCAGTGTCAA; para VHL, sentido TGACGGACAGCCTATTTTTGC y como antisentido AACCTGGAGGCATCGCTCTT; para VEGF, sentido TGCCAAGTGGTCCCAG y el antisentido GTGAGGTCTTGATCCG; para PHD1, como sentido se empleó GCGCTGCATCACCTGTATCTAT y como antisentido CCGCCATGCACCTTAACG; para amplificar PHD2, el sentido fue CCCTCATGAAGTACAACCAGCAT y el antisentido CATCTG CATCAAATAACCAACAGT; para PHD3 como sentido se usó TGCATCACCTGCATCTACTATCTG y como antisentido TACATG GTGGGATCCTGCG y para GLUT-1, el sentido empleado fue TCAACCGCAACG AGGAGAA y el antisentido CTGTCCC GCGCAGCTT).

9. Silenciamiento génico mediante ARN de interferencia

Para suprimir la expresión de los diferentes genes se utilizaron ARN de interferencia específicos (siARN) así como interferentes inespecíficos como control (SCR). Para ello las células se crecieron a una confluencia del 40 % en medio RPMI suplementado con 10 % FBS y 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 1mg/ml de Neomicina (G418). Previo a la transfección se les retiró el antibiótico y se transfectaron usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) con los ARN de interferencia control o con los específicos para HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-

β , HuR, VHL, PHDs y TSP-1 siguiendo las instrucciones del fabricante y la metodología puesta a punto en el laboratorio. Tres días después de la transfección se analizó el grado de interferencia y sus efectos en migración cuando se interfirió la TSP-1.

10. Purificación y análisis del ARN mensajero en la fracción polisómica y no polisómica

Para estos experimentos las células fueron cultivadas a un 40 % de confluencia en placas p150. Durante 48 horas las células fueron sometidas a condiciones de hipoxia (1 % de oxígeno) o de normoxia. Cinco minutos antes de retirar el tratamiento se añadió cicloheximida (CHX) a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$. Tras el tratamiento con CHX las células se lavaron dos veces con 5ml de PBS/CHX a 50 $\mu\text{g/ml}$ en frío y se recogieron en 5ml del mismo medio. Esta suspensión se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos a 4°C. Se lavaron de nuevo con otros 5 ml de PBS frío y se repitió la centrifugación anterior, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado en tampón de lisis específico para polisomas en frío (20mM de Tris-HCl pH 7,4; 10mM de MgCl₂; 300mM de KCl en agua DEPC). En el momento de usar el tampón se añadieron 100 unidades/ml de inhibidor de ribonucleasa (Promega), 200 $\mu\text{g/ml}$ de inhibidores de proteasas (Roche) y 10 mM DTT. Para facilitar la lisis celular se hizo pasar el lisado 10 veces por una aguja de 27G, y posteriormente se mantuvieron en hielo durante 10 min. Los lisados se centrifugaron a 23000 x g durante 15 minutos a 4°C. El precipitado correspondiente a la fracción nuclear se disolvió en TRIzol procediéndose a la extracción del ARN mensajero como se explicó en el apartado 8. El sobrenadante se añadió sobre una solución de 4,5 ml de sacarosa al 30%, preparada en tampón de lisis frío

específico para polisomas y se centrifugó en una ultracentrífuga a $150000 \times g$ a 4°C durante 2 horas, usando un rotor SW55. El precipitado obtenido tras la centrifugación corresponde a la fracción polisómica mientras que el sobrenadante corresponde a la fracción no polisómica. El precipitado se disolvió en TRIzol y se procedió a la extracción del ARN como se ha indicado anteriormente en el apartado 8. Para precipitar la fracción no polisómica, es decir, el sobrenadante obtenido de la ultracentrifugación, se usó 1/10 del volumen de acetato sódico 3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Tras dejar al menos 12 horas a -80°C , se centrifugó a $23000 \times g$ durante 7 minutos a 4°C y el precipitado obtenido se disolvió en TRIzol, procediéndose a la extracción del ARN mensajero tal y como se explicó en el apartado 8.

11. Análisis del ARN mensajero total de la fracción citosólica y nuclear

Para estos experimentos las células fueron cultivadas a un 40% de confluencia en placas p150. Para ello las células fueron sometidas a condiciones de hipoxia (1% de oxígeno) o de normoxia durante 48 horas. Tras el tratamiento las células se lavaron dos veces con 5ml de PBS en frío y se recogieron en 5ml del mismo medio. Esta suspensión se centrifugó a $400 \times g$ durante 5 minutos a 4°C . Se lavaron de nuevo con otros 5 ml de PBS frío y se repitió la centrifugación anterior, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado en tampón de lisis específico para polisomas en frío (20mM de Tris-HCl pH 7,4; 10mM de MgCl₂; 300mM de KCl en agua DEPC). En el momento de usar el tampón se añadieron 100 unidades/ml de inhibidor de ribonucleasa (Promega), 200 $\mu\text{g/ml}$ de inhibidores de proteasas (Roche) y DTT 10 mM. Tras lisar las muestras haciéndolas pasar 10 veces por una aguja de

27G, se dejaron incubando en hielo durante 10 min, y posteriormente se centrifugaron a 800 x g durante 15 minutos a 4°C. El pellet obtenido tras la centrifugación, correspondiente a la fracción nuclear, se solubilizó con Trizol para proceder a la extracción del ARN mensajero siguiendo el protocolo explicado en el apartado 8. Por otro lado, el sobrenadante, donde se encuentran todos los componentes citoplasmáticos, se precipitó usando una mezcla de 1/10 de acetato sódico y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Tras dejar al menos 12 horas a -80°C se centrifugó a 23000 x g durante 7 minutos a 4°C. El precipitado resultante se disolvió en TRIZOL procediéndose a la extracción del ARN mensajero tal y como se explicó en el apartado 8.

12. Migración e invasión

Los experimentos de migración e invasión se realizaron en placas de Transwell con filtros de 6.5 mm de diámetro y un poro de 8 µm, de Costar Corning (NY). Las células se privaron previamente durante 24 y sembraron en los Transwell permitiendo su migración durante 16 horas a 37°C. Para estimular la migración se añadió en la parte inferior del Transwell medio RPMI con el 5% de suero (FBS) o 10 µM de Ácido oleoil-L-alfa lisofosfatídico (LPA). Como control negativo se empleó medio sin suero. Transcurridas las 16 horas de migración se fijaron las células que habían migrado con Diff-Quick (International Reagent, Kobe, Japan) y se eliminaron las células que no habían migrado frotando suavemente con un bastoncillo de algodón. Finalmente las células fijadas se contaron al microscopio (20X) en al menos tres campos aleatorios diferentes. Para los experimentos de invasión, los filtros de los Transwell se recubrieron con 20 µg/ml de colágeno tipo I y se realizó el

experimento en las mismas condiciones que las indicadas para la migración.

13. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se ha utilizado el test de Student. Cada experimento se ha repetido un mínimo de tres veces y se ha representado la media \pm SEM. Los datos se han considerado estadísticamente significativos cuando el valor $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

REGULACIÓN DE LA TSP-1 EN CARCINOMA RENAL

1. PAPEL DE pVHL EN LA REGULACIÓN DE TSP-1

Los carcinomas renales de célula clara son tumores altamente vascularizados, en parte debido a mutaciones en el gen de VHL que causan bien una pérdida de la función de la proteína de VHL (pVHL) o bien una pérdida de la expresión de dicha proteína. Esto produce una estabilización del factor inducible por hipoxia (HIF), aumentándose así la expresión de genes dependientes de HIF, entre los que se encuentran factores angiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Forsythe et al. 1996). Además, se ha demostrado que la ausencia de VHL produce defectos en el ensamblaje de la matriz extracelular, lo que favorece el aumento de VEGF liberado por la matriz, produciéndose un aumento de la angiogénesis (Kurban et al. 2006). Teniendo esto en cuenta nos preguntamos si en estos tumores se producía una regulación inversa de los factores anti-angiogénicos. Entre estos, nos interesamos por la TSP-1 dado que por un lado es una proteína de matriz extracelular y, por otro lado, es un potente inhibidor de angiogénesis. Primeramente se analizó el efecto de la pérdida de VHL sobre los niveles de TSP-1. Para ello se sobre-expresó una construcción de VHL salvaje en las líneas de carcinoma renal de célula clara, 786-O y RCC4 a las que se denominó 786-O-VHL y RCC4-VHL. Se realizaron experimentos de RT-PCR para analizar el ARN mensajero y experimentos de inmunodetección mediante western blot para analizar la proteína. El análisis de los niveles de mensajero en las distintas líneas no mostró cambios significativos en presencia o ausencia de VHL, por el

contrario se observó una notable inducción en el gen de VEGF, tal y como era de esperar por lo descrito anteriormente (Figura 8.A). Sin embargo, al analizar la proteína se observó un aumento significativo de la expresión de TSP-1 tanto en las 786-O-VHL como en las RCC4-VHL (Figura 8.B)

Para confirmar la implicación de VHL en la regulación de TSP-1 en las líneas de carcinoma renal se utilizaron diferentes mutantes localizados en el dominio alfa y beta de la estructura de VHL. Dichas mutaciones afectan de forma diferencial a la función de VHL. Mutaciones en el dominio alfa de VHL, concretamente la sustitución de una valina por una leucina en la posición 188 (L188V) produce alteraciones en el ensamblaje de la matriz extracelular sin afectar su actividad ubiquitin ligasa (Hoffman et al. 2001) Sin embargo, mutaciones en el dominio beta de VHL, como la sustitución de la tirosina de la posición 112 por una histidina (Y112H), afecta tanto al ensamblaje de fibronectina como a su actividad ubiquitin ligasa (Cockman et al. 2000). El análisis de nuestros resultados mostró que dichas mutaciones afectaban de forma similar a los niveles de TSP-1, encontrando una bajada significativa con respecto a los niveles encontrados en las células que expresaban VHL salvaje, pero similares a los niveles de las células deficientes en VHL (Figura 8.C).

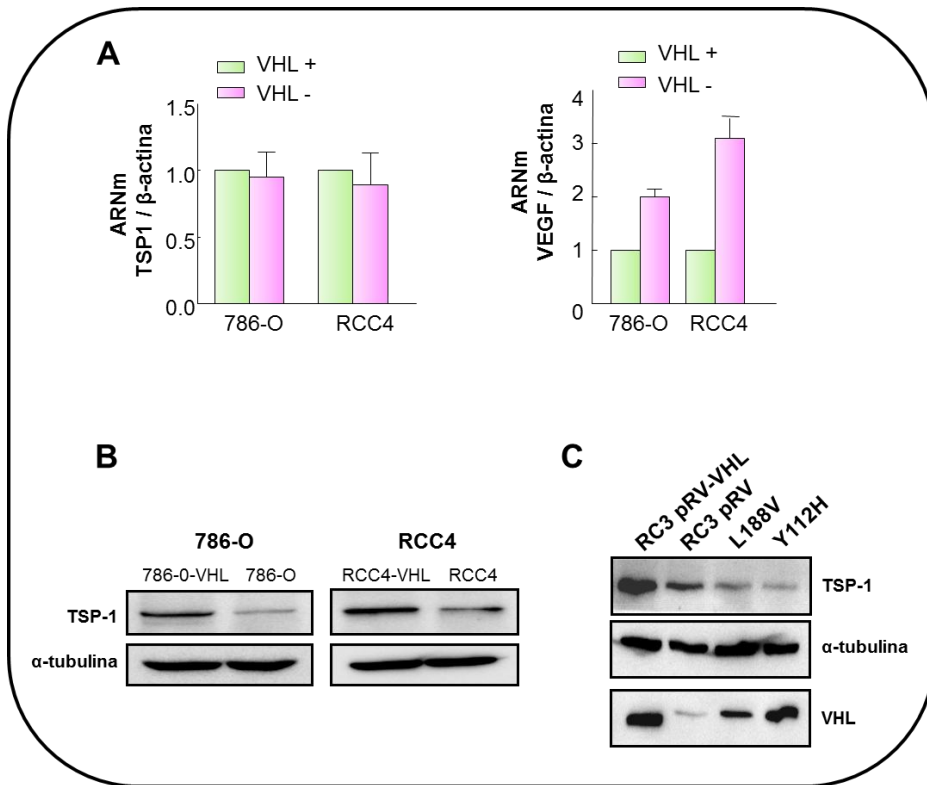


Figura 8. Papel de pVHL en la regulación de la TSP-1. A) Análisis de los niveles de ARNm de la TSP-1 y VEGF mediante PCR en células 786-O y RCC4, tanto aquellas en las que expresaban un pVHL no funcional (VHL-) como aquellas en las que se ha sobreexpresado un pVHL salvaje funcional (VHL+). Como control interno se empleó la β -actina. B) Análisis de la proteína de la TSP-1 y VHL mediante western blot. Se analizan las células (VHL-) y (VHL+) así como diferentes mutantes de pVHL. Como control de carga se utilizó α -tubulina. Se muestra la media \pm SD de al menos tres experimentos distintos (A) o bien un experimento representativo de al menos 3 experimentos realizados (B).

En resumen, estos resultados nos indicaban que el gen supresor de tumores VHL regula de forma positiva los niveles de TSP-1.

2. PAPEL DE LA HIPOXIA EN LA REGULACIÓN DE TSP-1

La disminución del aporte de oxígeno a las células (lo que denominaremos hipoxia) es una situación que ocurre frecuentemente en los tumores sólidos. Para compensar este aporte insuficiente de oxígeno la célula desarrolla mecanismos dirigidos a adaptarse a esta nueva situación. Entre estos mecanismos cabe destacar el aumento de los factores pro-angiogénicos, entre ellos VEGF. Este hecho, junto con la pérdida de pVHL tal y como hemos mencionado anteriormente, contribuye a que los tumores renales de célula clara estén altamente vascularizados. Teniendo esto en cuenta, cabría esperar, que al igual que la pérdida de pVHL, la hipoxia también produzca una disminución en los niveles de factores anti-angiogénicos. Aunque la regulación de la TSP-1 por hipoxia se ha estudiado en otros modelos celulares, los resultados muestran una alta variabilidad tanto en su regulación como en los mecanismos de la misma (Distler et al. 2007; Faller 1999; Laderoute et al. 2000; Osada-Oka et al. 2008; Phelan et al. 1998; Tenan et al. 2000). Por tanto, nos planteamos estudiar el efecto de la hipoxia en los niveles de la TSP-1 en nuestras líneas de carcinoma renal. Primeramente, se analizaron los niveles de ARN mensajero mediante PCR cuantitativa a tiempo real tras someter a las células a hipoxia (1 % O₂) durante 6, 12, 24 y 48 horas. Sin embargo, al igual que en ausencia de pVHL, en hipoxia no se observaron cambios significativos en los niveles de ARNm, mostrándose como dato representativo la estadística tras 48 h de hipoxia. Como control se estudiaron los niveles de la PHD3, cuya inducción en hipoxia ha sido ampliamente documentada. El análisis de la PCR mostró la inducción esperada para este gen (Figura 9).

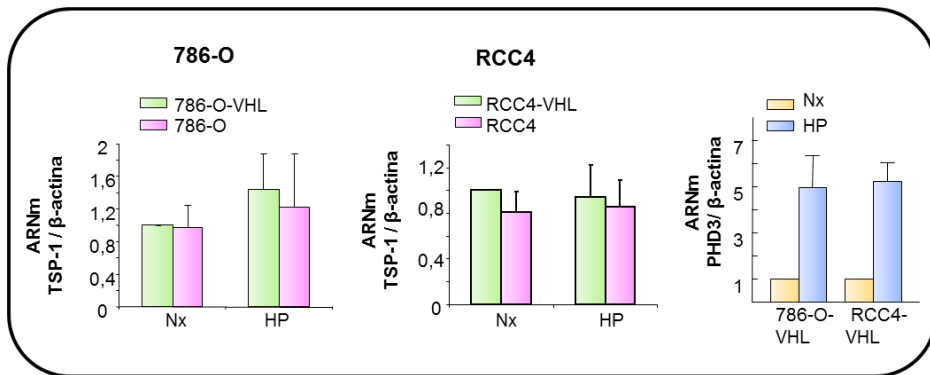


Figura 9. Regulación de los niveles de ARNm de la TSP-1 por la hipoxia.

Análisis del ARNm de la TSP-1 y PHD3 en condiciones de normoxia (Nx) o en hipoxia (HP) en células RCC4 y 786-O. Como control interno se utilizó la β -actina. Los resultados son la media \pm SD de al menos seis experimentos realizados.

Por el contrario, en las mismas condiciones de hipoxia se observó tanto en las RCC4 (Figura 10.A) como en las 786-O (Figura 10.B) una bajada significativa de los niveles de proteína de la TSP-1 a partir de las 24 ó 48 horas. Es interesante destacar que la disminución en los niveles de proteína de la TSP-1 ocurría tanto en las líneas de carcinoma renal con una pVHL no funcional, como en sus revertientes en los cuales se sobre-expresó un pVHL salvaje (Figura 10.C).

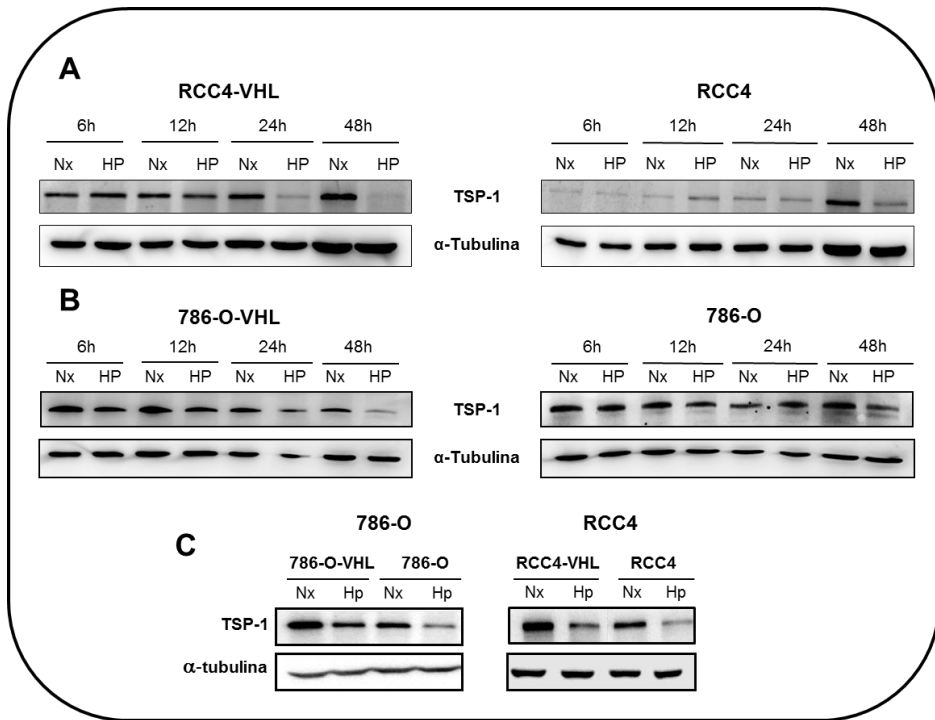


Figura 10. Efecto de la hipoxia en la regulación de los niveles de proteína de la TSP-1. Análisis de los niveles de proteína de la TSP-1 tras someter a las células A) RCC4 y RCC4-VHL, B) 786-O y 786-O-VHL a normoxia (Nx) o hipoxia (HP) a los tiempos que se indican. C) Análisis comparativo de los niveles de la TSP-1 en los mismos tipos celulares en condiciones de normoxia o hipoxia durante 48 horas. Como control de carga se utilizó la α -tubulina. Se muestra un experimento representativo de al menos tres realizados.

Dado que la mayoría de los efectos producidos por la hipoxia se revierten al someter las células a reoxigenación, se quiso estudiar la especificidad de la hipoxia en la regulación de la TSP-1. Para ello se sometieron las células a hipoxia y tras 48 horas se reoxigenaron durante tiempos crecientes. Tras la reoxigenación se observó una recuperación de los niveles de la TSP-1 tanto en las RCC4 (Figura 11.A) como en las 786-O (Figura 11.B).

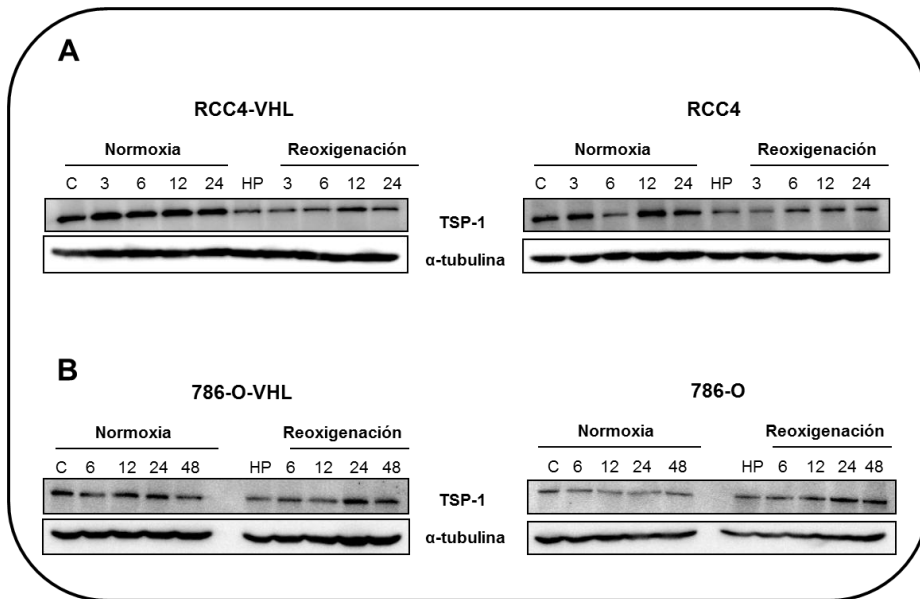


Figura 11. Estudio de la especificidad del efecto de la hipoxia. Análisis de la proteína de la TSP-1 en las células RCC4-VHL y RCC4 (A) y las 786-O-VHL y 786-O (B) tras someterse a condiciones de normoxia (C) o hipoxia (HP) durante 48 horas y posterior reoxigenación durante los tiempos indicados. Como control de carga se empleó la α -tubulina. Se muestran resultados representativos de tres experimentos realizados.

Estos resultados en su conjunto indican por un lado, que la regulación de TSP-1 por hipoxia, al igual que la observada por VHL, es a nivel post-transcripcional, y por otro lado, indican que el efecto de la hipoxia en los niveles de TSP-1 parece ser independiente de la expresión de VHL, dado que la hipoxia disminuía los niveles de TSP-1 tanto en presencia como en ausencia de VHL. Por tanto, el estudio de los mecanismos por los que ambas vías regulan TSP-1 se analizará de manera independiente.

3. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE REGULACIÓN DE TSP-1 POR VHL

3.1 La regulación de TSP-1 por VHL no es mediada por una unión directa entre ambas moléculas

Como se ha descrito previamente, VHL se une a proteínas como Jade-1 (Zhou et al. 2004) o BIM_{EL} (Guo et al. 2009) de manera que aumenta su estabilización sin que se observen variaciones en el ARN mensajero. Por otro lado, la introducción de un VHL salvaje en las RCC produce un aumento de la expresión de la proteína de TSP-1 sin que se observen cambios en el ARN mensajero (Figuras 8.A y 8.B). Por tanto, nos planteamos si VHL se une a TSP-1 para aumentar su estabilidad. Para ello se realizaron experimentos de inmunoprecipitación. Tras analizar los resultados mediante inmunodetección no se observó TSP-1 al inmunoprecipitar con VHL (Figura 12).

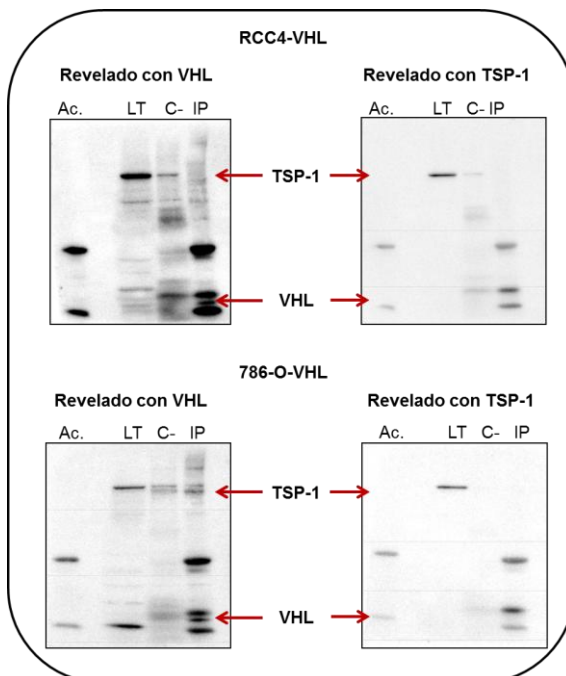


Figura 12. Inmunoprecipitación de pVHL. Análisis de los niveles de proteína de pVHL y TSP-1 en las células RCC4 y 786-O. Se analizan los lisados celulares totales (LT), o inmunoprecipitados con pVHL (IP). Como control negativo de la inmunoprecipitación se utilizó precipitado en ausencia de anticuerpo (C-). Se incluye también el análisis de IgG (Ac) como control de peso molecular del anticuerpo.

Tampoco se detectó pVHL cuando la inmunoprecipitación se realizó con TSP-1 (Figura 13). Como control se reveló tanto con VHL (paneles de la izquierda) como con TSP-1 (paneles de la derecha) ambas inmunoprecipitaciones. Por tanto, se puede concluir que VHL regula TSP-1 de manera indirecta.

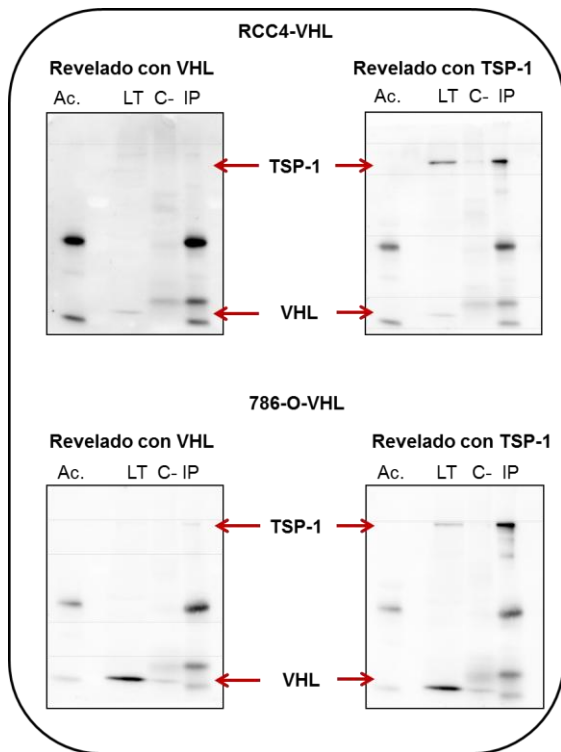


Figura 13. Inmunoprecipitación de TSP-1. Análisis de los niveles de proteína de pVHL y TSP-1 en las células RCC4 y 786-O. Se analizan lisados celulares totales (LT), o inmuno-precipitados con TSP-1 (IP). Como control negativo de la inmunoprecipitación el precipitado en ausencia de anticuerpo (C-). Se incluye también el análisis de IgG (Ac) como control de peso molecular del anticuerpo.

3.2 La expresión de VHL no regula la secreción de la TSP-1 al medio extracelular.

Estudios previos han demostrado que en células de carcinoma renal se produce una disminución en la secreción de TSP-1 al medio extracelular con respecto a la secreción observada en células de tejido renal sano (Veliceasa et al. 2007). Teniendo esto en cuenta nos

planteamos estudiar si la disminución de los niveles de TSP-1 observada en nuestras líneas de carcinoma renal deficientes en VHL era debida a un aumento en la secreción y por otro lado si la presencia de VHL revertía este comportamiento. Puesto que en los apartados anteriores (Figuras 8.B, 8.C, 10.A, 10.B, 10.C) se analizó la cantidad de proteína presente en los lisados totales, que incluyen tanto la TSP-1 que está en el interior celular como la que está formando parte de la matriz extracelular y/o unida a la membrana celular, quedaría por analizar la proteína secretada en forma soluble. Para ello se cultivaron células RCC4, 786-O y sus respectivas revertientes en medio sin suero durante 48 horas. Tras ese periodo se recogieron los medios y se concentraron en presencia de inhibidores de proteasas. En paralelo se lisaron las placas con las células para asegurarnos que la cantidad de proteína secretada en el medio condicionado era proporcional al número de células en las placas de cultivo, empleándose la α -tubulina como control de carga. El análisis reveló que, al igual que los resultados observados en lisados celulares totales, los niveles de TSP-1 secretada en el medio condicionado de células VHL negativas eran significativamente menores que los secretados por las VHL positivas (Figura 14).

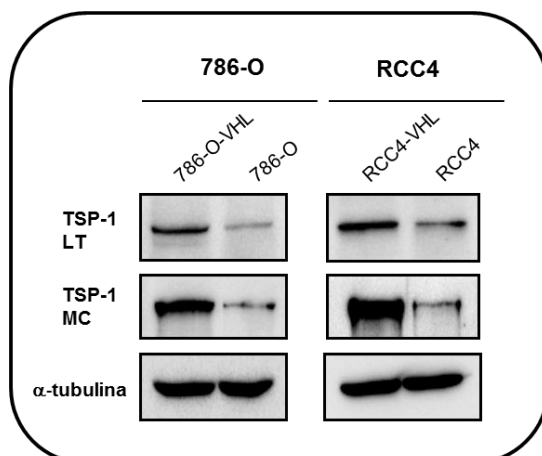


Figura 14. Análisis de la secreción de TSP-1. Análisis de los niveles de proteína de TSP-1 en el lisado total (LT) y en el medio condicionado (MC) de células 786-O y RCC4. Se emplea α -tubulina como control de carga. Se muestra un experimento de al menos tres realizados.

Los resultados anteriores sugieren que la disminución de TSP-1 en las células que expresan mutaciones en *vhl* no es debido a un aumento en la secreción de la proteína de TSP-1 de manera soluble, pero no descartan del todo una posible alteración en la secreción de la trombospondina 1, puesto que es posible que haya una disminución de la secreción produciéndose un desequilibrio entre la cantidad de proteína en el interior de la célula y aquella que se encuentra en la matriz extracelular. Para el estudio de la TSP-1 intracelular se levantaron las células con tripsina, para su posterior lisis con Laemmli 1x. Tras el análisis de los resultados no se observó un aumento de TSP-1 en el interior celular en aquellas células que expresan un VHL mutado comparado con aquellas a las que se ha sobreexpresado un VHL salvaje (Figura 15).

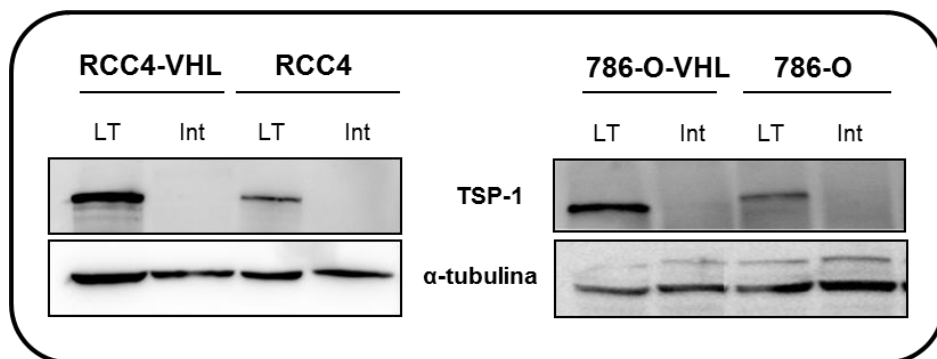


Figura 15. Análisis de los niveles intracelulares de la TSP-1. Se analizan los niveles de la TSP-1 en lisados celulares totales (LT) o en extractos intracelulares (Int) tanto en RCC4 como en las 786-O. En ambos casos se empleó la α -tubulina como control de carga y como control de proteína intracelular. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

Estos resultados indican, por tanto, que la ausencia de VHL no afecta a la secreción de la TSP-1. Una posible explicación a estos

resultados sería que en ausencia de VHL la proteína fuese degradada por alguno de los diferentes mecanismos de degradación existentes.

3.3 La pérdida de VHL no produce un aumento en la degradación de TSP-1

La TSP-1 es una proteína que se secreta a la matriz extracelular y, por tanto, es susceptible de ser degradada por proteasas de la matriz, como es el caso de las metaloproteínas (MMPs) (Nathan V Lee 2006; Iruela-Arispe 2008). Por otro lado, la reintroducción de VHL salvaje en las células de carcinoma renal produce una disminución en la actividad de MMPs, como es el caso de la MMP2 y MMP9 (Struckmann et al. 2008). Por tanto, existía la posibilidad de que la mutación o pérdida de VHL produjese un aumento en la actividad de las MMPs, y esto a su vez un aumento de la degradación de TSP-1. Para abordar nuestra hipótesis se trataron las células con un inhibidor de la actividad de las MMPs, el GM6001, durante 48 horas. Tras el tratamiento no se observaron cambios significativos en las células RCC4 con respecto a las RCC4-VHL (panel izquierdo de la Figura 16). Sin embargo, se produjo un ligero aumento de TSP-1 en las 786-O, observándose también en las 786-O-VHL (panel derecho de la Figura 16). Estos resultados indican que en el caso de las RCC4 las MMPs no están implicadas en la disminución de los niveles de TSP-1, sin embargo, en el caso de las 786-O las MMPs están implicadas en la regulación de TSP-1, al menos parcialmente, aunque no explica la disminución que se produce en ausencia de VHL, puesto que por un lado no se recuperan los niveles de TSP-1 existentes en las células 786-O-VHL y, por otro lado, esta degradación también tiene lugar en las 786-O-VHL. Por tanto, habrá que

seguir estudiando otros posibles mecanismos que puedan explicar dicha bajada.

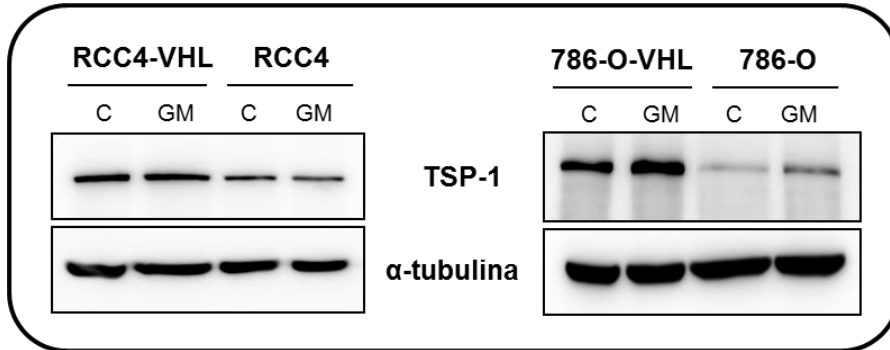


Figura 16. Estudio de la degradación de la TSP-1 por metaloproteinasas (MMPs). Análisis de los niveles de proteína de la TSP-1 en células RCC4 y 786-O sin tratar (C) o tratadas con 10 μ M de un pan inhibidor de las MMPs, el GM6001 (GM). En ambos casos se usó la α -tubulina como control de carga. Se muestra un experimento de al menos tres realizados.

A parte de las MMPs, existen otras proteasas capaces de degradar la TSP-1 (Iruela-Arispe 2008). Para descartar que la ausencia de VHL favorezca un aumento de la degradación de TSP-1 en la matriz extracelular, se detectó dicha proteína mediante inmunodetección en toda la membrana para analizar el patrón de bandas. No se observó un aumento de fragmentos inferiores a 118KDa en las RCC4 ni 786-O con respecto a sus revertientes (Figura 17).

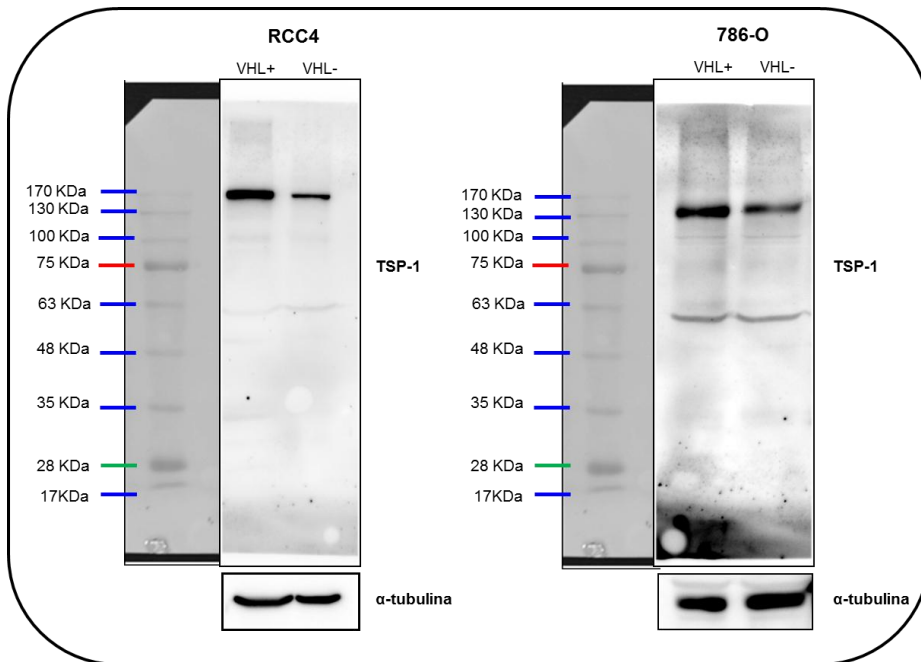


Figura 17. Análisis de la integridad de la TSP-1. Se analiza mediante western blot el patrón de bandas de la TSP-1 en células RCC4 y 786-O (VHL + y VHL -) para determinar la existencia de fragmentos de degradación. Como control de carga se empleó la α -tubulina en ambos casos. Se muestra un experimento de al menos tres realizados.

Teniendo en cuenta el papel de VHL en los mecanismos de degradación intracelular vía proteosoma, y dado que se ha visto que su expresión protege en ciertos casos la degradación de proteínas por este sistema (Guo et al. 2009), otra posibilidad sería que en ausencia de VHL se produjese una degradación intracelular mediada por el proteosoma o por cualquiera de las vías de degradación intracelulares. Para ello se utilizó MG 132, un inhibidor de las vías de degradación mediada por el proteosoma, lisosoma y calpaína. Sorprendentemente, y contrario a nuestra hipótesis, en presencia de dicho inhibidor. Se observó una

disminución de los niveles de proteína de TSP-1 tanto en células VHL positivas como negativas (Figura 18).

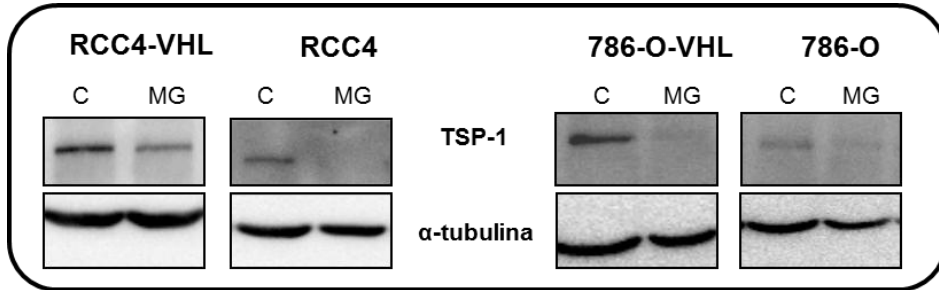


Figura 18. Estudio de la degradación intracelular de la TSP-1. Análisis de los niveles de la TSP-1 en las células RCC4 y en las 786-O sin tratar (C) o tratadas con el inhibidor de proteosoma MG132 (MG) (10 μ M). Como control de carga α -tubulina. Se muestra un experimento representativo de varios realizados.

Dado que estos resultados no nos permitían concluir si la bajada de TSP-1 era debida a la degradación intracelular de la proteína decidimos hacer ensayos de inhibición de la síntesis de proteína, para así poder ver si la vida media de la TSP-1 estaba disminuida en nuestras células VHL negativas. Para ello, se cultivaron las células en presencia de cicloheximida y se hizo un análisis de la proteína a diferentes tiempos. Como se puede ver en las Figuras 19.A y 19.B, no se observó una mayor disminución en células deficientes en VHL funcional con respecto a las que expresan VHL salvaje, y por tanto esto parecía indicar que la vida media de la TSP-1 no estaba afectada.

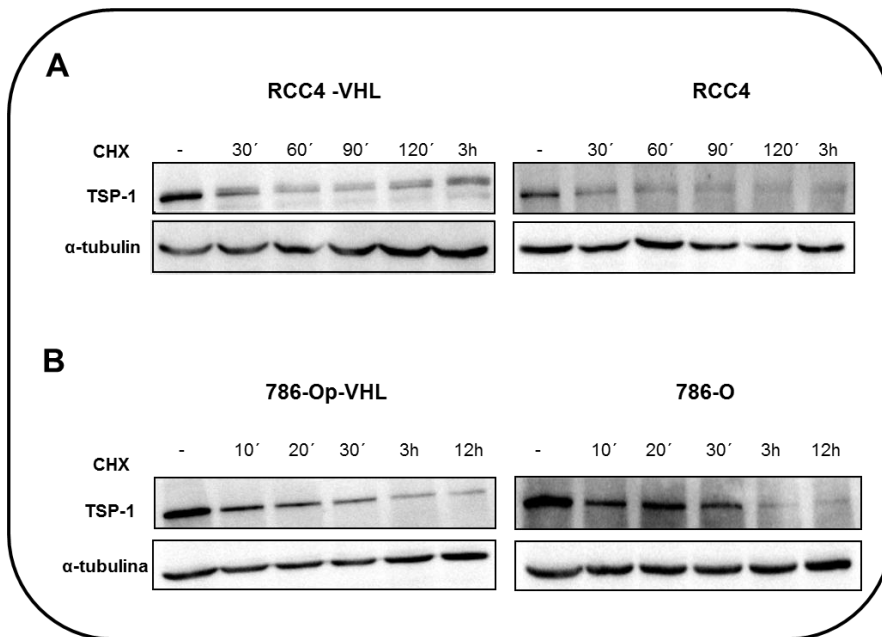


Figura 19. Estudio de la vida media de la TSP-1. Análisis de los niveles de proteína de la TSP-1 en las células RCC4 (A) y 786-O (B) en ausencia (-) o a diferentes tiempos tras el tratamiento con cicloheximida (CHX) a 50 μ g/ml concentración final. Como control de carga α -tubulina. Se muestra un experimento representativo de varios realizados.

Estos resultados sugieren que deben existir otros mecanismos por los cuales los niveles de proteína de TSP-1 son regulados en ausencia de VHL, aunque haría falta realizar un estudio más exhaustivo de las distintas vías de degradación proteica.

4. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA TSP-1 POR LA HIPOXIA

Como se ha mencionado en los apartados 1 y 2 del apartado de Resultados de esta memoria de tesis doctoral, tanto la expresión de VHL como la hipoxia regulan los niveles de TSP-1 en ccRCC. Además el

efecto de la hipoxia se observa tanto en células VHL positivas como negativas, por tanto se puede considerar un efecto independiente de VHL. Para estudiar los mecanismos por los cuales la hipoxia regula TSP-1 decidimos utilizar ccRCC deficientes en pVHL funcional, evitando así posibles interferencias entre ambos mecanismos.

4.1. La regulación de la TSP-1 por la hipoxia es independiente de HIF.

En condiciones de hipoxia la célula desarrolla unos mecanismos específicos cuyo resultado es la transcripción de genes encargados de la adaptación a estas condiciones adversas. Estos mecanismos están regulados mayoritariamente por los factores de transcripción HIF. Aunque nuestros resultados no demuestran regulación transcripcional de TSP-1 en hipoxia, no descartamos que estos factores de transcripción pudiesen regular los niveles de TSP-1 de forma indirecta. Para ello, una primera estrategia fue interferir la expresión de estos factores en hipoxia mediante el uso de ARN de interferencia (siRNA) específicos para las dos isoformas más estudiadas, HIF1 α y HIF2 α . Sin embargo, nuestros resultados mostraron que tras la interferencia de la isoforma HIF-2 α que se expresa en las 786-O (Figura 20.A) o las isoformas HIF-1 α y HIF-2 α que se expresan en las RCC4 (Figura 20.B) no se producía una recuperación de los niveles de TSP-1 en condiciones de hipoxia, lo que indicaba que la regulación de los niveles de TSP-1 en hipoxia es un mecanismo independiente de HIF, y por tanto había que pensar otros mecanismos alternativos que explicasen nuestros resultados.

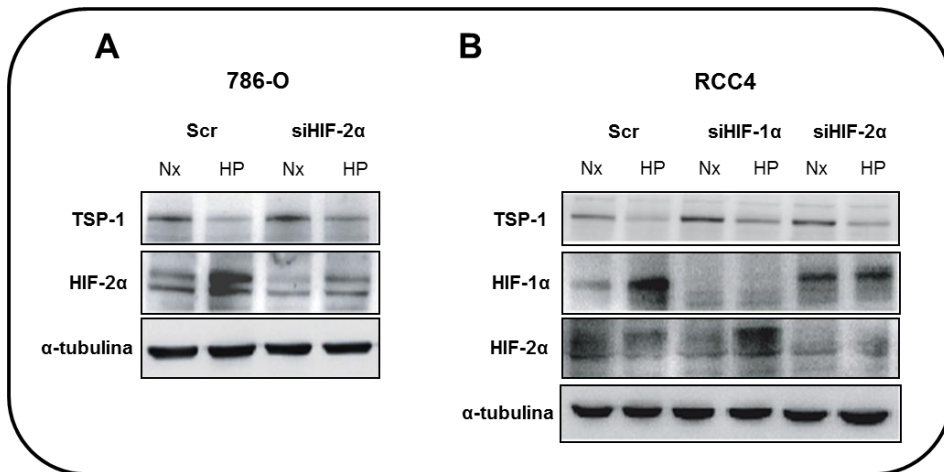


Figura 20. Estudio de la implicación de HIF en la regulación de la TSP-1 por la hipoxia. Análisis de la expresión de la TSP-1, HIF1 α y HIF2 α en células 786-O (A) y RCC4 (B) tras la interferencia con siARNs específicos para cada una de las isoformas (siHIF-1 α) y (siHIF-2 α) o con un interferente inespecífico como control (Scr). Tras la interferencia las células se cultivaron durante 48 horas en condiciones de hipoxia (HP) o normoxia (Nx). Como control de carga α -tubulina. Se muestra un experimento representativo de varios realizados.

Para confirmar la independencia de HIF en la regulación de la TSP-1 por la hipoxia se realizaron dos tipos ensayos. Por un lado, se transfectaron las células 786-O con una forma de HIF en la que se encontraban mutadas las dos prolinas que son susceptibles de ser hidroxiladas por las PHDs (HIF-2 α PP). Tras analizar estos resultados no se observaron cambios en los niveles de proteína de la TSP-1 en las células que se transfectaron con la forma HIF-2 α PP con respecto a aquellas que poseían el vector vacío (pBABE) o las células control (Figura 21.A). Por otro lado, se sometieron las células 786-O transfectadas con las mutaciones L188V e Y112H explicadas en el punto 1 del apartado de resultados de esta Memoria de Tesis Doctoral a condiciones de hipoxia durante 48 h. Tras analizar los resultados se

observó que en las células L188V no aparecieron cambios en la cantidad de proteína de la TSP-1 en condiciones de hipoxia con respecto a la normoxia, aun cuando estas células conservan la capacidad de regula HIF en normoxia, mientras que las células que poseían la mutación Y112H si regulan los niveles de la TSP-1 en hipoxia aunque no son capaces de degradar la subunidad α de HIF en normoxia (Figura 21.B).

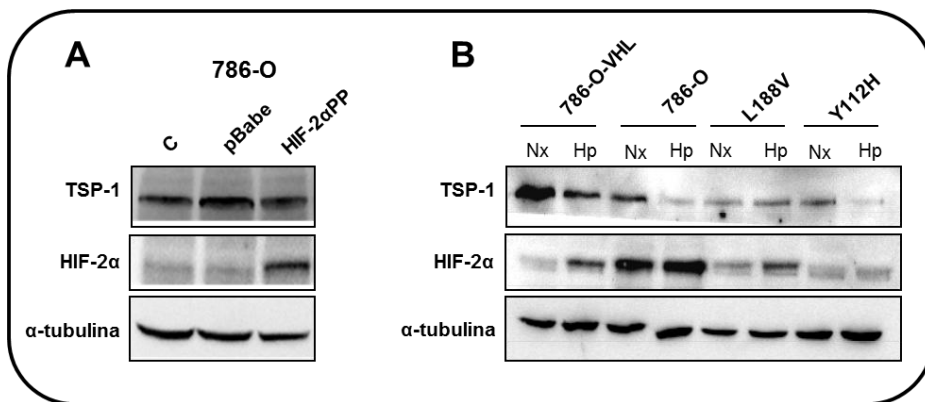


Figura 21. Análisis del efecto de distintos mutantes de HIF y pVHL en los niveles de la TSP-1. A) Análisis de los niveles de la TSP-1 y HIF-2 α en las células 786-O transfectadas con una construcción de HIF-2 α en la que se habían mutado las prolinas susceptibles de ser hidroxiladas por las PHDs (HIF-2 α pp) o transfectadas con el vector vacío (pBabe). B) Análisis de los niveles de la TSP-1 y HIF-2 α en las células 786-O transfectadas con las construcciones mutadas de pVHL (L188V y Y112H) en condiciones de normoxia o hipoxia durante 48 horas. En ambos experimentos se empleó la α -tubulina como control de carga. Se muestra un resultado representativo de al menos tres experimentos realizados.

El conjunto de estos resultados pone de manifiesto que la regulación de la TSP-1 por la hipoxia es independiente de la familia de factores de transcripción HIF.

4.2 La hipoxia no regula la secreción de la TSP-1 al medio extracelular.

La hipoxia produce un aumento en la concentración de calcio intracelular (Wang J 2006). Por otro lado, la TSP-1 tiene numerosos dominios de unión a calcio (Misenheimer TM 1995). Es posible que un aumento de calcio en hipoxia produzca a su vez un aumento de la unión de éste a TSP-1, favoreciéndose un cambio en la conformación de dicha proteína (Calzada et al. 2008), que podría afectar a su secreción tanto de manera soluble (medio condicionado) como de manera insoluble (matriz extracelular), por tanto decidimos analizar el papel de la hipoxia en la secreción de la TSP-1. El análisis fue idéntico al utilizado en el apartado 3.2 para ver la implicación de pVHL, pero en este caso las células se cultivaron en condiciones de normoxia o hipoxia (1% O₂) durante 48 horas. Tras el tratamiento, los niveles de la TSP-1 se analizaron tanto en el sobrenadante como en el lisado total (Figura 22.A). Para el análisis de la proteína intracelular se levantaron las células con tripsina y se lisaron con tampón de lisis, quedando así excluida la TSP-1 de la matriz como la unida a la membrana celular (Figura 22.B).

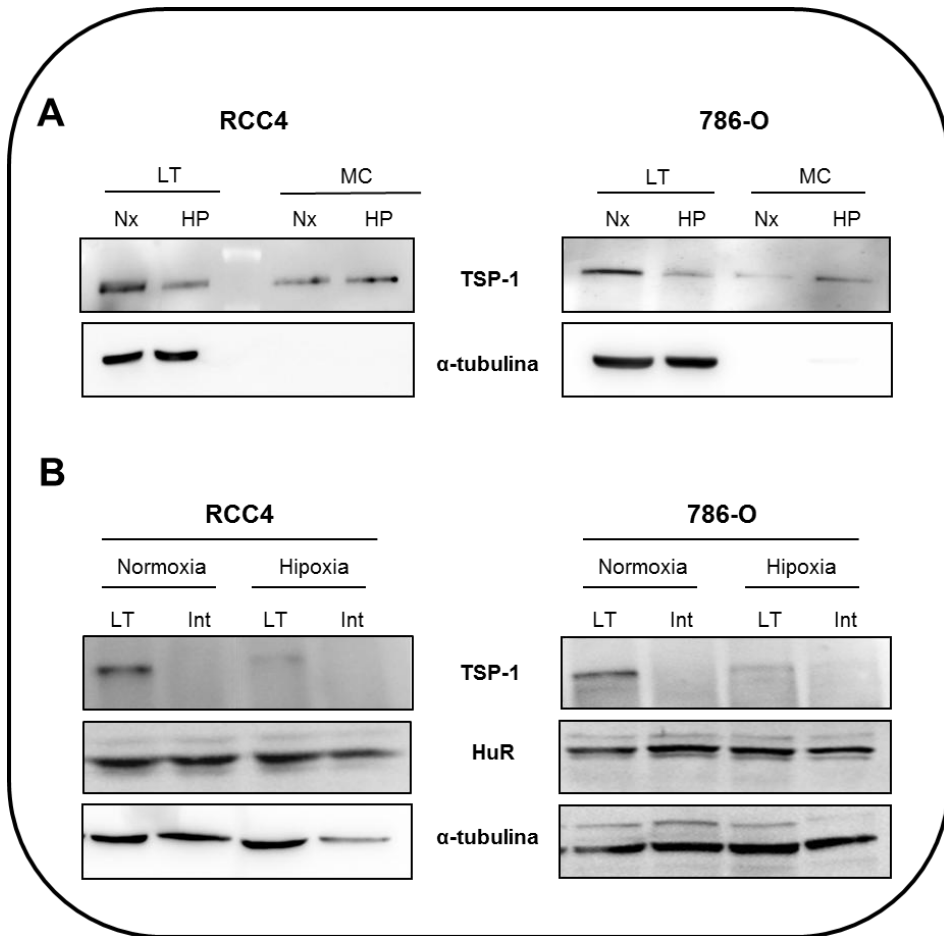


Figura 22. Evaluación de la secreción de la TSP-1 en condiciones de hipoxia. A) Se analiza la expresión de la proteína de TSP-1 en lisados totales (LT) y en el medio condicionado (MC) en células RCC4 y 786-O sometidas a condiciones de normoxia (Nx) o hipoxia (HP). B) Análisis de los niveles de la proteína de TSP-1 en lisados totales (LT) y en lisados intracelulares (Int) de células RCC4 y 786-O. Como control de carga y control intracelular se empleó α -tubulina. Se muestra un experimento representativo de un mínimo de tres experimentos realizados.

Tras analizar los resultados se observó un ligero aumento de TSP-1 secretada en las células 786-O que fueron tratadas con hipoxia, aunque dicho aumento no explica la bajada de TSP-1 en hipoxia, puesto que la

cantidad de TSP-1 secretada es menor que la que forma parte de los lisados totales.

4.3 La hipoxia no produce un aumento en la degradación de TSP-1.

Puesto que la regulación no se estaba dando a nivel de secreción, nos planteamos también estudiar si mecanismos de degradación podrían estar implicados en la disminución de TSP-1 en hipoxia. Analizamos primeramente la implicación de las MMPs, para lo cual tratamos las células con el inhibidor GM6001 añadiéndoselo 30 minutos antes de someterlas a hipoxia y manteniéndolo durante el tratamiento de hipoxia (48 horas). Sin embargo, tras analizar la proteína en lisados totales no se observó una recuperación de TSP-1 en hipoxia en presencia del inhibidor (Figura 23).

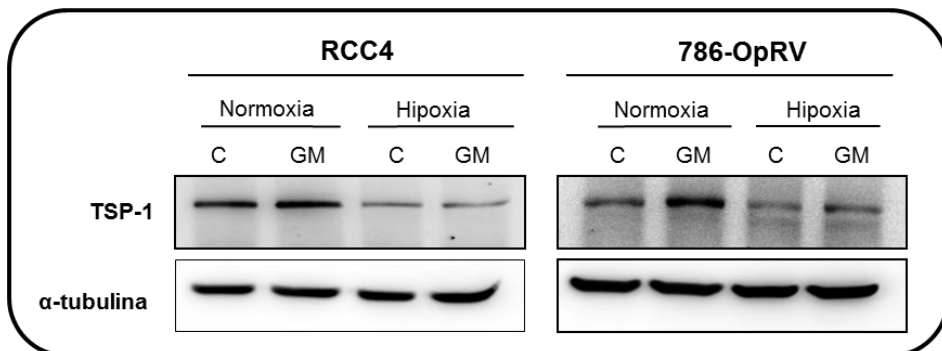


Figura 23. Estudio de la degradación de la TSP-1 por metaloproteinasas (MMPs). Análisis de la expresión de la TSP-1 en RCC4 y 786-O en ausencia (C) o presencia de 10 μ M del pan inhibidor de MMPs GM6001 (GM) 30 minutos antes de someter las células a condiciones de normoxia o hipoxia. Como control de carga α -tubulina. Se muestra un resultado representativo de varios experimentos realizados.

Para confirmar que en la disminución de TSP-1 por la hipoxia no estaban implicados mecanismos de degradación a nivel de la matriz extracelular, se analizó el patrón de bandas de TSP-1 por inmunodetección (Figura 24), no observándose un aumento en dicho patrón cuando las células fueron sometidas a 48 horas de hipoxia.

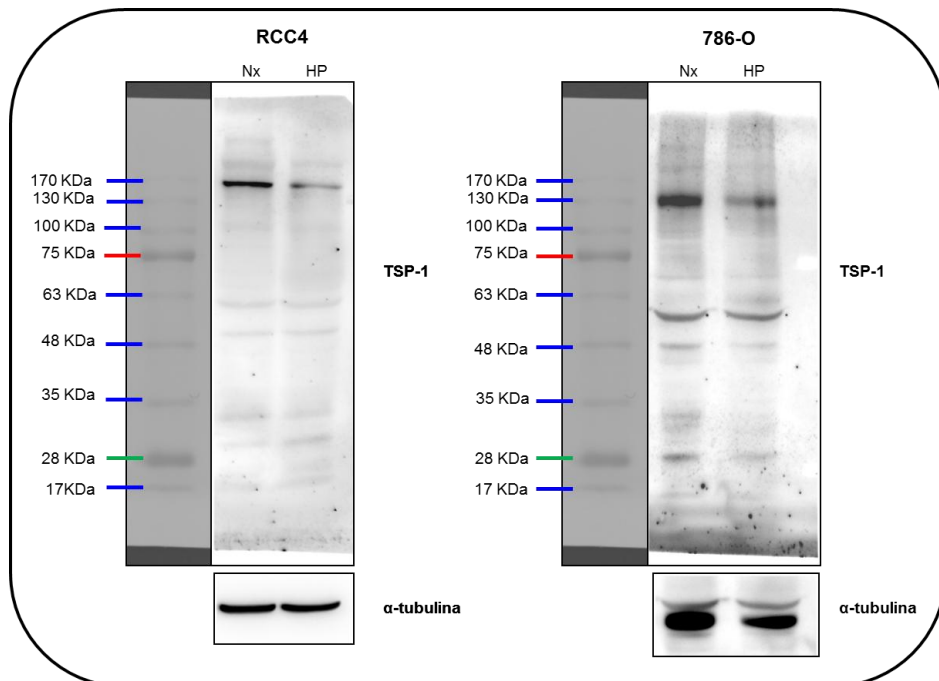


Figura 24. Análisis de la integridad de la TSP-1 en hipoxia. Inmunodetección del patrón de bandas de la proteína de TSP-1 en condiciones de hipoxia (HP) o normoxia (Nx) en células RCC4 y 786-O. Como control de carga α -tubulina.

Nos planteamos también la posibilidad de que la TSP-1 fuese degradada a nivel intracelular. Para ello se trataron las células con MG132 durante 30 minutos antes de someter las células a condiciones de normoxia o hipoxia durante las 48 h del tratamiento. Sorprendentemente en condiciones de hipoxia y en presencia de MG132 no sólo no se

observó una recuperación de la proteína, sino que por el contrario se observó una disminución de la misma (Figura 25).

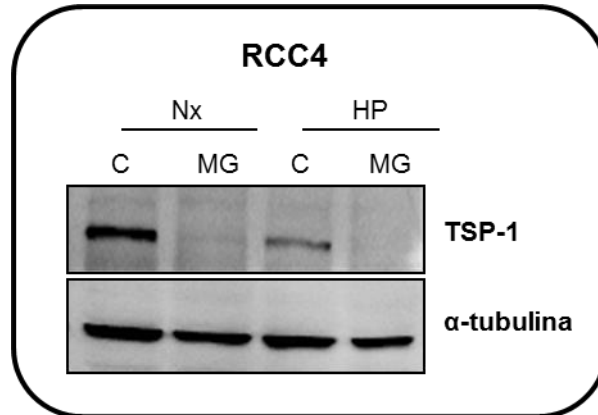


Figura 25. Efecto de la vía de degradación del proteosoma en los niveles de la TSP-1. Se analizan los niveles de la TSP-1 en las células RCC4 sometidas a condiciones de normoxia (Nx) o hipoxia (HP) durante 48 horas, en ausencia (C) o presencia de 10 μ M del inhibidor del proteosoma MG132 (MG). Se emplea la α -tubulina como control de carga. Se muestra un experimento representativo de al menos cuatro realizados.

Otra aproximación para confirmar nuestros resultados fue estudiar diferencias en la estabilidad de la TSP-1 entre normoxia e hipoxia cuando se inhibía la síntesis de proteína mediante el tratamiento con cicloheximida. Sin embargo, aunque se observó una ligera bajada en la estabilidad de la proteína en hipoxia, esta no era significativa y por tanto no se pudo concluir que estuviese implicada en la bajada de la TSP-1 en hipoxia (Figuras 26.A y 26.B). Por tanto, los mecanismos de degradación no juegan un papel importante en la regulación de TSP-1 por la hipoxia.

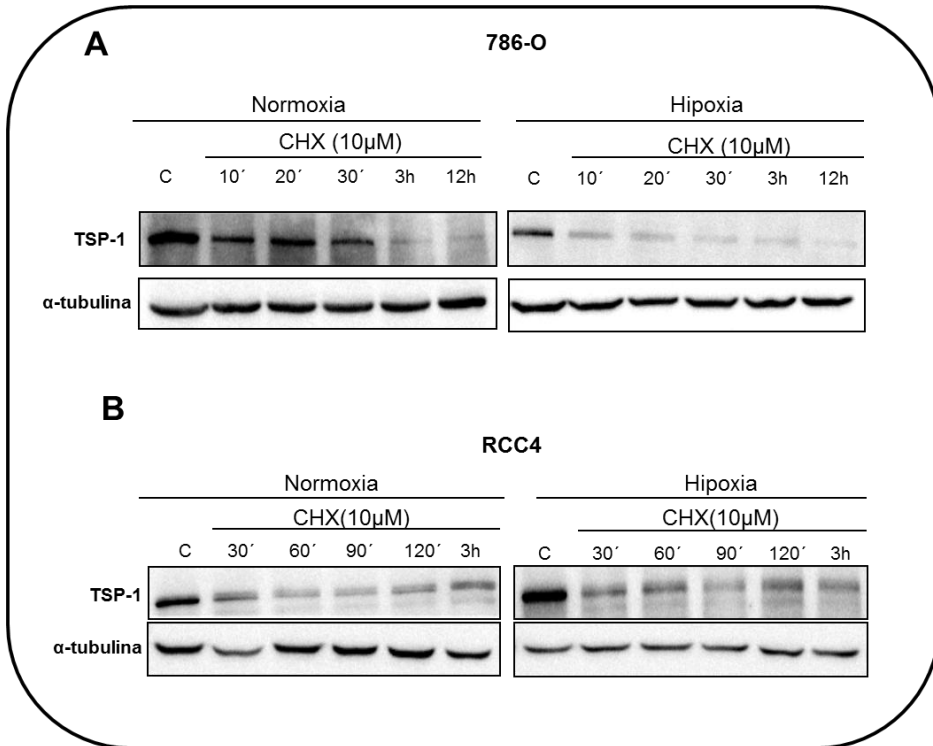


Figura 26. Análisis de la vida media de la TSP-1 en normoxia o hipoxia. Se analizan los niveles de la TSP-1 en células 786-O (A) y RCC4 (B) en ausencia (C) o tras diferentes tiempos de tratamiento con 50 μ g/ml de cicloheximida (CHX) antes de someterlas a normoxia o hipoxia durante 48 horas. Se utiliza α -tubulina como control de carga. Se muestra un experimento representativo de, al menos, tres realizados.

4.4 La hipoxia regula el transporte núcleo- citosol del ARN mensajero de la TSP-1.

Como ya se ha indicado anteriormente, la regulación de la TSP-1 en hipoxia es únicamente a nivel de proteína, mientras que los niveles del mensajero no se ven alterados, indicando por tanto que los mecanismos implicados en dicha regulación pueden ser post-transcripcionales, traduccionales o post-traduccionales. En un trabajo

realizado por Bhattacharyya S. y colaboradores (Bhattacharyya et al. 2008), se demuestra que los niveles de glucosa puede regular los niveles de TSP-1 a nivel de la traducción alterando la fracción de ARN mensajero de TSP-1 unido a la fracción polisómica. Por tanto, nos planteamos si la hipoxia tendría un efecto similar en las ccRCC. Para ello se sometieron las células a 48 horas de hipoxia y tras ese periodo se realizó la separación de la fracción polisómica y no polisómica. El análisis del ARN de TSP-1 en ambas fracciones mostraba una bajada del mismo tanto en la fracción polisómica como en la no polisómica (Figura 27).

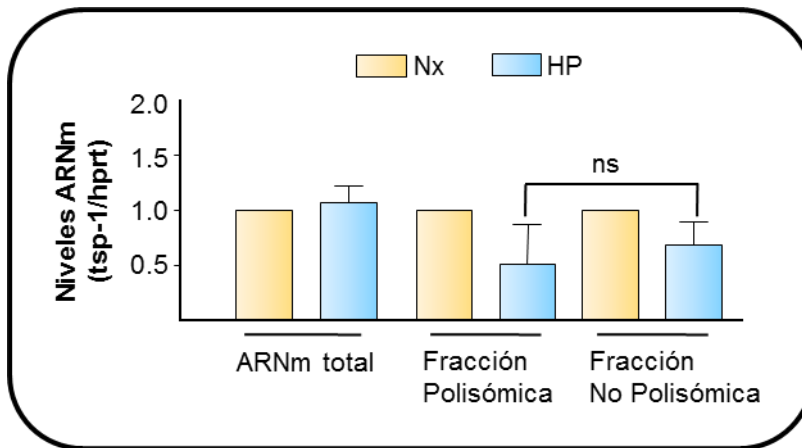


Figura 27. Análisis de los niveles de traducción de la TSP-1. Se analiza la cantidad de ARNm de la TSP-1 en la fracción total, polisómica y no polisómica en células 786-O sometidas durante 48 horas a condiciones de normoxia (Nx) o hipoxia (HP). Se representan la media \pm SD de los niveles de HP relativizados a los de Nx. Como control interno se utiliza la expresión de hprt. Este resultado es la media de tres experimentos realizados. Ns (no significativo)

Una posible explicación a estos resultados sería que se estuviese produciendo un bloqueo en el paso del ARN mensajero del núcleo al

citósol. Para confirmar esta hipótesis se realizó un fraccionamiento núcleo-citósol. Se comprobó que, existiendo la misma cantidad de ARN mensajero total, había una disminución en la cantidad del ARN mensajero de TSP-1 en la fracción citosólica cuando las células eran sometidas a condiciones de hipoxia (Figura 28). Estos resultados por tanto, podrían explicar, al menos parcialmente, la bajada de la TSP-1 en hipoxia, aunque no se descartó la contribución de mecanismos adicionales.

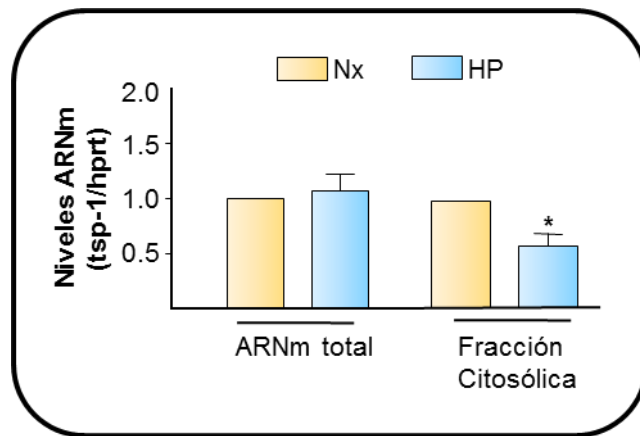


Figura 28. Análisis del transporte núcleo-citósol de la TSP-1. Tras someter a las células 786-O durante 48 horas a condiciones de normoxia (Nx) o hipoxia (HP) se analizó la cantidad de mensajero (ARNm) en lisados totales así como en la fracción citosólica. Como control interno se utiliza hprt. Se muestran los resultados relativizados a los niveles en normoxia. Este resultado es la media de tres experimentos realizados. * ($p \leq 0,05$).

4.5 La disminución de la TSP-1 en hipoxia está modulada por la actividad de las PHDs.

Otra herramienta para estudiar los efectos de la hipoxia es mediante el uso de agentes miméticos de la hipoxia. Uno de estos

agentes es el DMOG, un inhibidor de las prolihidroxilasas (PHDs), que como ya se ha explicado anteriormente son las enzimas implicadas en la hidroxilación de HIF (Epstein et al. 2001) para su posterior reconocimiento por VHL y degradación vía proteosoma {Kallio PJ, 1999 #550}, y por tanto juegan un papel crucial en los procesos de hipoxia. Para estudiar sus efectos en la regulación de la TSP-1, se trataron las células con concentraciones crecientes de DMOG en condiciones de normoxia. Los resultados mostraron que tras el tratamiento se producía una bajada significativa ($p < 0,05$) de los niveles de proteína de TSP-1 dependiente de la concentración de inhibidor (Figura 29).

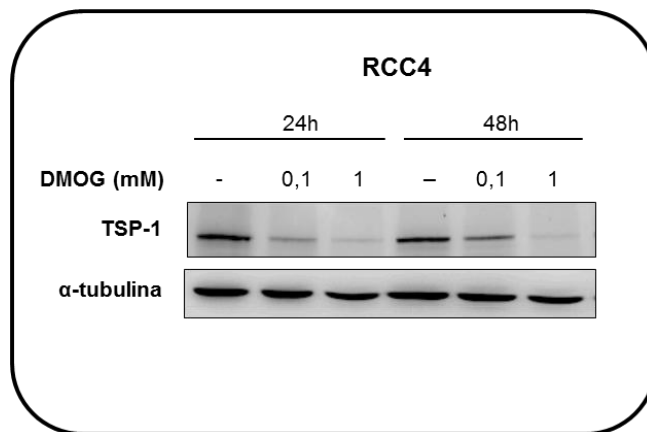


Figura 29. Efecto de la actividad de las PHDs en la regulación de la TSP-1. Análisis de los niveles de la TSP-1 en células RCC4 sin tratar o tratadas con el inhibidor de las PHDs DMOG a las concentraciones que se indican durante 24 y 48 horas. Tras el tratamiento se analizaron los niveles de proteína de la TSP-1. Como control de carga se usa α -tubulina. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos realizados.

Teniendo en cuenta que la inhibición de la actividad de las PHDs en hipoxia es mayor cuanto menor es la concentración de oxígeno, se

sometieron las células a tensiones de oxígeno del 1% y del 0,1% (considerándose esta última como situación de anoxia (Ax)) durante 48 horas. En estas condiciones se observó que la bajada en los niveles de proteína de TSP-1 era mayor cuanto menor era la concentración de oxígeno (Figura 30).

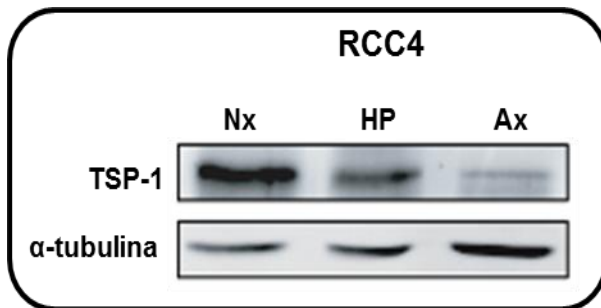


Figura 30. Dosis-respuesta a oxígeno. Análisis de los niveles de la TPS-1 en las células RCC4 sometidas a condiciones de normoxia (Nx), 1% O₂ (HP) o 0,1% O₂ (Ax) durante 48 horas.

Como control de carga se emplea α -tubulina. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos realizados.

Estos resultados sugerían una posible implicación de las PHDs en la regulación de TSP-1. Para confirmarlo se interfirieron las 3 PHDs con ARN de interferencia específicos para cada una de ellas. Los resultados mostraron una clara disminución de los niveles de TSP-1 a nivel de proteína, mientras que los niveles del mensajero no se vieron alterados. (Figura 31).

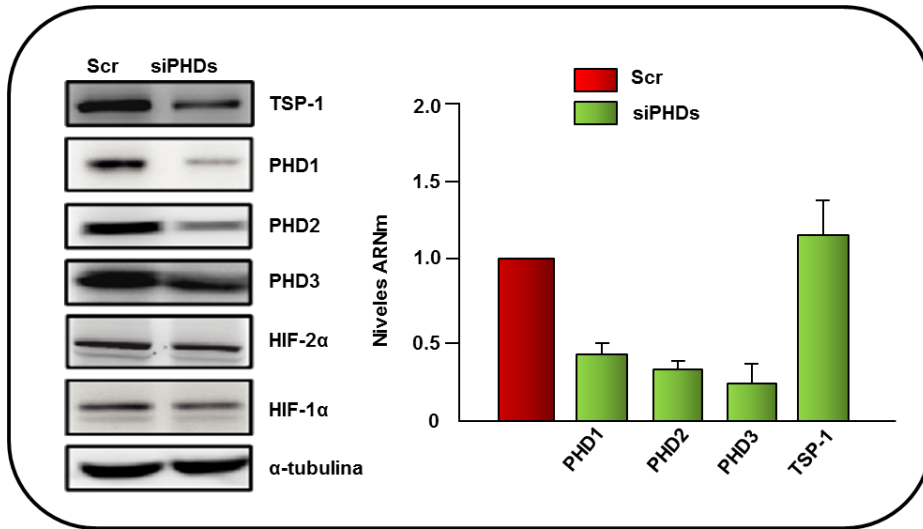


Figura 31. Efecto de la interferencia de las PHDs sobre los niveles de la TSP-1.

Análisis de la proteína de la TSP1, PHD1, PHD2, PHD3, HIF-1 α y HIF-2 α en las células RCC4 tras interferencia con siARN control (scr) o con siARNs específicos para las tres PHDs (siPHDs). Como control se emplea α -tubulina (panel izquierdo). Se muestra un experimento representativo de al menos tres realizados. Análisis de los niveles de ARNm de la TSP-1, PHD1, PHD2 y PHD3 en las mismas condiciones que en el panel izquierdo. Como control interno se emplea la β -actina. Se representa la media \pm SD de al menos tres experimentos (panel derecho).

Por el contrario, cuando se sobre-expresaron las tres PHDs en condiciones de hipoxia se observó una recuperación significativa de los niveles de TSP-1, con respecto a los controles con el vector vacío, aproximándose a los niveles de la proteína en normoxia (Figura 32).

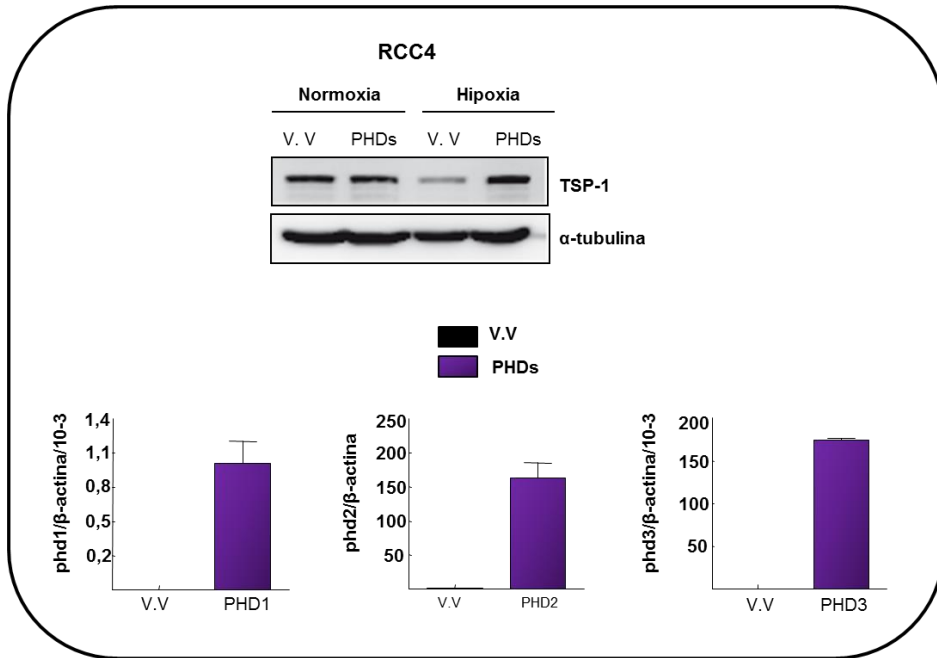


Figura 32. Efecto de la sobreexpresión de las PHDs sobre los niveles de la TSP-1. Análisis de los niveles de la proteína TSP-1 en las células RCC4 tras la tranfección con un vector vacío (V.V) o con vectores específicos para la PHD1, PHD2 y PHD3 (PHDs). Como control se emplea la α -tubulina. Se muestra un experimento representativo de al menos tres realizados (panel superior). Como control de la sobreexpresión se muestran los niveles de ARNm de la PHD1, PHD2 y PHD3. Como control interno se emplea la β -actina. Se representa la media \pm SD de al menos tres experimentos (panel inferior).

4.6 La vía de señalización de Akt contribuye en la regulación de la TSP-1 por la hipoxia.

Para profundizar en el mecanismo por el que las PHDs regulaban TSP-1 se realizaron varios experimentos basados en datos publicados previamente por Álvarez-Tejado y colaboradores. En su trabajo describen que la deferroxamina, un quelante de hierro que inhibe la

actividad de las PHDs, es capaz de aumentar la fosforilación de AKt en condiciones de normoxia (Alvarez-Tejado et al. 2001). Por otra parte, otros autores han demostrado que la hipoxia aumenta los niveles de AKt fosforilado (Kwon et al. 2006). Además, un estudio realizado en células endoteliales adyacentes a tumores de carcinoma renal de célula clara demuestra que la activación de la vía de señalización PI3K/Akt en dichas células disminuye los niveles de TSP-1 (Bussolati et al. 2006). Por tanto, existía la posibilidad de que la hipoxia regulase la TSP-1 a través de las PHDs y AKt.

Para ello, lo primero que se hizo fue estudiar el papel de Akt en la regulación de la TSP-1 por hipoxia en las ccRCC, para lo cual primeramente se trataron las células con LY294002, un inhibidor de la ruta de PI3K/Akt. Las células fueron tratadas con el inhibidor treinta minutos antes de someterlas tanto a condiciones de normoxia como de hipoxia. Estos ensayos mostraron la esperada disminución en los niveles de Akt fosforilado en las células tratadas con dicho inhibidor, mientras que por el contrario mostraron una recuperación notable de los niveles de TSP-1 en condiciones de hipoxia (Figura 33).

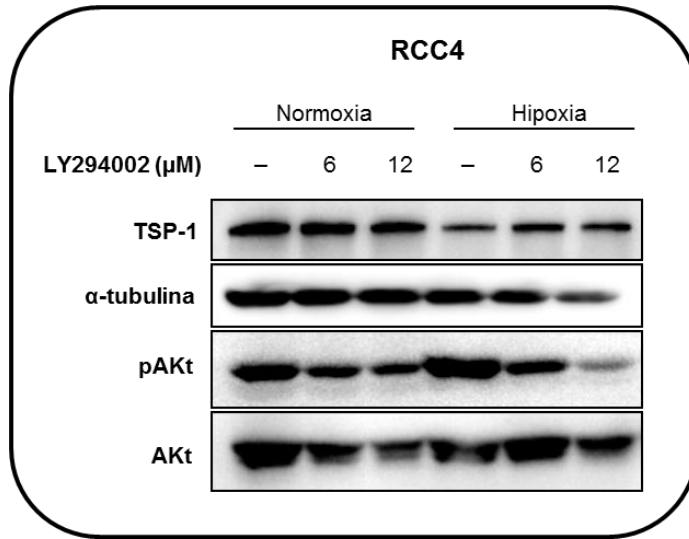


Figura 33. Efecto del inhibidor de PI3K (LY29 4002) en los niveles de la TSP-1. Análisis de los niveles de TSP-1, fosfo-AKt (pAKt) y AKt total (AKt) en las células RCC4 tratadas con el inhibidor de la PI3K, LY294002 a las concentraciones indicadas, 30 minutos antes de someter las células a condiciones de normoxia o hipoxia. Como control se empleó la α -tubulina. Se muestra un experimento representativo de, al menos, tres experimentos realizados.

Sin embargo, con estos resultados no podíamos asegurar que dicha recuperación estuviese mediada por un bloqueo en la señalización mediada por AKt, dado que el LY294002 es un inhibidor de la PI3K y, por ende, de toda la ruta. Para confirmar la implicación de AKt sobreexpresamos en las células una construcción de AKt constitutivamente activo (gag-AKt) y se crecieron las células en condiciones de normoxia. Contrario al efecto del inhibidor de la PI3K, la sobreexpresión de gagAkt produjo una disminución de los niveles de la proteína de TSP-1, mientras que el ARN mensajero permanecía inalterado, tanto en el caso de las RCC4 (Figura 34.A), como en las 786-O (Figura 34.B).

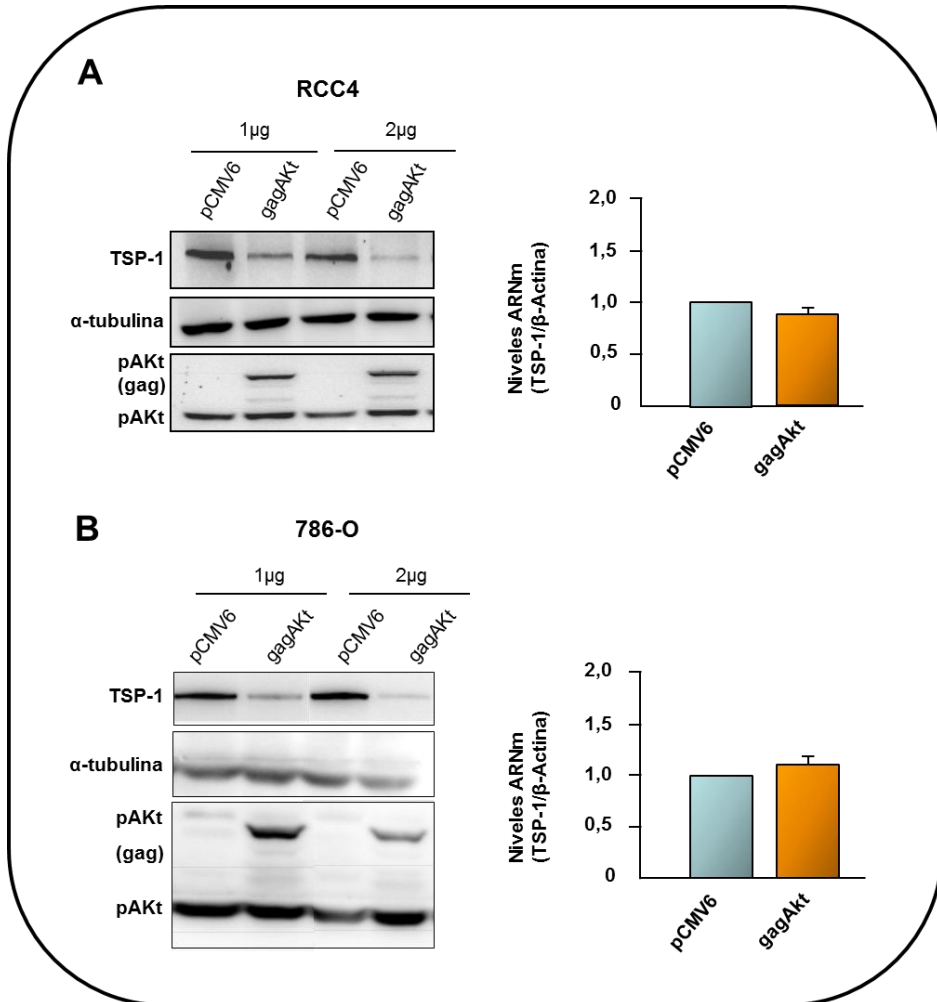


Figura 34. Efecto de la actividad de AKt en los niveles de la TSP-1. Análisis de la proteína (panel izquierdo) o del ARNm (panel derecho) de la TSP-1 en las células RCC4 (A) y 786-O (B) transfectadas con un vector de AKt constitutivamente activo (gagAKt) o con el vector vacío (pCMV6). Para comprobar la eficiencia de la transfección se analizan los niveles de proteína sobreexpresada (gagAKt) y de la forma endógena fosforilada (pAKt). Como control de carga se emplea α-tubulina en western blot y α-actina en la RT-PCR. Se muestra un experimento representativo de, al menos, 4 experimentos realizados.

Está descrito que en ratones que no expresan TSP-1 se observa una disminución de la fosforilación de Akt (Sun J 2009), por tanto, nos planteamos una posible regulación de Akt por parte de TSP. Para ello, se estudió la expresión de la fosforilación de Akt en las células tratadas con un interferente específico para TSP-1, no produciéndose cambios en las células tratadas con respecto al control (Figura 35).

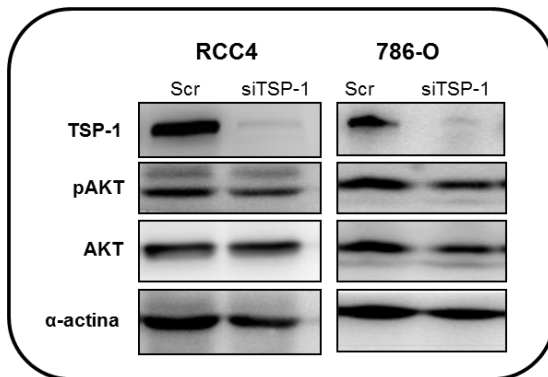


Figura 35. Análisis de la expresión de AKt tras la interferencia de la TSP-1. Se analizan los niveles de la TSP-1, AKt y fosfo-AKt (pAKt) en las células RCC4 y 786-O tratadas con un siARN inespecífico como control (Scr) o con un interferente específico para TSP-1 (siTSP-1).

Como control de carga se emplea α -actina.

Con estos resultados, nos preguntamos si había una relación entre las PHDs y la vía de Akt. Para ello se analizaron los niveles de fosforilación de Akt tanto en los experimentos de interferencia (Figura 31) como de sobreexpresión (Figura 32) de las PHDs. Lo que cabría esperar es que la bajada de TSP-1 tras la interferencia de las PHDs correlacionase a su vez con un aumento en la fosforilación de Akt. Sin embargo, no se produjo cambios en los niveles de fosforilación de Akt (Figura 36.A) ni la sobreexpresión de las PHDs (Figura 36. B).

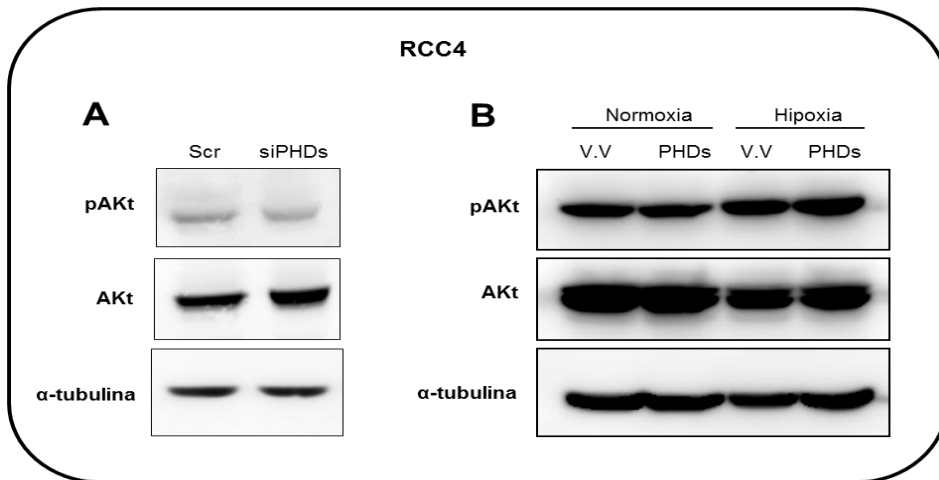


Figura 36. Figura 32. Análisis de la fosforilación de AKt tras la interferencia y sobreexpresión de las PHDs. A) Se analizan los niveles de AKt total (AKt) y AKt fosforilado (pAKt) en las células RCC4 transfectadas con tres interferentes específicos para cada una de las tres PHDs (siPHDs) o con un siARN control (Scr) o en B) células transfectadas con un vector vacío (V.V) o con tres vectores específicos para cada una de las PHDs (PHDs). Se emplea la α -tubulina como control de carga. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos realizados.

Tras confirmar que la regulación de TSP-1 por AKt era independiente de las PHDs, se quiso comprobar si esta regulación tenía lugar a nivel del bloqueo en el transporte del ARN mensajero de TSP-1 del núcleo al citosol. Para ello se realizó el fraccionamiento subcelular núcleo-citosol en células en las cuales se había sobreexpresado la forma constitutivamente activa de AKt (gag-AKt) en condiciones de normoxia. Los resultados de estos experimentos no mostraron diferencias significativas entre los niveles de mensajero citosólicos en condiciones de hipoxia versus normoxia (Figura 37).

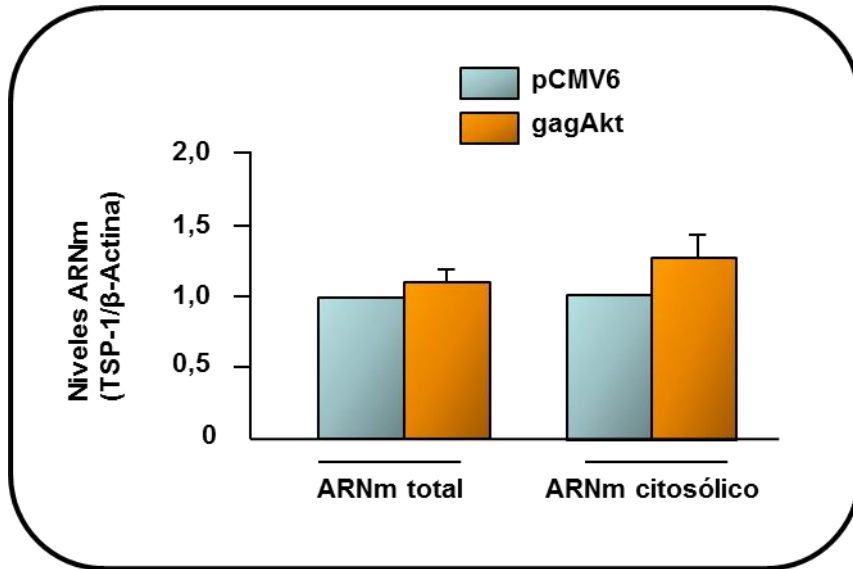


Figura 37. Análisis del ARNm de la TSP-1 en las fracciones subcelulares. Se analizan los niveles de ARNm de la TSP-1 en lisados totales o en la fracción citosólica de las células 786-O transfectadas con gagAKt o con el vector vacío (pCMV6). Como control de carga el gen de hprt. Se muestra media \pm SD de, al menos, cuatro experimentos realizados.

En conjunto, los resultados anteriores indican que la hipoxia activa numerosos mecanismos implicados en la regulación de la TSP-1, siendo esta por tanto una regulación multifactorial.

5. LA REGULACIÓN DE LA TSP-1 EN ccRCC AFECTA SU CAPACIDAD MIGRATORIA E INVASIVA

Para ver el papel que juega la regulación de TSP-1 mediada tanto por la ausencia de VHL como por la hipoxia en las ccRCC se realizaron ensayos *in vitro* de migración e invasión en las distintas condiciones y comparando las células VHL positivas y las negativas.

Primeramente se realizaron experimentos de migración mediante la técnica de “cierre de la herida” o “wound healing” (Figura 38.A) y experimentos de migración a través de membranas de policarbonato en cámaras transwell de cultivo celular usando el 5% de suero como estímulo (Figura 38.B). Con ambas aproximaciones se observó una mayor migración en las células deficientes en VHL funcional con respecto a aquellas en las que se había reintroducido un VHL salvaje.

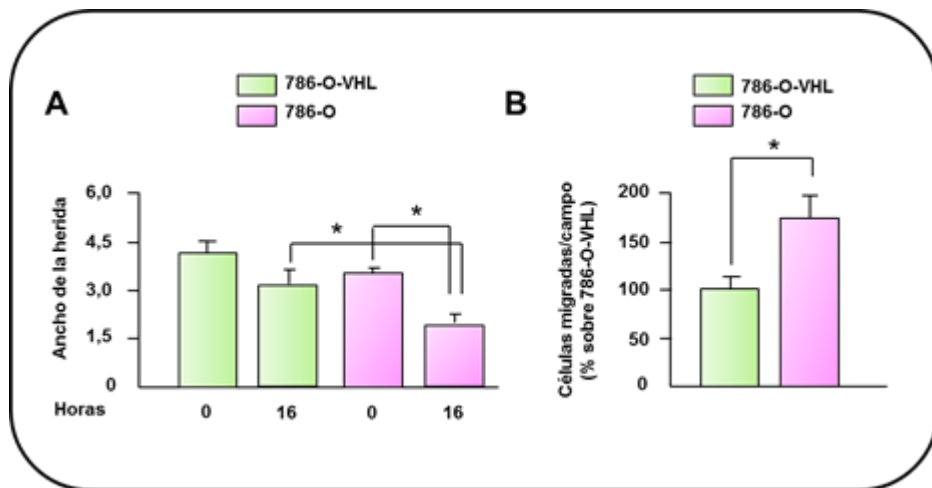


Figura 38. Análisis de la capacidad migratoria de células 786-O. Se analiza la migración en células 786-O mediante la técnica de A) “cierre de la herida” o B) en cámaras transwell. Las gráficas presentadas corresponden a la media \pm SD de ancho de la herida en μm (A) o número de células que han migrado/campo analizado (B). Se analizan tres campos distintos en cada condición de al menos, tres experimentos realizados. * ($p \leq 0,05$)

El siguiente paso fue confirmar que este aumento de la motilidad se debía a la pérdida de TSP-1. Para ello se transfectaron con un ARN de interferencia específico para la TSP-1 (siARN) o con un ARN de interferencia no silenciante o scramble (scr) como control aquellas

células en las que se había sobreexpresado un VHL salvaje, puesto expresan mayores niveles de TSP-1 (Figura 8.B). Una vez comprobada la eficacia del silenciamiento (Figura 39) se hicieron los experimentos de migración tanto con la técnica de wound healing (Figura 40.A) como en transwells (Figura 40.B). En ambos casos se observó un aumento de la migración en aquellas células transfectadas con siARN con respecto a las células transfectadas con scr, siendo dicho aumento comparable a la migración de las células deficientes en VHL funcional.

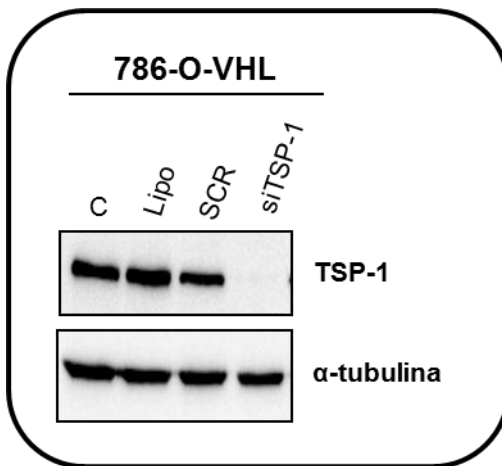


Figura 39. Análisis de los niveles de la TSP-1. Se muestran los niveles de la TSP-1 en células 786-O sin tratar (C), tratadas con lipofectamina (Lipo) o transfectadas con un siARN inespecífico (scr) o específico para la TSP-1 (siTSP-1). Como control de carga se emplea la α -tubulina. Este experimento es representativo de, al menos, tres experimentos realizados.

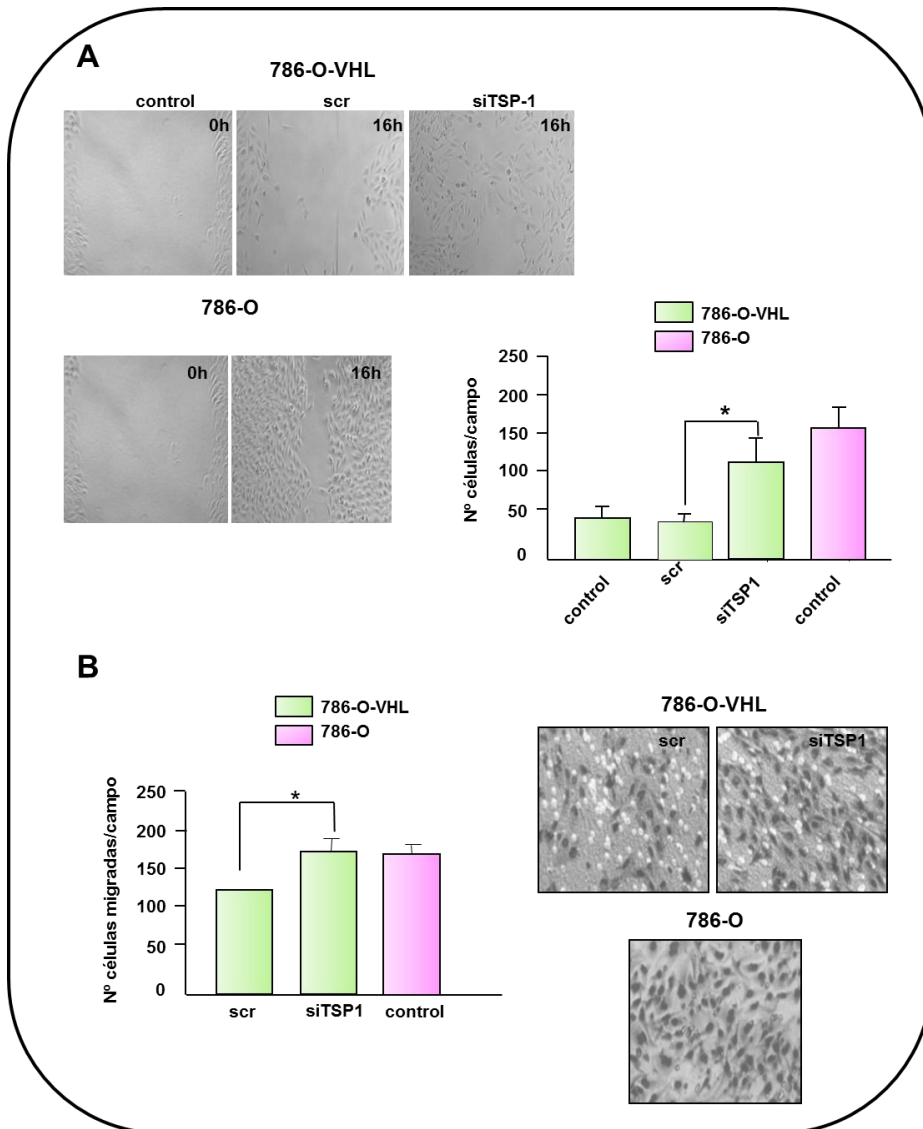


Figura 40. Análisis de la migración de las células 786-O-VHL. Se analiza la migración de células 786-O-pVHL tratadas como en la figura 35 y de las 786-O mediante la técnica de A) “cierre de herida” o B) en cámaras transwell. Se representa en ambos casos media \pm SD del número de células migradas en tres campos distintos, de, al menos, tres experimentos realizados. * ($p \leq 0,05$).

Como contrapartida a la interferencia de la TSP-1, se trataron células deficientes en VHL funcional con TSP-1 purificada con el fin de

augmentar la cantidad de la TSP-1 en estas células. Seguidamente se hicieron los experimentos de migración utilizando como agente quimioatrayente 5% de FBS o LPA. En ambos casos se observó que en presencia de TSP-1 la migración de estas células era menor que la de las células sin tratar (Figura 41).

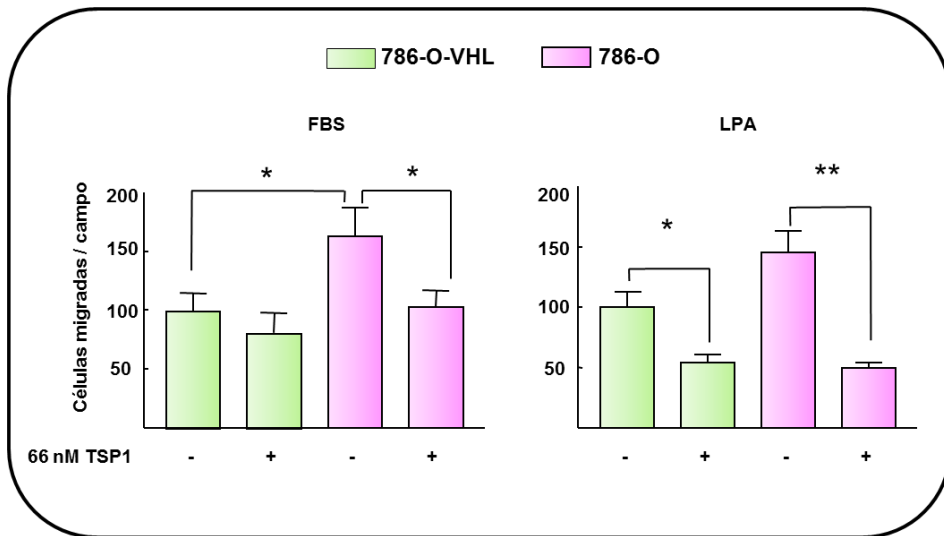


Figura 41. Efecto de los niveles de la TSP-1 sobre la migración celular. Se analizan los niveles de migración estimulados por 5% FBS o 10 μ M LPA en las células 786-O y 786-O-VHL tratadas con 66 nM de TSP-1 o con el vehículo (-). Se representa media \pm SD del número de células migradas tras 16 horas de tratamiento. Experimento representativo de tres experimentos realizados. * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$).

A continuación, y con el fin de analizar si la TSP-1 exógena podía recuperar el fenotipo migratorio de células en las que se había interferido la TSP-1, se hicieron experimentos con células interferidas en presencia o ausencia de TSP-1 exógena. Los resultados de estos experimentos indicaron que efectivamente, en presencia de TSP-1 exógena se revertía

el aumento en la migración observado tras interferir su expresión (Figura 41).

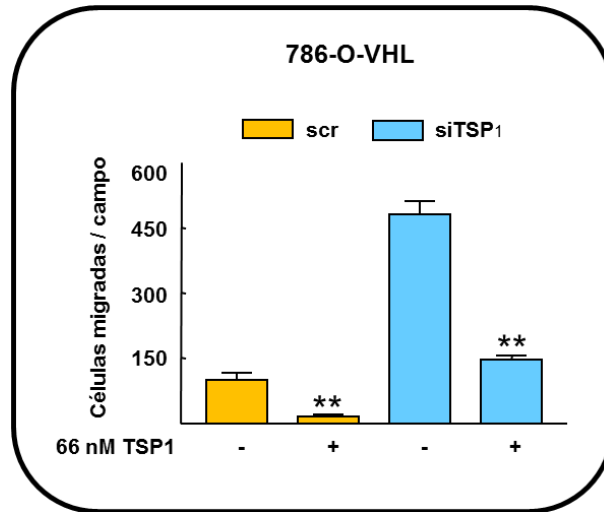


Figura 42. Efecto de la TSP-1 exógena sobre la migración celular. Las células 786-O-pVHL fueron interferidas de igual manera que en la Figura 32, analizándose la migración en transwells de las células sin tratar o tratadas con 66 nM de TSP-1. Se representa la media \pm SD del número de células migradas por campo analizándose al menos tres campos de cada condición. Se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$).

Finalmente se estudió si la hipoxia también afectaba a la migración celular mediante la bajada de la TSP-1. Para ello, se hicieron experimentos de migración con las células de carcinoma renal deficientes en VHL funcional tras haber sido sometidas a condiciones de normoxia o hipoxia durante 48 horas. Al igual que la ausencia de VHL, en hipoxia se observó un aumento en la migración con respecto a las células en normoxia (Figura 43.A). Del mismo modo el tratamiento con la TSP-1 purificada produjo una disminución de la migración de las

células deficientes en VHL funcional sometidas a condiciones de hipoxia, empleándose LPA como quimioatrayente (Figura 43.B).

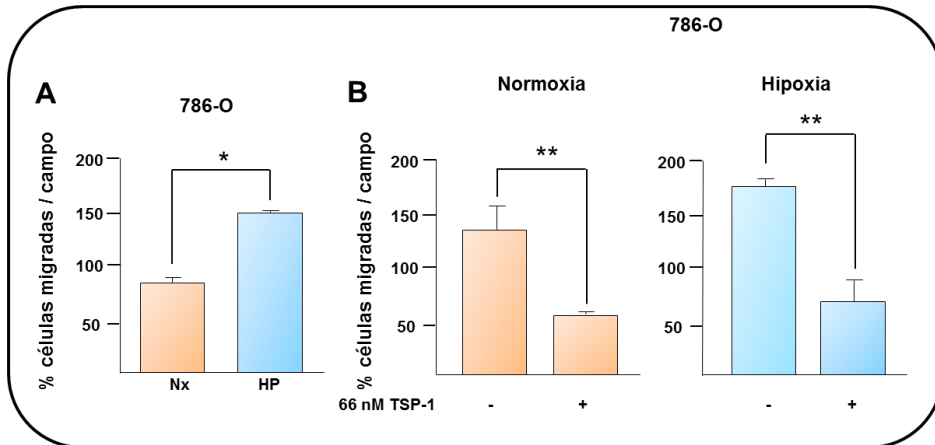


Figura 43. Efecto de la hipoxia y la TSP-1 sobre la migración. Análisis de la migración en transwells de las células 786-O en A) condiciones de normoxia (Nx) o hipoxia (HP) durante 48 horas o B) condiciones de normoxia o hipoxia en ausencia (-) o presencia de 66 nM TSP-1. Se representa media \pm SD del porcentaje de células migradas analizándose al menos tres campos de cada condición. Se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$).

Por último, y dado que nuestros resultados demuestran que los niveles de la TSP-1 en ccRCC regulan su capacidad migratoria, era importante saber si esto afectaba también a su capacidad invasiva. Para ello se realizaron experimentos en transwells con membranas previamente recubiertas con una proteína de membrana basal como es el colágeno I. En estos experimentos también pudimos demostrar una mayor invasión de las células en las cuales se había interferido la TSP-1 con respecto a las células transfectadas con un siARN no interferente o scramble (Figura 44).

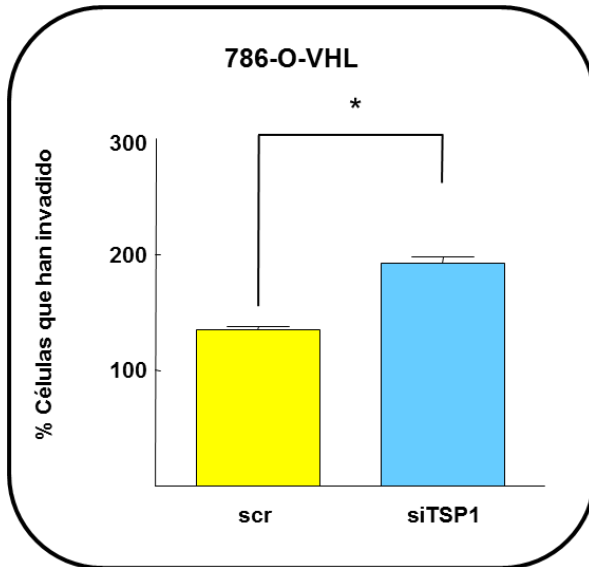


Figura 44. Efecto de la TSP-1 sobre la invasión celular.

Análisis de la capacidad invasiva en transwells recubiertos de colágeno I de las células 786-O-VHL tratadas igual que en la Figura 31. Se analizaron al menos tres campos por cada condición y se representa media \pm SD del porcentaje de células que invaden atravesando la membrana. Se

muestran resultados de al menos tres experimentos realizados. * ($p \leq 0,05$)

En conjunto, estos resultados indican que la TSP-1 tiene un papel autocrino importante limitando la migración de células ccRCC, y por tanto la pérdida de expresión de esta proteína en ausencia de VHL o en condiciones de hipoxia podría considerarse un mecanismo adaptativo de estas células tumorales que beneficiaría su capacidad migratoria e invasiva.

DISCUSIÓN

Los carcinomas renales son la causa más frecuente de tumor maligno de riñón en los adultos. A pesar de los avances en diagnóstico de imagen, los pacientes son diagnosticados en estadios avanzados de la enfermedad. Por tanto, un mejor conocimiento de los marcadores de pronóstico puede ser beneficioso para el diagnóstico precoz de esta enfermedad.

La inactivación de genes supresores de tumores puede influir directamente en el fenotipo angiogénico de estos tumores, puesto que se altera el balance existente entre los factores pro y anti-angiogénicos, produciéndose un aumento en la secreción de los primeros. Por otro lado, las condiciones ambientales de los tumores, como la hipoxia, favorecen la expresión de aquellos genes implicados en la progresión tumoral, entre los que se incluyen genes implicados en angiogénesis, proliferación celular, proteínas implicadas en la unión célula-célula y célula-matriz extracelular. Además la hipoxia también está implicada en la disminución de genes que inhiben el crecimiento tumoral y la angiogénesis (revisado en (Calzada y del Peso 2007)). Nuestros estudios en células de carcinoma renal de célula clara indican que tanto la pérdida de la expresión de VHL como el microambiente hipóxico inducen una disminución en los niveles de la proteína de la TSP-1, cuya función como inhibidor de angiogénesis y crecimiento tumoral ha sido documentada en otros estudios (Henkin y Volpert 2011). Sin embargo, y a pesar de que VHL es un componente central de la vía canónica de regulación por oxígeno, nuestros resultados demuestran que VHL y la hipoxia no concurren en la misma vía para regular la TSP-1, comportándose como dos mecanismos de regulación independientes.

La regulación de la TSP-1 en nuestros modelos celulares de ccRCC demuestra ser importante para el desarrollo de estos carcinomas, correlacionando con un aumento de la migración y la invasividad de estas líneas tumorales. Estos resultados apoyan otros descritos anteriormente en los que se destacó también la importancia de TSP-1 en los carcinomas renales (Bussolati et al. 2006; Veliceasa et al. 2007; Zubac et al. 2009). En estos artículos se demuestra que la TSP-1 es importante para el mantenimiento de la angiostasis del riñón sano y su expresión se correlaciona de forma inversa con la densidad de la microvasculatura, proliferación y progresión tumoral de los carcinomas renales. Sin embargo, en ninguno de ellos se relaciona esta regulación de la TSP-1 con la ausencia de VHL o con la hipoxia. En esta línea, Veliceasa y sus colaboradores mostraron que la secreción de la TSP-1 estaba disminuida en las células de carcinoma renal comparado con la secreción en células de epitelio renal sano. Los autores demuestran que la disminución en la secreción era debida a cambios en la concentración de calcio causados por un déficit en la regulación del transportador de calcio TRCP4 (Veliceasa et al. 2007). Sin embargo, estos resultados no explican nuestros datos, en los que observamos una disminución de la TSP-1 tanto en lisados totales como en la proteína secretada al medio extracelular en células deficientes en VHL comparado con aquellas en las que se ha sobreexpresado un VHL salvaje. Tampoco explican las diferencias que encontramos entre normoxia e hipoxia, a pesar de que la hipoxia altera la concentración de calcio intracelular (Shimoda LA 2006). Por otro lado, nuestros datos confirman la ausencia de un problema en la secreción de la TSP-1 dado que no se observaron cambios en la cantidad de la TSP-1 existente en el interior de las células. Esto nos indica que deben existir otros mecanismos adicionales,

dependientes de VHL y de la hipoxia, aunque independientes entre sí, responsables de la bajada de los niveles de la TSP-1.

Un hecho importante durante el desarrollo tumoral es la degradación de la matriz extracelular para favorecer la migración. Por otro lado, la TSP-1 es una proteína que es degradada por metaloproteinasas (MMPs) (Iruela-Arispe 2008), algunas de las cuales se ven aumentadas en ausencia de pVHL o en hipoxia (Hatipoglu et al. 2009; Struckmann et al. 2008). Sin embargo nuestros resultados indicaban que un aumento de la degradación de la matriz extracelular no explicaría la disminución de la TSP-1, puesto que no se observó una recuperación de los niveles de la TSP-1 cuando las células fueron tratadas con inhibidores de las MMPs. Además la TSP-1 también puede ser degradada por otras proteasas como son la trombina, la catepsina G, elastasas, plasmina, y ADAMTS-1 (Iruela-Arispe 2008). Aunque no se hicieron análisis para confirmar que alguna de estas proteasas estuviese degradando la TSP-1, no observamos cambios significativos en el patrón de bandas que indicasen un aumento en la degradación de la TSP-1 tanto en ausencia de pVHL como en hipoxia. Por tanto, la degradación extracelular de la TSP-1 no parece ser el mecanismo responsable de su disminución en ausencia de pVHL, aunque no podemos descartar otros mecanismos intracelulares que regulen la cantidad de proteína de forma diferencial en hipoxia o en ausencia de pVHL.

Entre las causas descritas que regulan los niveles de la TSP-1 a nivel intracelular, podemos destacar la regulación positiva mediada por genes supresores de tumores como son p53 y PTEN (Dameron et al. 1994; Wen et al. 2001) o la regulación negativa por oncogenes, incluyendo Myc, Ras e Id1 (Volpert et al. 2002; Watnick et al. 2003).

Con respecto a esto, Zubac y colaboradores han demostrado que no existe una correlación positiva entre la expresión de la TSP-1 y p53 en las células de carcinoma renal de célula clara (Zubac et al. 2009). Además, en experimentos realizados en nuestro laboratorio donde se analizaron los niveles de p53 en nuestras líneas celulares, no se demuestran diferencias significativas en las distintas líneas celulares deficientes en VHL versus las que lo están sobreexpresando. Tampoco se observan cambios en las células VHL deficientes sometidas a hipoxia con respecto a la normoxia (resultados no incluidos en esta tesis). Por tanto, esto nos indica que la regulación de la TSP-1 tanto en las células que expresan la forma salvaje de VHL como en hipoxia no parece ser dependiente de p53, aunque para confirmar esto harían falta experimentos en los que se analizaran la actividad de dicho gen supresor de tumores. Por otro lado, en el 15% de los casos de carcinoma renal se ha observado la metilación de las islas CpG del ARN mensajero de la TSP-1, lo que produce el silenciamiento del gen (Li Q 1999). Este mecanismo tampoco explicaría la bajada que observamos en nuestras células, ya que no observamos cambios significativos en el ARN mensajero. Por el contrario se demuestra de forma clara que la ausencia de VHL o su mutación afectan de forma negativa a los niveles de proteína de la TSP-1.

Una de las funciones mejor descritas de pVHL es su papel como ubiquitin ligasa dentro del complejo E3-ubiquitina, participando en la degradación de HIF por la vía del proteosoma (Maxwell et al. 1999). Sin embargo pVHL no sólo se ha visto implicada en procesos de degradación, sino que también se ha descrito un posible papel como proteína estabilizadora, impidiendo la ubiquitinación de determinadas proteínas por otros complejos ubiquitin ligasas y su posterior

degradación por el proteosoma (Guo et al. 2009; Galban et al. 2003; Roe et al. 2006; Zhou et al. 2004; Zhou et al. 2002). Aunque esta nueva función de pVHL pueda explicar el aumento de TSP-1 en las células que expresan la forma salvaje de pVHL, en nuestros experimentos de inmunoprecipitación no hemos podido probar que exista interacción entre ambas moléculas. Además, experimentos realizados con inhibidores del proteosoma no demostraron la recuperación de la TSP-1, sino que por el contrario se observó una mayor disminución cuando las células se trataron con dichos inhibidores. Esto se podría explicar si existiese una molécula que se degradase vía proteosoma y que a su vez regulase negativamente la TSP-1. Dicha molécula no parece ser HIF, puesto que nuestros resultados mostraron que la regulación de la TSP-1 es HIF-independiente. Algunos autores han demostrado que existe una regulación de VEGF mediada por TSP-1 (Kaur S 2010). Por otro lado, se ha descrito que VEGF regula vías de señalización en las cuales se incluye la vía de Akt, existiendo además una regulación recíproca entre ambas (Dimmeler S 2000; Tsai CH 2012). Teniendo esto en cuenta, cabría la posibilidad de que VEGF pudiese estar regulando la TSP-1 a través de Akt. Sin embargo, nuestros resultados sólo demostraron la implicación de Akt en la regulación de la TSP-1 en condiciones de hipoxia versus normoxia y en ausencia de pVHL, no observándose esta al comparar células que expresaban pVHL versus pVHL deficientes.

La pérdida o ganancia de un gen supresor de tumores tiene efectos muy significativos en el comportamiento o desarrollo de los tumores, sin embargo, otro factor no menos importante a tener en cuenta es el microambiente en el cual se desarrolla dicho tumor. El aumento en la angiogénesis tumoral en respuesta a hipoxia forma parte de una

respuesta adaptativa cuya finalidad es aumentar el aporte de oxígeno y nutrientes al tumor que se está desarrollando. En este sentido, la disminución en la TSP-1 que observamos en nuestras células tumorales en respuesta a hipoxia podría ser también parte del programa tumoral estimulado por la hipoxia. La disminución de la TSP-1 en respuesta a hipoxia también ha sido demostrada en otros modelos tumorales y en células inmortalizadas (Laderoute et al. 2000; Tenan et al. 2000). Por el contrario la hipoxia produce un aumento en los niveles de la TSP-1 en células endoteliales, células de musculatura lisa y en fibroblastos (Distler et al. 2007; Osada-Oka et al. 2008; Phelan et al. 1998; Polotsky et al. 2010). Estos resultados indican que la TSP-1 podría afectar al desarrollo tumoral induciendo diferentes funciones biológicas en los distintos tipos celulares cuando se dan condiciones de hipoxia. Así en células endoteliales la inducción de la TSP-1 podría ser un mecanismo de regulación para contrarrestar el aumento de angiogénesis mediado por el incremento de los factores que la inducen en hipoxia, como VEGF. Por el contrario, las células tumorales en hipoxia disminuyen los niveles de la TSP-1 para poder crecer y sobrevivir. Así, los mecanismos que regulan esta proteína en hipoxia también pueden ser muy distintos dependiendo del tipo celular, encontrándose que puede producir un aumento en la estabilidad del mensajero (Phelan et al. 1998), o incluso pueden inducir una regulación transcripcional mediada por HIF-1 α (Distler et al. 2007; Osada-Oka et al. 2008). Por el contrario, la hipoxia disminuye los niveles de la TSP-1 mediante mecanismos post-transcripcionales (Laderoute et al. 2000; Tenan et al. 2000). Se han descrito sólo unos pocos genes que se reprimen en hipoxia de forma dependiente de HIF (Chen et al. 2005b; Wen et al. 2010). Sin embargo, existe un mayor número de genes que se reprimen en hipoxia de forma

HIF-independiente. En este sentido, hay estudios experimentales recientes y estudios realizados mediante análisis bioinformáticos a partir de las bases de datos GEO que han identificado posibles sitios HRE de HIF, demostrando ambos que la unión de HIF a estos sitios está asociada principalmente a la inducción génica, mientras que la represión mediada directamente por HIF no parece probable (Mole et al. 2009; Ortiz-Barahona et al. 2010). Esto es en parte consistente con nuestros resultados donde se demuestra que la disminución de la TSP-1 en hipoxia es un mecanismo independiente de HIF. Por tanto, en nuestras células tumorales la regulación de la TSP-1 en hypoxia podría incluir mecanismos no transcripcionales o mecanismos que afectan a la traducción de la proteína o bien a modificaciones post-traduccionales. En este sentido se ha descrito que los extremos 3' y 5' UTR están implicados en la regulación post-transcripcional de la TSP-1, bien afectando su estabilidad o inhibiendo su traducción (McGray et al. 2010). Sin embargo nuestros estudios de gen reportero no indicaban actividad diferencial de los extremos 3' y 5' UTR entre normoxia e hipoxia (resultados no incluidos en esta tesis). También se consideró la regulación de la TSP-1 por microARNs, en concreto por los del conjunto miR-17-92, dado que en modelos de adenocarcinoma se ha descrito su implicación en la regulación de la TSP-1 (Dews et al. 2006) y además uno de los miARNs de este grupo, el miR21, se induce en hipoxia (Liu et al. 2011; Polytarchou et al. 2011). Sin embargo, el análisis de los niveles de algunos de estos miARN en nuestras líneas celulares en condiciones de normoxia o hipoxia no demostró inducción de estos en hipoxia (resultados no incluidos en la tesis). Esto indicaría por tanto, que la bajada de la TSP-1 en hipoxia no está regulada por microARNs, o al menos por los que se han ensayado. Entre los mecanismos post-

transcripcionales que regulan la TSP-1 también podríamos incluir aquellos que regulan su traducción. En este sentido se ha descrito que algunos tipos de células endoteliales en respuesta a concentraciones altas de glucosa disminuyen la cantidad de ARNm de la TSP-1 que se une a la fracción polisómica, disminuyendo por tanto su traducción (Bhattacharyya et al. 2008). Por tanto cabía la posibilidad de que en hipoxia la TSP-1 se regulase por un mecanismo similar. Sin embargo, al analizar la cantidad de la TSP-1 unida a la fracción polisómica y no polisómica se observó que ambas fracciones estaban disminuidas en hipoxia, a pesar de no haber cambios en el ARNm total. Esta disminución en ambas fracciones en condiciones de hipoxia apuntaba a una disminución del ARNm en la fracción citosólica, lo que nos indicaba una posible deficiencia en el transporte del ARNm del núcleo al citosol, la cual se pudo corroborar con fraccionamientos núcleo citosol. Aunque las diferencias no eran notables, no se puede descartar que este mecanismo sea un elemento más que esté contribuyendo a la bajada de la TSP-1 en hipoxia en nuestras líneas celulares.

Otro de los mecanismos descritos que regulan la TSP-1 es la fosforilación de ciertas quinasas. Algunos autores han observado que la fosforilación de la quinasa Akt disminuye los niveles de la TSP-1 tanto a nivel de mensajero como de proteína en células endoteliales (Bussolati et al. 2006; Niu et al. 2004). Por otro lado, también se ha descrito una regulación inversa de Akt mediada por la TSP-1 (Sun J 2009). Es posible por tanto que existiese un bucle de regulación Akt/TSP-1 y que ambas estuviesen regulando sus niveles de forma recíproca. Nuestros resultados demostraron que el aumento de la fosforilación de Akt en hipoxia afectó de forma negativa a los niveles de proteína de la TSP-1, sin afectar su

ARNm ni su transporte al citosol. Sin embargo, los experimentos de interferencia de la TSP-1 no demostraron la existencia de una regulación inversa de Akt mediada por cambios en los niveles de la TSP-1. Es posible que para poder estudiar cambios sutiles en la fosforilación de Akt sea necesario deprivar las células durante el desarrollo del experimento. Sin embargo la susceptibilidad de estas células a la ausencia de nutrientes durante períodos largos hacía inviable la realización del mismo. Por otro lado, se ha descrito que el tratamiento con deferroxamina, un inhibidor de las PHDs, aumenta la fosforilación de Akt (Alvarez-Tejado et al. 2001), además la actividad de las PHDs está disminuida en hipoxia (Ehrismann et al. 2007). Teniendo esto en cuenta nuestra hipótesis era que la hipoxia regulase la actividad de las PHDs, estas a su vez la fosforilación de Akt y por último esto afectase a los niveles de la TSP-1. Sin embargo, aunque nuestros resultados mostraron una disminución de los niveles de la TSP-1 tanto al tratar con inhibidores de las PHDs como al interferir la expresión de las PHDs en normoxia, no observamos cambios en los niveles de fosforilación de Akt ni al interferir las PHDs ni al sobreexpresarlas. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que las PHDs pueden al menos contrarrestar los efectos negativos de la hipoxia y de la fosforilación de Akt sobre los niveles de la TSP-1. Si bien se han descrito otras dianas de las PHDs a parte de HIF, el efecto de la hidroxilación en las mismas no está tan claro como en el caso de HIF (Jokilehto y Jaakkola 2010). En este sentido, nuestros resultados son interesantes y novedosos, puesto que describirían una nueva diana de las PHDs y, por otro lado, indicarían un papel de estas enzimas en el comportamiento de los tumores independientes de HIF. Estudios futuros dirigidos a comprender los mecanismos por los cuales las PHDs y Akt regulan la TSP-1 en

condiciones de hipoxia serían de gran ayuda para comprender la biología de estos tumores.

Por último, es importante destacar que la regulación negativa de la TSP-1 tiene una relevancia funcional en las líneas de carcinoma renal estudiadas. El análisis de los experimentos demostró que la TSP-1 regula negativamente la migración de una manera autocrina, es decir, sobre la propia célula, ya que al disminuir la expresión de la TSP-1, mediante ARN de interferencia, o bien cuando se hicieron los experimentos en condiciones de hipoxia, con la consiguiente disminución de la TSP-1, se observó un aumento en la migración de las células. Es interesante destacar que cuando la TSP-1 se utilizó como agente quimioatrayente en el pocillo inferior del Transwell, ésta estimuló la migración celular, aunque su efecto era muy inferior (menor al 10%) con respecto a la migración inducida con LPA o 5% FBS. Dicho resultado nos indica que la TSP-1 también puede estimular migración de estas células. El efecto quimioatrayente de la TSP-1 ha sido demostrado anteriormente en tumores bucales (Motegi K 2008). También en tumores de mama generados en ratones que expresan la forma salvaje de la TSP-1 se observa un aumento de la migración con respecto a la de los mismos tumores generados en ratones deficientes en la TSP-1. Sin embargo, cuando estos tumores se trataron con péptidos sintéticos que contenían el dominio de repetición tipo 1 de la TSP-1 se produce una disminución del crecimiento del tumor primario y la metástasis (Yee et al. 2009). Esto indica que la TSP-1 puede tener un efecto dual en el crecimiento tumoral, dependiendo de si actúa de forma autocrina o paracrina. Esta diferencia de efectos de la TSP-1 sobre las distintas líneas celulares también puede ser debida a la compleja estructura de dicha molécula y a

los múltiples receptores a los que se puede unir para actuar sobre la migración. Así se ha demostrado que la estimulación de la migración en células de músculo liso vascular está regulada por el extremo N-terminal, las repeticiones tipo 3 y el extremo C-terminal (Nesselroth SM 2001). Sin embargo, en células de carcinoma epidérmico el aumento de la migración está regulado por las repeticiones tipo EGF (Factor de crecimiento epidérmico) o las repeticiones tipo 2 (Liu A. et al. 2008).

Como conclusión a este trabajo se puede decir que las células tumorales desarrollan mecanismos que favorecen su supervivencia en determinadas condiciones adversas. Así en ausencia de oxígeno promueven el aumento de los factores pro-angiogénicos mientras que disminuyen los niveles de aquellos que impiden el proceso de angiogénesis. En los tumores renales de célula clara, tanto la ausencia de pVHL como la hipoxia producen una disminución de la TSP-1 a nivel de proteína, pero no de ARNm. Así mismo demostramos que la hipoxia puede estimular varias vías de señalización que contribuyen a la disminución de los niveles de la TSP-1 en los carcinomas renales de célula clara, produciendo un aumento en la capacidad de migración de dichas células. Aunque hacen falta más experimentos para dilucidar el mecanismo exacto por el cuál pVHL y la hipoxia regulan la TSP-1, esta regulación afecta al comportamiento tumoral, y por tanto, un mayor conocimiento de la regulación de la TSP-1 en estos carcinomas contribuirá al diseño de nuevas terapias antitumorales.

CONCLUSIONES

- 1. La pérdida de pVHL produce una disminución de la expresión de proteína de la TSP-1, no observándose regulación a nivel del ARN mensajero, siendo por tanto una regulación a nivel post-transcripcional.**
- 2. Los mecanismos por los cuales pVHL regula la expresión de la TSP-1 no implican una interacción directa entre ambas.**
- 3. La hipoxia disminuye igualmente los niveles de proteína de la TSP-1, sin cambios en su ARN mensajero.**
- 4. Estudios de la regulación de la TSP-1 por pVHL y por hipoxia indican que son dos vías independientes de regulación.**
- 5. La pérdida de pVHL o la hipoxia disminuye los niveles de la TSP-1 sin afectar su secreción al medio extracelular.**
- 6. La pérdida de pVHL o la hipoxia disminuye los niveles de la TSP-1 sin aumentar su degradación.**
- 7. La inducción de los factores de transcripción HIF-1 α y HIF-2 α por la pérdida de pVHL o por la hipoxia no está implicada en la regulación de la TSP-1.**
- 8. La hipoxia regula de manera multifactorial los niveles de proteína de la TSP-1 a través de las PHDs, AKt y mediante**

la inhibición del transporte del núcleo al citosol de su ARN mensajero.

9. La disminución de la TSP-1 en los carcinomas renales de célula clara regula de forma autocrina la capacidad migratoria e invasiva de estas líneas tumorales, aumentando ambas frente a los diferentes estímulos analizados.

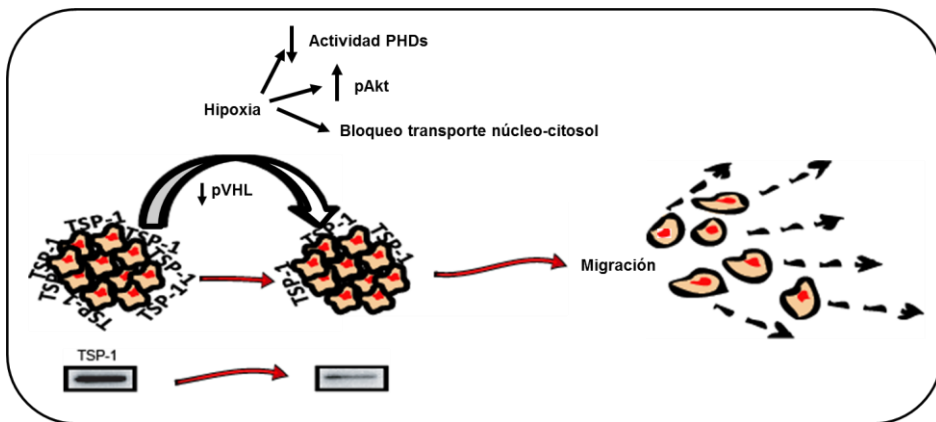


Figura 41. Regulación de la TSP-1 por pVHL y la hipoxia, y su implicación en la biología de los carcinomas renales de célula clara. La pérdida de pVHL y la hipoxia disminuyen los niveles de proteína de la TSP-1, pero no los de ARN mensajero, siendo en el caso de la hipoxia una regulación multifactorial mediada en parte por la disminución de la actividad de las PHDs, un aumento de los niveles de fosforilación de Akt y una disminución en el transporte del ARNm del núcleo al citosol. Dicha regulación afecta a la capacidad invasiva y migratoria de las células de carcinoma renal de célula clara.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams J LJ** (1993) Extracellular matrix: the thrombospondin family. *Curr Biol* 3(3): 188-190
- Adams JC** (2001) Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 25-51.
- Adams JC**, Lawler J (2004) The thrombospondins. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 961-968.
- Adams JC LJ** (2011) The thrombospondins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a009712
- Almeida AM**, Campos A, Francisco R, van Harten S, Cardoso LA, Coelho AV (2010) Proteomic investigation of the effects of weight loss in the gastrocnemius muscle of wild and NZW rabbits via 2D-electrophoresis and MALDI-TOF MS. *Anim Genet* 41: 260-272
- Alvarez-Tejado M**, Naranjo-Suarez S, Jimenez C, Carrera AC, Landazuri MO, del Peso L (2001) Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway in PC12 cells: protective role in apoptosis. *J Biol Chem* 276: 22368-22374
- Ang SO CH**, Gordeuk VR, Sergueeva AI, Polyakova LA, Miasnikova GY, Kralovics R, Stockton DW, Prchal JT (2002) Endemic polycythemia in Russia: mutation in the VHL gene. *Blood Cells Mol Dis* 28(1): 57-62
- Baenziger NL BG**, Majerus PW (1971) A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proc Natl Acad Sci* 68(1): 240-243
- Baenziger NL BG**, Majerus PW (1972) Isolation and properties of a thrombin-sensitive protein of human platelets. *J Biol Chem* 247(9): 2723-2731
- Bhattacharyya S**, Marinic TE, Krukovets I, Hoppe G, Stenina OI (2008) Cell type-specific post-transcriptional regulation of production of

- the potent antiangiogenic and proatherogenic protein thrombospondin-1 by high glucose. *J Biol Chem* 283: 5699-5707
- Bornstein P** (1992) Thrombospondins: structure and regulation of expression. *FASEB J* 6: 3290-3299
- Bornstein P** (1995) Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol* 130: 503-506
- Bruick RK**, McKnight SL (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294: 1337-1340.
- Bussolati B**, Assenzio B, Deregibus MC, Camussi G (2006) The proangiogenic phenotype of human tumor-derived endothelial cells depends on thrombospondin-1 downregulation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Mol Med* 84: 852-863
- Calzada MJ** (2010) Von Hippel-Lindau syndrome: molecular mechanisms of the disease. *Clin Transl Oncol* 12: 160-165
- Calzada MJ**, del Peso L (2007) Hypoxia-inducible factors and cancer. *Clin Transl Oncol* 9: 278-289
- Calzada MJ**, Esteban MA, Feijoo-Cuaresma M, Castellanos MC, Naranjo-Suarez S, Temes E, Mendez F, Yanez-Mo M, Ohh M, Landazuri MO (2006) von Hippel-Lindau tumor suppressor protein regulates the assembly of intercellular junctions in renal cancer cells through hypoxia-inducible factor-independent mechanisms. *Cancer Res* 66: 1553-1560.
- Calzada MJ**, Kuznetsova SA, Sipes JM, Rodrigues RG, Cashel JA, Annis DS, Mosher DF, Roberts DD (2008) Calcium indirectly regulates immunochemical reactivity and functional activities of the N-domain of thrombospondin-1. *Matrix Biol* 27: 339-351
- Calzada MJ**, Sipes JM, Krutzsch HC, Yurchenco PD, Annis DS, Mosher DF, Roberts DD (2003) Recognition of the N-terminal modules

of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 by $\alpha_6\beta_1$ integrin. *J Biol Chem* 278: 40679-40687.

Carlson CB LJ, Mosher DF (2008) Structures of thrombospondins. *Cell Mol Life Sci* 65: 672-686

Clark P (2009) The role of VHL in clear-cell renal cell carcinoma and its relation to targeted therapy. *Kidney Int* 76(9): 939-945

Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH (2000) Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 275: 25733-25741.

Chandrasekaran L, He CZ, Al-Barazi H, Krutzsch HC, Iruela-Arispe ML, Roberts DD (2000) Cell contact-dependent activation of $\alpha_3\beta_1$ integrin modulates endothelial cell responses to thrombospondin-1. *Mol Biol Cell* 11: 2885-2900.

Chen J, Somanath PR, Razorenova O, Chen WS, Hay N, Bornstein P, Byzova TV (2005a) Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo. *Nat Med* 11: 1188-1196.

Chen KF, Lai YY, Sun HS, Tsai SJ (2005b) Transcriptional repression of human cad gene by hypoxia inducible factor-1 α . *Nucleic Acids Res* 33: 5190-5198

Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N (1994) The p53 tumor suppressor gene inhibits angiogenesis by stimulating the production of thrombospondin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59: 483-489

Davidowitz EJ, Schoenfeld AR, Burk RD (2001) VHL induces renal cell differentiation and growth arrest through integration of cell-cell and cell-extracellular matrix signaling. *Mol Cell Biol* 21: 865-874.

- Dews M**, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Sevignani C, Wentzel E, Furth EE, Lee WM, Enders GH, Mendell JT, Thomas-Tikhonenko A (2006) Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet* 38: 1060-1065
- Dimmeler S DE**, Zeiher AM (2000) Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett* 477: 258-262
- Distler JH**, Jungel A, Pileckyte M, Zwerina J, Michel BA, Gay RE, Kowal-Bielecka O, Matucci-Cerinic M, Schett G, Marti HH, Gay S, Distler O (2007) Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 56: 4203-4215
- Domi R LH** (2012) Management of pheochromocytoma: old ideas and new drugs. *Niger J Clin Pract* 15(3): 253-257
- Ehrismann D**, Flashman E, Genn DN, Mathioudakis N, Hewitson KS, Ratcliffe PJ, Schofield CJ (2007) Studies on the activity of the hypoxia-inducible-factor hydroxylases using an oxygen consumption assay. *Biochem J* 401: 227-234
- 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, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2001) *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107: 43-54.
- Esteban-Barragan MA**, Avila P, Alvarez-Tejado M, Gutierrez MD, Garcia-Pardo A, Sanchez-Madrid F, Landazuri MO (2002) Role of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in the formation of beta1-integrin fibrillar adhesions. *Cancer Res* 62: 2929-2936.

Esteban MA, Tran MG, Harten SK, Hill P, Castellanos MC, Chandra A, Raval R, O'Brien T S, Maxwell PH (2006) Regulation of E-cadherin expression by VHL and hypoxia-inducible factor. *Cancer Res* 66: 3567-3575.

Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420: 629-635.

Evans AJ, Russell RC, Roche O, Burry TN, Fish JE, Chow VW, Kim WY, Saravanan A, Maynard MA, Gervais ML, Sufan RI, Roberts AM, Wilson LA, Betten M, Vandewalle C, Berx G, Marsden PA, Irwin MS, Teh BT, Jewett MA, Ohh M (2007) VHL promotes E2 box-dependent E-cadherin transcription by HIF-mediated regulation of SIP1 and snail. *Mol Cell Biol* 27: 157-169. Epub 2006 Oct 2023.

Faller DV (1999) Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 74-84.

Feijoo-Cuaresma M, Mendez F, Maqueda A, Esteban MA, Naranjo-Suarez S, Castellanos MC, del Cerro MH, Vazquez SN, Garcia-Pardo A, Landazuri MO, Calzada MJ (2008) Inadequate activation of the GTPase RhoA contributes to the lack of fibronectin matrix assembly in von Hippel-Lindau protein-defective renal cancer cells. *J Biol Chem* 283: 24982-24990

Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16: 4604-4613.

Foster RE AM, Morris MR, Prigmore E, Gribble S, Ng B, Gentle D, Ready S, Weston PM, Wiesener MS, Kishida T, Yao M, Davison V, Barbero JL, Chu C, Carter NP, Latif F, Maher ER (2007)

Characterization of a 3;6 translocation associated with renal cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 46(4): 311-317

Fukata M, Nakagawa M, Kaibuchi K (2003) Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr Opin Cell Biol* 15: 590-597.

Galban S, Martindale JL, Mazan-Mamczarz K, Lopez de Silanes I, Fan J, Wang W, Decker J, Gorospe M (2003) Influence of the RNA-binding protein HuR in pVHL-regulated p53 expression in renal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 23: 7083-7095

Gao L QW, Wang Y, Xu W, Xu J, Tong J. (2006) Sublytic complement C5b-9 complexes induce thrombospondin-1 production in rat glomerular mesangial cells via PI3-k/Akt: association with activation of latent transforming growth factor-beta1. *Clin Exp Immunol* 144(2): 326-334

Gebhard RL CR, Prigge WF, Figenshau R, Staley NA, Reese C, Bear A (1987) Abnormal cholesterol metabolism in renal clear cell carcinoma. *J Lipid Res* 28(10): 1177-1184

Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NP (1990) A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 6624-6628

Greenaway J LJ, Moorehead R, Bornstein P, Lamarre J, Petrik J (2007) Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1). *J Cell Physiol* 210(3): 807-818

Grignon DJ CM (2005) Clear cell renal cell carcinoma. *Clin Lab Med* 25(2): 305-316

- Guo Y, Schoell MC, Freeman RS (2009)** The von Hippel-Lindau protein sensitizes renal carcinoma cells to apoptotic stimuli through stabilization of BIM(EL). *Oncogene* 28: 1864-1874
- Gupta K GP, Wild R, Ramakrishnan S, Hebbel RP (1999)** Binding and displacement of vascular endothelial growth factor (VEGF) by thrombospondin: effect on human microvascular endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Angiogenesis* 3(2): 147-158
- Harten SK, Shukla D, Barod R, Hergovich A, Balda MS, Matter K, Esteban MA, Maxwell PH (2009)** Regulation of renal epithelial tight junctions by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene involves occludin and claudin 1 and is independent of E-cadherin. *Mol Biol Cell* 20: 1089-1101
- Hatipoglu OF, Hirohata S, Cilek MZ, Ogawa H, Miyoshi T, Obika M, Demircan K, Shinohata R, Kusachi S, Ninomiya Y (2009)** ADAMTS1 is a unique hypoxic early response gene expressed by endothelial cells. *J Biol Chem* 284: 16325-16333
- Henkin J, Volpert OV (2011)** Therapies using anti-angiogenic peptide mimetics of thrombospondin-1. *Expert Opin Ther Targets*, pp. 1369-1386
- Hergovich A, Lisztwan J, Barry R, Ballschmieter P, Krek W (2003)** Regulation of microtubule stability by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein pVHL. *Nat Cell Biol* 5: 64-70.
- Hoffman MA, Ohh M, Yang H, Klco JM, Ivan M, Kaelin WG, Jr. (2001)** von Hippel-Lindau protein mutants linked to type 2C VHL disease preserve the ability to downregulate HIF. *Hum Mol Genet* 10: 1019-1027.

- Höglund M GD**, Soller M, Hansen GB, Elfving P, Mitelman F (2004) Dissecting karyotypic patterns in renal cell carcinoma: an analysis of the accumulated cytogenetic data. *Cancer Genet Cytogenet* 153(1): 1-9
- Huang LE**, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF (1996) Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 271: 32253-32259
- Iruela-Arispe** (2008) Regulation of thrombospondin1 by extracellular proteases. *Curr Drug Targets* 9: 863-868
- Isenberg JS**, Romeo MJ, Yu C, Yu CK, Nghiem K, Monsale J, Rick ME, Wink DA, Frazier WA, Roberts DD (2008) Thrombospondin-1 stimulates platelet aggregation by blocking the antithrombotic activity of nitric oxide/cGMP signaling. *Blood* 111: 613-623
- Jaakkola P**, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001) Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292: 468-472.
- Jaffe E BP**, Disteché CM (1990) Mapping of the thrombospondin gene to human chromosome 15 and mouse chromosome 2 by in situ hybridization. *Genomics* 7: 123-126
- Jiang BH**, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL (1996) Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271: 17771-17778
- Jimenez B**, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N (2000) Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med* 6: 41-48.

- John AS**, Hu X, Rothman VL, Tuszynski GP (2009) Thrombospondin-1 (TSP-1) up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) production in human tumor cells: exploring the functional significance in tumor cell invasion. *Exp Mol Pathol* 87: 184-188
- Jokilehto T**, Jaakkola PM (2010) The role of HIF prolyl hydroxylases in tumour growth. *J Cell Mol Med* 14: 758-770
- Kaelin WG, Jr.** (2004) The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and kidney cancer. *Clin Cancer Res* 10: 6290S-6295S.
- Kang JH KS**, Hong KJ (2006) Induction of TSP1 gene expression by heat shock is mediated via an increase in mRNA stability. *FEBS Lett* 580(2): 510-516
- Kaur S M-MG**, Pendrak ML, Garfield SH, Isenberg JS, Roberts DD (2010) Thrombospondin-1 inhibits VEGF receptor-2 signaling by disrupting its association with CD47. *J Biol Chem* 285(50): 38923-38932
- Kazerounian S YK**, Lawler J (2008) Thrombospondins in cancer. *Cell Mol Life Sci* 65: 700-712
- Kim MS OY**, Lee S, Kim JE, Kim KH, Chung JH (2006) Ultraviolet radiation attenuates thrombospondin 1 expression via PI3K-Akt activation in human keratinocytes. *Photochem Photobiol* 82(3): 645-650
- Koochekpour S**, Jeffers M, Wang PH, Gong C, Taylor GA, Roessler LM, Stearman R, Vasselli JR, Stetler-Stevenson WG, Kaelin WG, Jr., Linehan WM, Klausner RD, Gnarr JR, Vande Woude GF (1999) The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene inhibits hepatocyte growth factor/scatter factor-induced invasion and branching morphogenesis in renal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 19: 5902-5912.
- Kurban G**, Hudon V, Duplan E, Ohh M, Pause A (2006) Characterization of a von Hippel Lindau pathway involved in

extracellular matrix remodeling, cell invasion, and angiogenesis. *Cancer Res* 66: 1313-1319.

Kwon DS, Kwon CH, Kim JH, Woo JS, Jung JS, Kim YK (2006) Signal transduction of MEK/ERK and PI3K/Akt activation by hypoxia/reoxygenation in renal epithelial cells. *Eur J Cell Biol* 85: 1189-1199

Laderoute KR, Alarcon RM, Brody MD, Calaoagan JM, Chen EY, Knapp AM, Yun Z, Denko NC, Giaccia AJ (2000) Opposing effects of hypoxia on expression of the angiogenic inhibitor thrombospondin 1 and the angiogenic inducer vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 6: 2941-2950.

Landazuri MO, Vara-Vega A, Viton M, Cuevas Y, del Peso L (2006) Analysis of HIF-prolyl hydroxylases binding to substrates. *Biochem Biophys Res Commun* 351: 313-320

Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L, et al. (1993) Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 260: 1317-1320

Lawler J SM, Thibert V, Duquette M, George EL, Rayburn H, Hynes RO (1998) Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *J Clin Invest* 101: 982-992

Li Q AN, Burger PC, Issa JP (1999) Methylation and silencing of the Thrombospondin-1 promoter in human cancer. *Oncogene* 18: 3284-3289

Lieubeau-Teillet B, Rak J, Jothy S, Iliopoulos O, Kaelin W, Kerbel RS (1998) von Hippel-Lindau gene-mediated growth suppression and induction of differentiation in renal cell carcinoma cells grown as multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 58: 4957-4962.

- Linehan WM WM**, Zbar B (2003) The genetic basis of cancer of the kidney. *J Urol* 170: 2163-2172
- Liu LZ**, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y, Kung HF, Lai L, Jiang BH (2011) MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1alpha expression. *PLoS One* 6: e19139
- Lolkema MP**, Mehra N, Jorna AS, van Beest M, Giles RH, Voest EE (2004) The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein influences microtubule dynamics at the cell periphery. *Exp Cell Res* 301: 139-146.
- Maher ER**, Kaelin WG, Jr. (1997) von Hippel-Lindau disease. *Medicine (Baltimore)* 76: 381-391.
- Maher ER NH**, Richard S (2011) von Hippel-Lindau disease: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet* 19(6): 617-623
- Makino Y**, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A, Poellinger L (2001) Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 414: 550-554
- Martin-Manso G**, Galli S, Ridnour LA, Tsokos M, Wink DA, Roberts DD (2008) Thrombospondin 1 promotes tumor macrophage recruitment and enhances tumor cell cytotoxicity of differentiated U937 cells. *Cancer Res* 68: 7090-7099
- Masson N**, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001) Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *Embo J* 20: 5197-5206.
- Maxwell PH**, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399: 271-275.

- Mazan-Mamczarz K**, Hagner PR, Corl S, Srikantan S, Wood WH, Becker KG, Gorospe M, Keene JD, Levenson AS, Gartenhaus RB (2008) Post-transcriptional gene regulation by HuR promotes a more tumorigenic phenotype. *Oncogene* 27: 6151-6163
- McGray AJ**, Gingerich T, Petrik JJ, Lamarre J (2010) Regulation of thrombospondin-1 expression through AU-rich elements in the 3'UTR of the mRNA. *Cell Mol Biol Lett* 16: 55-68
- Misenheimer TM MD** (1995) Calcium ion binding to thrombospondin 1. *J Biol Chem* 270(4): 1729-1733
- Mole DR**, Blancher C, Copley RR, Pollard PJ, Gleadle JM, Ragoussis J, Ratcliffe PJ (2009) Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem* 284: 16767-16775
- Motegi K HK**, Ohe G, Jones SJ, Ellis IR, Crouch DH, Schor SL, Schor AM (2008) Differential involvement of TGF-beta1 in mediating the motogenic effects of TSP-1 on endothelial cells, fibroblasts and oral tumour cells. *Exp Cell Res* 314(13): 2323-2333
- Nathan V Lee MS**, 2 Douglas S Annis,3 Joseph A Loo,4 Lily Wu,2 Deane F Mosher,3 and M Luisa Iruela-Arispe (2006) ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2. *EMBO J* 25: 5270-5283
- Nesselroth SM WA**, Fuse S, Olson ET, Lawler J, Sumpio BE, Gahtan V (2001) The C-terminal domain of thrombospondin-1 induces vascular smooth muscle cell chemotaxis. *J Vasc Surg* 33: 595-600
- Niu Q**, Perruzzi C, Voskas D, Lawler J, Dumont DJ, Benjamin LE (2004) Inhibition of Tie-2 signaling induces endothelial cell apoptosis, decreases Akt signaling, and induces endothelial cell expression of the

endogenous anti-angiogenic molecule, thrombospondin-1. *Cancer Biol Ther* 3: 402-405

Nucera C PA, Antonello ZA, Mekel M, Nehs MA, Giordano TJ, Gerald D, Benjamin LE, Priolo C, Puxeddu E, Finn S, Jarzab B, Hodin RA, Pontecorvi A, Nose V, Lawler J, Parangi S (2010) B-Raf(V600E) and thrombospondin-1 promote thyroid cancer progression. *Proc Natl Acad Sci* 107(23): 10649-10654

Ohh M, Yauch RL, Lonergan KM, Whaley JM, Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN, Gavin BJ, Kley N, Kaelin WG, Jr., Iliopoulos O (1998) The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol Cell* 1: 959-968.

Ortiz-Barahona A, Villar D, Pescador N, Amigo J, del Peso L (2010) Genome-wide identification of hypoxia-inducible factor binding sites and target genes by a probabilistic model integrating transcription-profiling data and in silico binding site prediction. *Nucleic Acids Res* 38: 2332-2345

Osada-Oka M, Ikeda T, Akiba S, Sato T (2008) Hypoxia stimulates the autocrine regulation of migration of vascular smooth muscle cells via HIF-1alpha-dependent expression of thrombospondin-1. *J Cell Biochem* 104: 1918-1926

Patard JJ R-LN, Masson D, Zerrouki S, Jouan F, Collet N, Dubourg C, Lobel B, Denis M, Fergelot P (2009) Absence of VHL gene alteration and high VEGF expression are associated with tumour aggressiveness and poor survival of renal-cell carcinoma. *Br J Cancer* 101(8): 1417-1424

Phelan MW, Forman LW, Perrine SP, Faller DV (1998) Hypoxia increases thrombospondin-1 transcript and protein in cultured endothelial cells. *J Lab Clin Med* 132: 519-529.

- Polotsky VY**, Savransky V, Bevans-Fonti S, Reinke C, Li J, Grigoryev DN, Shimoda LA (2010) Intermittent and Sustained Hypoxia Induce a Similar Gene Expression Profile in the Human Aortic Endothelial Cells. *Physiol Genomics*
- Polytarchou C**, Iliopoulos D, Hatziapostolou M, Kottakis F, Maroulakou I, Struhl K, Tschlis PN (2011) Akt2 regulates all Akt isoforms and promotes resistance to hypoxia through induction of miR-21 upon oxygen deprivation. *Cancer Res* 71: 4720-4731
- Raman P**, Krukovets I, Marinic TE, Bornstein P, Stenina OI (2007) Glycosylation mediates up-regulation of a potent antiangiogenic and proatherogenic protein, thrombospondin-1, by glucose in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 282: 5704-5714
- Richard S GB**, Couvé S, Gad S. (2012) Von Hippel-Lindau: How a rare disease illuminates cancer biology. *Semin Cancer Biol*
- Ro C CW**, E Yu V, Yu R (2012) Pancreatic neuroendocrine tumors: biology, diagnosis, and treatment. *Chin J Cancer*
- Roberts DD** (1996) Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1. *FASEB J* 10: 1183-1191
- Roberts DD** MT, Rogers NM, Yao M, Isenberg JS (2012) The extracellular matrix protein thrombospondin-1 globally regulates cardiovascular function and responses to stress via CD47. *Matrix Biol* 31(3): 162-169
- Roe JS**, Kim H, Lee SM, Kim ST, Cho EJ, Youn HD (2006) p53 stabilization and transactivation by a von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell* 22: 395-405.
- Seizinger BR** RG, Ozelius LJ, Lane AH, Farmer GE, Lamiell JM, Haines J, Yuen JW, Collins D, Majoor-Krakauer D, et al (1988) Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature* 332(6161): 268-269

- Shimoda LA WJ**, Sylvester JT (2006) Ca²⁺ channels and chronic hypoxia. *Microcirculation* 13(8): 657-670
- Sid B LB**, Sartelet H, Bellon G, Dedieu S, Martiny L (2008) Thrombospondin-1 enhances human thyroid carcinoma cell invasion through urokinase activity. *Int J Biochem Cell Biol* 40(9): 1890-1900
- Soula-Rothhut M CC**, Sartelet H, Boudot C, Bellon G, Martiny L, Rothhut B (2005) The tumor suppressor PTEN inhibits EGF-induced TSP-1 and TIMP-1 expression in FTC-133 thyroid carcinoma cells. *Exp Cell Res* 304(1): 187-201
- Stenina OI**, Krukovets I, Wang K, Zhou Z, Forudi F, Penn MS, Topol EJ, Plow EF (2003) Increased expression of thrombospondin-1 in vessel wall of diabetic Zucker rat. *Circulation* 107: 3209-3215
- Struckmann K**, Mertz K, Steu S, Storz M, Staller P, Krek W, Schraml P, Moch H (2008) pVHL co-ordinately regulates CXCR4/CXCL12 and MMP2/MMP9 expression in human clear-cell renal cell carcinoma. *J Pathol* 214: 464-471
- Sufan RI JM**, Ohh M (2004) The role of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia in renal clear cell carcinoma. *Am J Physiol Renal Physiol* 287(1): F1-6
- Sun J HB**, Tsujikawa K, Perruzzi C, Adini I, Swerlick R, Bornstein P, Lawler J, Benjamin LE (2009) Thrombospondin-1 modulates VEGF-A-mediated Akt signaling and capillary survival in the developing retina. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296(5): H1344-1351
- Tenan M**, Fulci G, Albertoni M, Diserens AC, Hamou MF, El Atifi-Borel M, Feige JJ, Pepper MS, Van Meir EG (2000) Thrombospondin-1 is downregulated by anoxia and suppresses tumorigenicity of human glioblastoma cells. *J Exp Med* 191: 1789-1798.

- Tsai CH CY**, Chen HT, Huang PH, Hsu HC, Tang CH (2012) High glucose induces vascular endothelial growth factor production in human synovial fibroblasts through reactive oxygen species generation. *Biochim Biophys Acta S0304-4165*: 00378-00379
- Veliceasa D**, Ivanovic M, Hoepfner FT, Thumbikat P, Volpert OV, Smith ND (2007) Transient potential receptor channel 4 controls thrombospondin-1 secretion and angiogenesis in renal cell carcinoma. *FEBS J* 274: 6365-6377
- Volpert OV**, Pili R, Sikder HA, Nelius T, Zaichuk T, Morris C, Shiflett CB, Devlin MK, Conant K, Alani RM (2002) Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1. *Cancer Cell* 2: 473-483.
- Wang GL**, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5510-5514
- Wang GL**, Semenza GL (1993) Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 82: 3610-3615
- Wang J WL**, Lu W, Sylvester JT, Semenza GL, Shimoda LA. (2006) Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca²⁺ in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 98(12): 1528-1537
- Watnick RS**, Cheng YN, Rangarajan A, Ince TA, Weinberg RA (2003) Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 3: 219-231

- Wen S**, Stolarov J, Myers MP, Su JD, Wigler MH, Tonks NK, Durden DL (2001) PTEN controls tumor-induced angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4622-4627
- Wen W**, Ding J, Sun W, Wu K, Ning B, Gong W, He G, Huang S, Ding X, Yin P, Chen L, Liu Q, Xie W, Wang H (2010) Suppression of cyclin D1 by hypoxia-inducible factor-1 via direct mechanism inhibits the proliferation and 5-fluorouracil-induced apoptosis of A549 cells. *Cancer Res* 70: 2010-2019
- Wenger RH** (2002) Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *Faseb J* 16: 1151-1162.
- Wu MP YM**, Tzeng CC, Tzeng CR, Huang KF, Wu LW, Chou CY (2008) A novel role of thrombospondin-1 in cervical carcinogenesis: inhibit stroma reaction by inhibiting activated fibroblasts from invading cancer. *Carcinogenesis* 29(6): 1115-1123
- Yee KO**, Connolly CM, Duquette M, Kazerounian S, Washington R, Lawler J (2009) The effect of thrombospondin-1 on breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 114: 85-96
- Yee KO SM**, Hawighorst T, Detmar M, Lawler J (2004) Expression of the type-1 repeats of thrombospondin-1 inhibits tumor growth through activation of transforming growth factor-beta. *Am J Pathol* 165(2): 541-552
- Zhou L PD**, Ra YS, Li M, Northcott PA, Hu Y, Stearns D, Hawkins C, Taylor MD, Rutka J, Der SD, Huang A (2010) Silencing of thrombospondin-1 is critical for myc-induced metastatic phenotypes in medulloblastoma. *Cancer Res* 70(20): 8199-8210
- Zhou MI**, Wang H, Foy RL, Ross JJ, Cohen HT (2004) Tumor suppressor von Hippel-Lindau (VHL) stabilization of Jade-1 protein

occurs through plant homeodomains and is VHL mutation dependent.
Cancer Res 64: 1278-1286

Zhou MI, Wang H, Ross JJ, Kuzmin I, Xu C, Cohen HT (2002) The von Hippel-Lindau tumor suppressor stabilizes novel plant homeodomain protein Jade-1. J Biol Chem 277: 39887-39898

Zubac DP, Bostad L, Kihl B, Seidal T, Wentzel-Larsen T, Haukaas SA (2009) The expression of thrombospondin-1 and p53 in clear cell renal cell carcinoma: its relationship to angiogenesis, cell proliferation and cancer specific survival. J Urol 182: 2144-2149

ANEXO I

El trabajo presentado en esta tesis doctoral se haya fundamentalmente descrito en el siguiente artículo:

Bienes-Martínez R, Ordoñez A, Feijóo-Cuaresma M, Corral-Escariz M, Mateo G, Stenina O, Jiménez B, Calzada MJ. “Autocrine stimulation of clear-cell renal carcinoma cell migration in hypoxia via HIF-independent suppression of thrombospondin-1”. Sci Rep. 2012 Nov 9.

Durante este periodo de formación el doctorando ha participado en las siguientes contribuciones científicas:

Reyes-Martin P, Ramirez-Rubio S, Parra-Cid T, **Bienes-Martínez R**, Lucio-Cazana J. “15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin-J(2) up-regulates cyclooxygenase-2 but inhibits prostaglandin-E(2) production through a thiol antioxidant-sensitive mechanism”. Pharmacol Res. 2008 May; 57(5):344-50.

Olmos G, Arenas MI, **Bienes R**, Calzada MJ, Aragonés J, Garcia-Bermejo ML, Landazuri MO, Lucio-Cazaña J. “15-Deoxy-Delta (12,14)-prostaglandin-J(2) reveals a new pVHL-independent, lysosomal-dependent mechanism of HIF-1alpha degradation”. Cell Mol Life Sci. 2009 Jul; 66 (13):2167-80

ANEXO II



Autocrine stimulation of clear-cell renal carcinoma cell migration in hypoxia via HIF-independent suppression of thrombospondin-1

Raquel Bienes-Martínez^{1*}, Angel Ordóñez^{1*}, Mónica Feijoo-Cuaresma¹, María Corral-Escariz¹, Gloria Mateo¹, Olga Stenina², Benilde Jiménez³ & María J. Calzada¹

¹Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IP), Department of Medicine, Universidad Autónoma of Madrid, Madrid, Spain, ²Department of Molecular Cardiology, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH, USA, ³Department of Biochemistry, Universidad Autónoma of Madrid and Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC-UAM, Madrid, Spain.

Received
24 July 2012

Accepted
4 October 2012

Published
9 November 2012

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.J.C. (mcalzada.hlpr@salud.madrid.org)

* These authors contributed equally to this work.

Thrombospondin-1 is a matricellular protein with potent antitumour activities, the levels of which determine the fate of many different tumours, including renal carcinomas. However, the factors that regulate this protein remain unclear. In renal carcinomas, hypoxic conditions enhance the expression of angiogenic factors that help adapt tumour cells to their hostile environment. Therefore, we hypothesized that anti-angiogenic factors should correspondingly be dampened. Indeed, we found that hypoxia decreased the thrombospondin-1 protein in several clear cell renal carcinoma cell lines (ccRCC), although no transcriptional regulation was observed. Furthermore, we proved that hypoxia stimulates multiple signals that independently contribute to diminish thrombospondin-1 in ccRCC, which include a decrease in the activity of oxygen-dependent prolylhydroxylases (PHDs) and activation of the PI3K/Akt signalling pathway. In addition, thrombospondin-1 regulation in hypoxia proved to be important for ccRCC cell migration and invasion.

Clear cell renal cell carcinomas (ccRCC) are highly vascularized tumours, in part due to the increase in the levels of angiogenic factors associated with these tumours, such as the vascular endothelial growth factor (VEGF)¹. The angiogenic factors associated with these carcinomas are mostly regulated by the hypoxia-inducible transcription factors, HIFs (reviewed in²). These factors are stabilized in ccRCC in which the von Hippel-Lindau (*vhl*) tumour suppressor gene is lost or mutated, or when oxygen availability is decreased. Diminished oxygen availability is a common feature of malignant tumours and in fact, it is regarded as trigger for enhanced proliferation and metastasis. The hypoxia generated during tumour growth involves a cell adaptive response aimed at restoring the oxygen supply and maintaining cell viability². Most responses to hypoxia are mediated through the specific gene expression programs regulated by HIFs, heterodimeric transcription factors composed of a constitutively expressed beta subunit (HIF β) and an oxygen-regulated alpha subunit (HIF α). In normoxic conditions HIF α subunits are extremely unstable and their integrity is dependent on hydroxylation by oxygen-dependent prolyl hydroxylases (PHD1, PHD2 and PHD3)^{3,4}. These enzymes require molecular oxygen as co-substrate for their catalytic activity, and they are therefore believed to act as oxygen sensors that directly control HIF stability/activity in response to variations in oxygenation. Under normoxic conditions, HIF α proteins are hydroxylated on specific residues and then polyubiquitinated by the VHL-E3 ubiquitin ligase complex, provoking their degradation by the proteasome^{5,6}. However, while HIFs control most hypoxic responses, other HIF-independent responses to hypoxia have been described^{7,8}.

Hypoxia alters the balance between pro- and anti-angiogenic factors, favoring the stimulation of angiogenesis⁹. Therefore, enhanced angiogenesis in response to hypoxia is part of an adaptive response aimed at achieving increased oxygen and nutrient delivery to growing tissues. Although the regulation of genes that inhibit angiogenesis is also important in order to maintain tumour homeostasis, little attention has been paid to the effects of hypoxia in the regulation of anti-angiogenic factors. One of the best known inhibitors of angiogenesis is the matricellular protein thrombospondin-1 (TSP-1)^{10,11}. TSP-1 is a multifunctional protein that belongs to a family of five extracellular matrix proteins with similar structures¹². TSP-1 was the first endogenous angiogenesis



inhibitor identified, and its expression is considered critical for the maintenance of an anti-angiogenic microenvironment. Indeed, TSP-1 loss is associated with tumour metastasis and poor outcome (Reviewed by¹³), although in other tumour types TSP-1 can promote tumour growth and metastasis^{14–16}. TSP-1 modulates biological processes such as cell adhesion, motility, proliferation, cell-cell and cell-matrix interactions^{12,17,18}. In addition to its anti-angiogenic effects, other activities fulfilled by TSP-1 are also important in tumour development, including the positive modulation of innate anti-tumour immunity¹⁹ and the regulation of tumour blood flow²⁰. TSP-1 expression is frequently lost during malignant transformation due to the inactivation of tumour suppressor genes such as *p53* and *PTEN*^{21,22}, while TSP-1 expression may be repressed by the activation of oncogenes like *Myc*, *Id1*, *src*, *c-Jun*, *ras* and *HER2*^{23–28}. Additionally, DNA hypermethylation can also diminish TSP-1 levels²⁹.

Positive and negative regulation of TSP-1 by hypoxia has been described in several publications, indicating that hypoxia effects on TSP-1 levels are clearly cell type dependent^{30–37}. Here, we have examined the effects of hypoxia on TSP-1 regulation in ccRCC cell lines, demonstrating that hypoxia stimulates multiple signals that contribute independently to decrease TSP1 levels, affecting ccRCC migration and invasion.

Results

Oxygen availability regulates TSP-1 protein levels in ccRCC cells.

Previous studies have indicated that TSP-1 levels are associated with advanced tumour stage in patients with ccRCC, its expression having a significant impact on survival³⁸. On the other hand TSP-1 levels are generally lower in renal carcinoma cells than in normal renal cells³⁹. Since tumour hypoxia alters the balance between pro- and anti-angiogenic factors, favouring the expression of the former, we hypothesized that it might also reduce the expression of angiogenic inhibitors. Thus, we examined the effect of hypoxia on the expression of TSP-1 in several ccRCC cell lines. TSP-1 is a matricellular protein, mostly secreted to the extracellular space, thus we analyzed the soluble TSP-1 secreted into the conditioned media, as well as total lysates of monolayer cultures containing the membrane and matrix bound together with the intracellular protein. We found that TSP-1 protein levels from concentrated conditioned media (100x) were very low, and they were not significantly affected when cells were cultured under hypoxic conditions (Fig. 1a). The same results were observed when secreted soluble protein was analyzed by ELISA (see Supplementary Fig. S1 online). However, we found that TSP-1 protein levels were significantly lower in response to hypoxia in the total lysates of all the cell lines analyzed (Fig. 1a). To analyze the amount of intracellular TSP-1 in our total lysate, the cells were recovered with EDTA or trypsin before preparing the lysate, such that extracellular bound TSP-1 did not contribute to the lysate. Surprisingly, negligible amounts of TSP-1 were observed in these intracellular cell lysates (see Supplementary Fig. S2 online), indicating that most of the TSP-1 analyzed in our total lysates corresponded to membrane and matrix bound TSP-1 protein.

Since hypoxia did not significantly change the levels of TSP-1 mRNA (Fig. 1b left), the loss of this protein under these conditions did not appear to occur at the transcriptional level. By contrast, the mRNA levels of VEGF, a known hypoxia-regulated gene, were up-regulated as expected (Fig. 1b right). In addition, TSP-1 protein was regulated by oxygen availability in a concentration-dependent manner, since lowering the oxygen concentration from 1% O₂ (hypoxia) to 0.1% O₂ (considered as anoxia) produced a greater decrease in protein levels (Fig. 1c left). To confirm the specific effects of hypoxia on the TSP-1 protein and given that most of hypoxic responses are reverted after reoxygenation, the cells were reoxygenated for 12, 24 and 48 h after an initial 24 h period of hypoxia. There was an increase of TSP-1 protein levels 12 h after reoxygenation, which rose

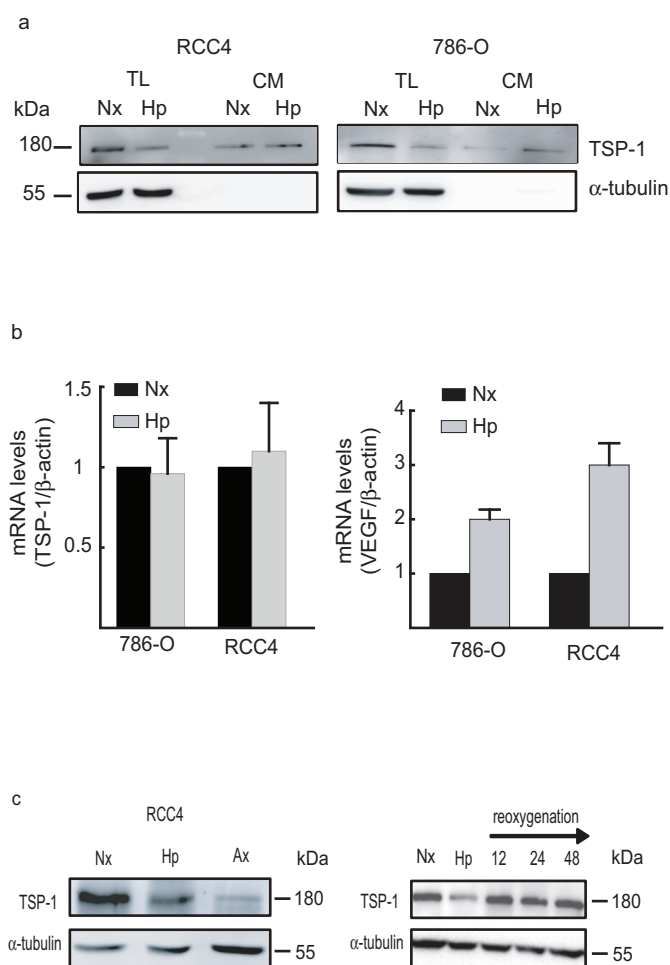


Figure 1 | Effect of hypoxia on TSP-1 levels in ccRCC cell lines. a) 786-O and RCC4 cells were cultured under normoxic (Nx) or hypoxic (Hp) conditions for 24 h and TSP-1 protein levels in total lysates (TL) or conditioned media (CM) were analyzed in Western blots b) TSP-1 and VEGF mRNA levels were determined by quantitative real time PCR in 786-O and RCC4 cell lines cultured for 24 h under normoxic or hypoxic conditions. Gene expression was represented as the fold induction against the levels in normoxic conditions after mRNA levels were normalized to β -actin. The values represent the average from at least three different experiments. c) Analysis of TSP-1 protein in RCC4 cells exposed to normoxia, hypoxia or anoxia (Ax, 0.1% O₂) for 24 h (left) and then reoxygenated for the times indicated (right). A representative experiment of n=4 performed is shown. As a loading control α -tubulin was used in all panels.

close to the normoxic levels (Fig. 1c right), indicating that the hypoxic effects on TSP-1 protein levels are specific and reversible.

Hypoxia decreases TSP-1 protein levels independently of HIF. The HIF family of transcription factors are considered to be the master regulators of hypoxia-regulated genes. Because the above results indicated no transcriptional regulation of TSP-1 in hypoxia, HIF was not expected to directly influence this protein. However, we assessed the possibility that HIF might indirectly down-regulate TSP-1 protein levels during hypoxia by analyzing the effects of specific siRNAs to knock down the two most known HIF isoforms, HIF-2 α and HIF-1 α in the 786-O and RCC4 cell lines. Silencing these factors did not prevent the decrease in TSP-1 protein associated with hypoxia (Fig. 2). Therefore, from these results we concluded that the loss of TSP-1 in ccRCC mediated by hypoxia occurs independently of HIF.

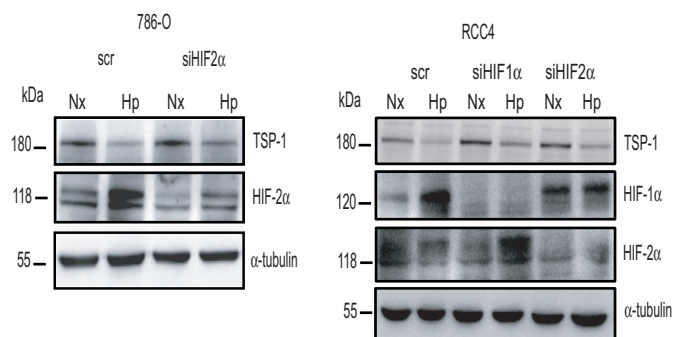


Figure 2 | TSP-1 regulation in RCC cell lines is independent of HIF. TSP-1 and HIF2 α protein levels in 786-O cells transfected with a scrambled siRNA (scr), or siRNAs specific for HIF2 α (siHIF2 α) were analyzed after 24 h under normoxic or hypoxic conditions (left panel). TSP-1, HIF2 α and HIF-1 α protein levels in RCC4 cells transfected with scrambled (scr) or siRNA to HIF-1 α (siHIF1 α) or HIF-2 α (siHIF2 α) were analyzed after 24 h in normoxic or hypoxic conditions (right), with α -tubulin as a loading control. The results are representative of at least three experiments performed.

Akt signalling contributes to the hypoxia-induced down-regulation of TSP-1 protein. Activation of the PI3K/Akt signalling pathway is responsible for the diminished TSP-1 levels in tumour-associated endothelial cells from RCC⁴⁰. On the other hand, activation of Akt by hypoxia has been reported by other authors^{41,42}. Hence, we investigated whether Akt signalling regulated TSP-1 in our ccRCC cell lines exposed to hypoxia. Initially, we evaluated the effect of the PI3K inhibitor LY294002 on TSP-1 protein levels in RCC4 cells cultured under normoxic or hypoxic conditions. Hypoxia increased Akt phosphorylation in these cell lines, an effect that was inhibited in the presence of LY294002. In parallel to this Akt activation, TSP-1 protein levels decreased, although they recovered significantly when hypoxia was induced in the presence of LY294002 (Fig. 3a). To further assess the role of this signalling pathway in the regulation of TSP-1 by hypoxia, RCC4 cells were transfected with a plasmid encoding a constitutively active form of Akt (gagAkt). Akt phosphorylation was enhanced in cells transfected with the constitutively active Akt, yet more importantly, this active Akt induced a robust decrease in TSP-1 protein when compared to cells transfected with the empty vector (pCMV6) (Fig. 3c). These effects were only evident at the protein level, and TSP-1 mRNA was not affected by the presence of LY294002 (Fig. 3b) or when cells were transfected with gagAkt (Fig. 3d).

The decrease of TSP-1 provoked by hypoxia is modulated by PHDs. Other components of the oxygen signalling pathway are the prolylhydroxylases (PHDs), considered to be the main oxygen sensors that respond to hypoxia. Since the activity of these enzymes significantly dampened in hypoxia⁴³, RCC4 cells in normoxia were treated with dimethylxaloylglycine (DMOG), a widely used inhibitor of these enzymes. As during hypoxia, TSP-1 mRNA levels did not change significantly in the presence of DMOG, while Glut-1 mRNA, a well-known target of HIF, showed the expected up-regulation (Fig. 4a left). Interestingly, exposure to DMOG diminished the amount of TSP-1 protein in a concentration-dependent fashion (Fig. 4a right). Furthermore, we could not detect TSP-1 in the conditioned media from cells treated with DMOG (see Supplementary Fig. S3 online). To further demonstrate the role of PHDs in the effects of hypoxia on TSP-1, we knocked down the expression of all three known PHDs (PHD1, PHD2 and PHD3) with specific siRNAs. Silencing of the three PHDs did not affect the amount of TSP-1 mRNA transcripts (Fig. 4b left) but it did diminish the amount of TSP-1 protein (Fig. 4b right). Furthermore, lack of changes on

HIF1 α or HIF2 α levels under these conditions support our conclusion that TSP-1 is regulated during hypoxia independently of HIF. By contrast, overexpression of PHDs in RCC4 VHL positive cells (see Supplementary Fig. S4 online), which express lower levels of PHDs than RCC4, recovered the levels of TSP-1 protein during hypoxia (Fig. 4c). Together, these results indicated that the hypoxia-mediated decrease in PHD activity also contributes to the decrease in TSP-1 protein during hypoxia.

The levels of TSP-1 regulate ccRCC cell migration and invasion. It has been shown that angiogenic factors stimulate ccRCC cell migration, although the role of endogenous angiogenic inhibitors, like TSP-1, in autocrine regulation of ccRCC cells remains unexplored. Taking this into account, we asked whether the decreased TSP-1 protein levels during hypoxia play a functional role in ccRCC cell migration and invasion. Accordingly, we first performed RCC4 cell migration assays under normoxic or hypoxic conditions, observing an increase in cell migration under hypoxic conditions (Fig. 5a). To determine whether the loss of TSP-1 during hypoxia influenced cell migration, purified TSP-1 was added to the RCC4 cells and migration was assessed under normoxic or hypoxic conditions. When the cells were exposed to exogenously added TSP-1 (66 nM), FBS or LPA-stimulated migration was significantly inhibited in both normoxia and hypoxia (Fig. 5b). Furthermore, the RCC4 cells were transfected with a specific siRNA directed against TSP-1 (Fig. 5c left) and migration assays were performed by stimulating with FBS. TSP-1 silencing produced a significant increase in RCC4 cell migration compared to the cells transfected with scrambled RNA (Fig. 5c right). This increased migration was also inhibited by adding exogenous TSP-1 into the upper chamber (Fig. 5d). Moreover, similar results were observed when migration was analyzed in wound healing assays (see Supplementary Fig. S5 online). In addition cells transfected with TSP-1 siRNA were also analyzed for their ability to invade through a type I collagen matrix, demonstrating a significant increase in cell invasion associated with TSP-1 silencing (Fig. 5e). Taken together, these results indicate that TSP-1 produced by ccRCC cells can inhibit migration in response to various chemoattractants. Subsequently, hypoxia-mediated decrease in TSP-1 protein levels stimulates ccRCC cell migration and invasion.

Discussion

RCC is the most common malignant tumour of the adult kidney and despite recent advances in diagnostic imaging, patients are typically diagnosed at an advanced stage. Therefore, studies of the molecular biology of these tumours can only benefit their management. Inactivation of tumour suppressor genes directly influences the angiogenic phenotype of these tumours, altering the relative amounts of inducers and inhibitors they secrete. In addition, the tumour microenvironment exerts selective pressure that favours the regulation of specific genes involved in tumour progression, for example when conditions of hypoxia arise. While such pressure may affect genes involved in angiogenesis, cell proliferation, cell-cell and cell-matrix interaction proteins, it may also involve downregulation of genes that inhibit tumour growth and angiogenesis². Our studies in ccRCC cell lines indicated that a hypoxic microenvironment diminishes the levels of TSP-1, an inhibitor of angiogenesis, which proved to influence ccRCC behaviour, enhancing the migratory and invasive potential of these cells in *in vitro* assays.

The importance of TSP-1 in renal cancer has been demonstrated previously^{38–40}. In these reports it is shown that TSP-1 is important in maintaining normal kidney angiostasis, and its expression inversely correlates with microvascular density, proliferation and RCC progression. However, the effect of the hypoxic microenvironment on these tumours has not previously been assessed, nor whether it may regulate TSP-1 levels. The increase in angiogenesis in response to hypoxia is part of the adaptive response that aims to achieve

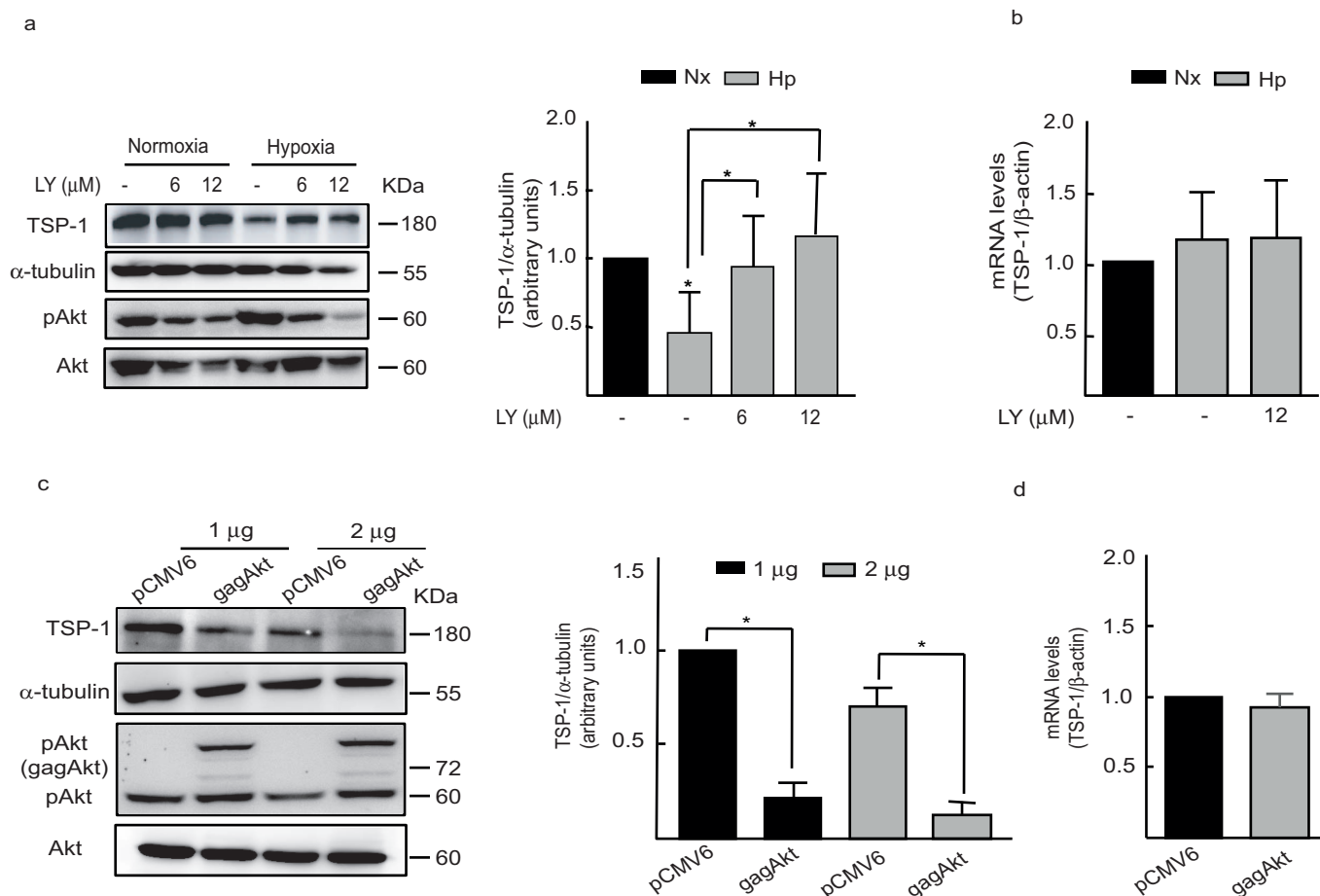


Figure 3 | Role of Akt signalling in the regulation of TSP-1 protein during hypoxia. a) TSP-1 protein levels were analyzed in total lysates from RCC4 cells cultured for 24 h under normoxic or hypoxic conditions in the presence of vehicle alone (–) or with 6–12 μM LY294002 (LY). Total Akt and phosphorylated Akt (pAkt) were analyzed in the same samples. TSP1 protein was quantified by densitometry and the change in TSP-1 in LY-treated cells was calculated. b) TSP-1 mRNA expression in RCC4 cells cultured under normoxic or hypoxic conditions in the presence or absence of LY for 24 h was quantified by quantitative RT-PCR. The mRNA levels were normalized to beta-actin and gene expression was represented as the fold induction during hypoxia against the levels during normoxia. c) TSP-1, total Akt and phosphorylated Akt levels were analyzed in total lysates from RCC4 cells transfected with the indicated amounts of a plasmid encoding the empty vector (pCMV6) or a constitutive active form of Akt (gagAkt). TSP-1 protein levels were quantified as in a) and normalized to α-tubulin. d) TSP-1 mRNA expression in RCC4 cells transfected with 1 μg of pCMV6 or gagAkt. Gene expression was represented as the fold change of gagAkt against pCMV6 transfected cells and normalized to β-actin. In all panels a representative experiment or average ± SEM of several performed is shown. n = 4* p ≤ 0.05, Students-T test.

enhanced oxygen and nutrient delivery to growing tissues. Hence, a hypoxia-mediated decrease in TSP-1 protein in ccRCC cell lines could be part of the hypoxic metastatic programme. The decrease in TSP-1 expression during hypoxia has been shown previously in other immortalized and tumour cells^{31,36}. By contrast, hypoxia augments the TSP-1 in endothelial cells, coronary artery smooth muscle cells and in human dermal fibroblasts^{30,32,34,35}. These results indicate that TSP-1 affects tumorigenesis by inducing different biological effects in distinct cell types. In hypoxic endothelial cells, the induction of TSP-1 might be a negative feedback mechanism to counter-balance the effect of pro-angiogenic factors such as VEGF. Conversely, tumour cells decrease the levels of anti-angiogenic factors in hypoxic conditions in order to favour their own survival and growth.

The mechanisms that regulate TSP-1 in hypoxia may differ in distinct cell types as hypoxia may induce TSP-1 by enhancing mRNA stability³⁴ or through transcriptional regulation mediated by HIF-1α^{30,32}. However, hypoxia decreases TSP-1 through post-transcriptional mechanisms^{31,36}. While there are only a few known examples of genes repressed by HIF^{44,45}, the expression of many genes is repressed during hypoxia independently of HIF. In this respect,

recent genome-wide bioinformatics or experimental studies^{7,8} have demonstrated that HIF-binding is mainly associated with the up-regulation of gene expression. Transcriptional repression does not seem to be directly mediated by HIF, which is consistent with our observations that the loss of TSP-1 during hypoxia is HIF-independent. Therefore, in our tumour cells the mechanisms that may account for the decrease in TSP-1 associated with hypoxia may include post-transcriptional, translational or post-translational mechanisms.

It was previously shown that 3' and 5'-untranslated region (UTR) of the TSP-1 mRNA transcript are involved in post-transcriptional regulation, either affecting mRNA stability or mRNA translation^{46,47}. However we found no significant differences in the activity of a reporter fused to the TSP-1 UTR in compared normoxic and hypoxic conditions (unpublished results). Regulation by miRNAs was also considered since TSP-1 is a target for repression by the miR-17-92 microRNA cluster in human adenocarcinoma⁴⁸. Indeed, miR-21 may be upregulated in ccRCC tissue and this miRNA can also be induced by hypoxia^{49,50}. Surprisingly, in hypoxic conditions we did not detect induction of this miRNA in our cell lines (unpublished results) and therefore, the decrease of TSP-1 levels during hypoxia is not likely to be mediated by the microRNAs reported to regulate

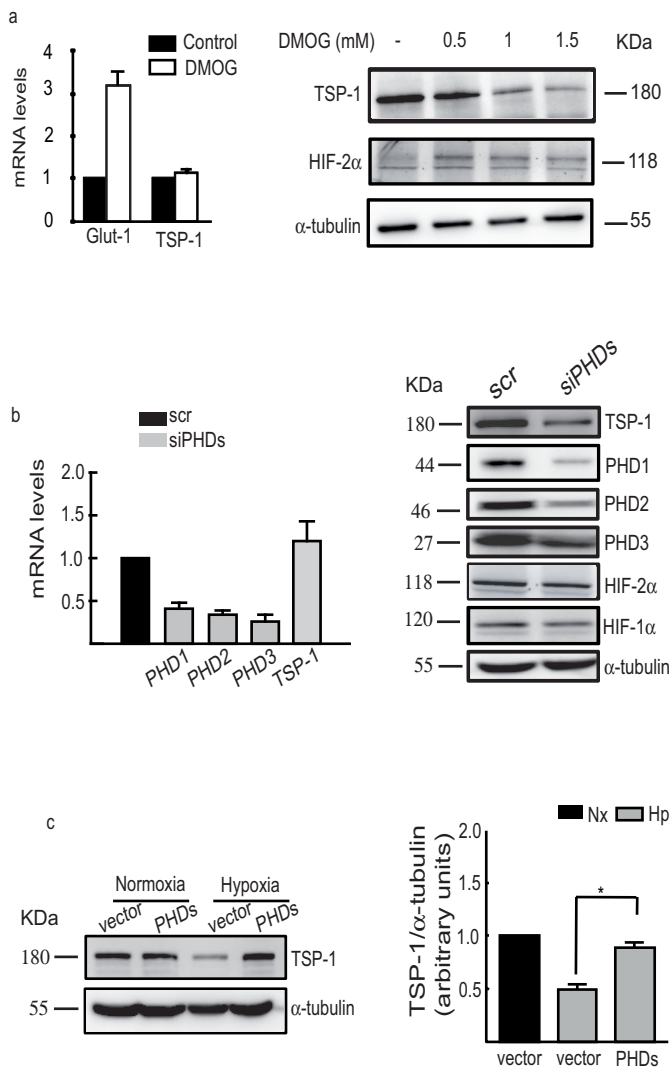


Figure 4 | Role of PHDs in the regulation of TSP-1 protein levels during hypoxia. a) TSP-1 and Glut-1 mRNA levels in RCC4 cells cultured for 24 h in the absence (control) or presence of 1 mM DMOG (left). mRNA levels were normalized to β -actin and gene expression was represented as the fold induction of DMOG treated against the control. TSP-1 and HIF-2 α protein levels analyzed in total lysates from RCC4 cells cultured for 24 h in the absence (–) or presence of DMOG (right). b) PHD1, 2, 3 and TSP-1 mRNA levels were quantified by quantitative RT-PCR and normalized to β -actin, representing gene expression in relation to that observed with the scr (left panel). TSP-1, PHD1, PHD2, PHD3, HIF1 α , HIF-2 α and α -tubulin protein was analyzed in total lysates from RCC4 cells transfected with a non-specific (scr) or siRNA specific to PHD1, PHD2 and PHD3 (right panel). c) TSP-1 protein levels were analyzed and quantified in total lysates from RCC4 VHL⁺ cells transfected with vectors encoding for PHD1, PHD2 and PHD3 (PHDs), or the empty vector (vector), and cultured under normoxic or hypoxic conditions for 24 h. A representative experiment or average \pm SEM of several performed is shown. $n = 3$ * $p \leq 0.05$, Students-T test.

TSP-1 production. TSP-1 mRNA may also be regulated by uncoupling from polysomes, such as in response to high glucose⁴⁷. However, we found no significant differences when the TSP-1 mRNA in the polysomal and non-polysomal fractions were analyzed (unpublished results).

It was previously shown that Akt signalling can both positively and negatively affect TSP-1 levels in endothelial cells from different sources^{40,51,52}, yet our results proved that Akt signalling diminished

the amount of TSP-1 protein in RCC cells. In a recent report by Kaur *et al.*⁵³ the authors found that TSP-1, through its binding to CD47, potentially inhibits VEGFR2 signalling and the downstream activation of Akt. Based on these results, it is possible that TSP-1 might also inhibit Akt phosphorylation in RCC cells and therefore, the decreased TSP1 expression under hypoxia could provoke, rather than only represent a consequence of the increased levels of phosphorylated Akt. However, the knockdown of TSP-1 in our RCC cells under normoxic conditions did not affect Akt phosphorylation. Another possibility is that PHDs may be responsible for the changes in Akt phosphorylation and the decrease in TSP-1. In this respect, it was previously shown that inhibiting PHDs with deferoxamine augments Akt phosphorylation⁴², and on the other hand the activity of PHDs is also regulated by hypoxia (reviewed in²). The silencing of PHDs with specific siRNA, or their inhibition, produces a consistent decrease in TSP1 protein in ccRCC. By contrast, over-expression of PHDs in hypoxia partially recovered the decrease in TSP-1. However, and despite the fact that in other cell lines we observed diminished Akt phosphorylation when PHDs were over-expressed during hypoxia (unpublished results), PHDs did not appear to affect Akt phosphorylation levels in ccRCC cell lines. However, our results indicated that PHDs can at least partially counteract the negative effect of phosphorylated Akt on TSP-1 levels in hypoxia. While PHDs have targets other than HIF, the regulatory influence of the hydroxylation of these targets is not completely clear⁵⁴. These results are very interesting given that TSP1 could be another target of PHDs, and on the other hand, PHDs could regulate tumour behaviour independently of HIF by acting as a tumour suppressor. Further studies will be necessary to understand the mechanisms by which PHDs regulate TSP-1, and how the PHD pathway interacts with the Akt signalling to regulate the levels of TSP-1 during hypoxia.

The effects of anti-angiogenic inhibitors may be bypassed by tumour cells, either by increasing the expression of pro-angiogenic factors or by decreasing the expression of those factors that inhibit it. Here, we show that hypoxia can stimulate multiple signals which contribute to the decrease in TSP-1 levels in ccRCC, influencing ccRCC behaviour (Fig. 6). Several reports have demonstrated that TSP-1 induces tumour cell migration, however in our model, we found that TSP-1 inhibits ccRCC cell migration in response to different stimuli. These results reinforce the pleiotropic nature of TSP-1 and depending on the environmental conditions, the presence of its different receptors may have different, even opposite, effects on cell behaviour and biological process. TSP-1 can promote or inhibit angiogenesis, and promote or inhibit tumour growth. Our results demonstrate that in addition to its previously reported anti-angiogenic activity on renal carcinomas, TSP1 suppression by hypoxia can elicit autocrine stimulation of ccRCC migration that might be important for the tumour outcome. Further studies aimed at understanding the exact mechanisms regulating TSP-1 in ccRCC will be beneficial to the design of new therapies against these tumours.

Methods

Cell culture. The 786-O and RCC4 cell lines⁵⁵ were cultured in RPMI 1640 with GLUTAMAX-1 (Invitrogen, San Diego, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin, and they were maintained at 37°C in the presence of 5% CO₂ and 21% O₂ (normoxia). For hypoxic or anoxic experiments, cells were incubated at 37°C in an *Invivo_400* hypoxia workstation (Ruskin Technology, West Yorkshire) in the presence of 5% CO₂ and 1% or 0.1% oxygen, respectively, for the times indicated. When hypoxia and reoxygenation cycles were performed, the cells were seeded at 10–20% confluence and then subjected to hypoxia (1% O₂) or normoxia for up to 24 h. Subsequently, the cells were maintained in normoxia for 6–48 h.

Antibodies and reagents. The monoclonal Ab-11 anti-TSP-1 antibody, (clones D4.6, AG.1, MBC 200.1) was obtained from Neomarkers Lab Vision (Freemont, CA) and the polyclonal anti-HIF2 α antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Heidelberg, GE). The monoclonal anti-tubulin antibody was purchased from Sigma (Madrid, Spain) and the monoclonal anti-HIF-1 α antibody was from BD Transduction Laboratories (San Jose, CA). The PHD1, PHD2 and PHD3 polyclonal antibodies were from Bethyl laboratories (Montgomery, TX) while the polyclonal

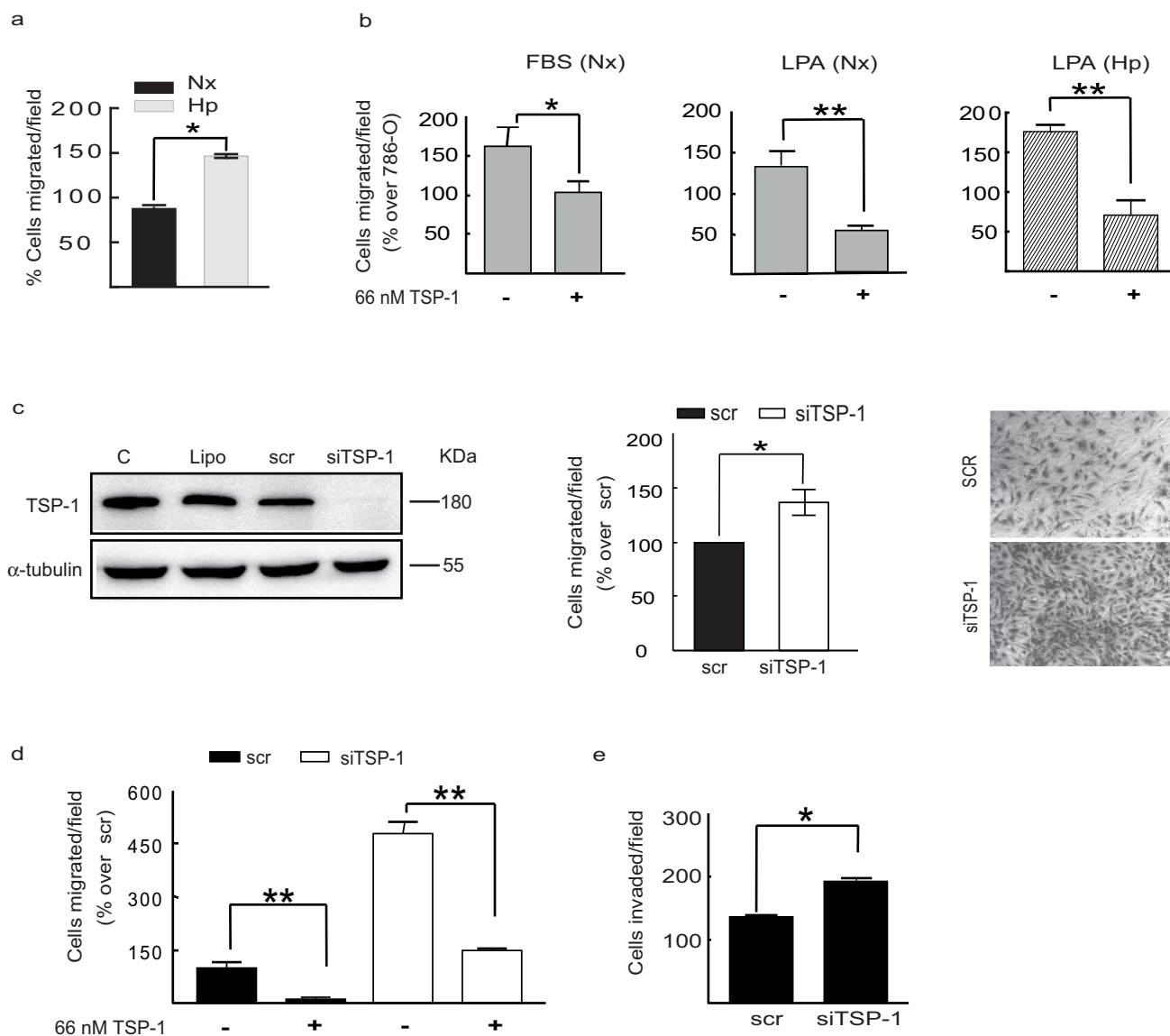


Figure 5 | Effect of TSP-1 levels on RCC cell migration and invasion. a) RCC4 cells were cultured under normoxic or hypoxic conditions for 48 h, after which migration was assessed in transwell assays. Cells (20×10^3 cells/well) were seeded on top of the transwells and allowed to migrate for 16 h under normoxic or hypoxic conditions. As a chemoattractant LPA ($10 \mu\text{M}$) was added to the lower chamber. b) RCC4 cells were cultured under normoxic or hypoxic conditions for 48 h. Afterwards cell migration stimulated with 5% FBS or $10 \mu\text{M}$ LPA in the lower chamber was assessed for 16 h under normoxia (Nx) or hypoxia (Hp) in the absence (-) or presence (+) of 66 nM TSP-1. c) Cells were transfected with TSP-1 or scrambled (scr) siRNA and the efficiency of the interference on TSP-1 protein levels was analyzed in Western blots (left panel). Cell migration stimulated by 5% FBS was analyzed after transfection. The proportion of migrating cells (% over scr) and a representative photomicrograph is shown. d) Cells transfected as in c) were allowed to migrate in the absence or presence of 66 nM TSP-1 using LPA ($10 \mu\text{M}$) as a chemoattractant. The average number of cells that migrated in three random fields was calculated and cell migration was represented as the percentage of cells that migrated (\pm SEM). $n \geq 3$ in all panels, $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, Students-T test. e) Cells transfected with TSP-1 siRNA or scramble (scr) were allowed to invade through type I collagen coated inserts. The values in the graph represent the cells that invaded (average number of cells \pm SEM). $*p \leq 0.05$, Students-T test.

anti-pAkt and anti-Akt were from Cell Signalling (Danvers, MA). The antibodies were used in western blots at the concentration suggested by the manufacturer. Secondary polyclonal (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) or monoclonal (Dako, Carpinteria, CA) HRP-conjugated antibodies were used and detected by ImmunoStar™ WesternC™ kit (BioRad, Hertfordshire, UK). LY294002 was from Merck and was used at the concentrations indicated. The Oleoyl-L-alpha lysophosphatidic acid (LPA) was from Sigma and the Dimethylxaloylglycine (DMOG) was from Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY).

Conditioned media preparation. Soluble secreted TSP-1 was analyzed in concentrated cell conditioned medium. Cells were cultured in the absence of FBS for 24 h under normoxia or hypoxia, and afterwards, the conditioned medium (CM) was collected, centrifuged and treated with a protease inhibitor cocktail (Roche). The CM was then concentrated 100x times using Amicon Ultra (Millipore, Billerica, MA, USA) devices with 50 kDa cut-off.

siRNA-mediated gene silencing. siRNA experiments were carried out with specific pools of siRNAs directed against human TSP-1, HIF1 α , HIF2 α , PHD1, PHD2 or PHD3 (Santa Cruz) or with a non-targeted pool of control siRNAs (scr). Cells were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's instruction.

Real time PCR analysis. To determine the changes in gene expression induced by hypoxia or the effects of gene silencing, quantitative RNA analysis was performed by Real Time PCR with StepOne Plus (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Cells were grown to 95% confluence in 60 mm culture dishes, and the total RNA was isolated from cells using the Ultraspec RNA Isolation System (Biotex Laboratories, Houston, TX). RNA ($1 \mu\text{g}/\text{sample}$) was reverse-transcribed to cDNA with Improm II RT (Promega, Madison, WI) in a final volume of 20 μl . For Q-RT-PCR $1 \mu\text{l}$ of cDNA was amplified with the specific primers pairs using the following temperature cycles: 10 min initial denaturation at 95°C ; 15 s denaturation at 95°C , 1 min annealing at

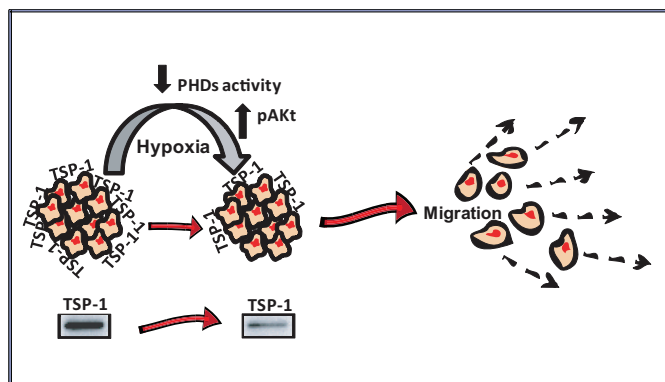


Figure 6 | TSP1 regulation by hypoxia in ccRCC cell lines. Hypoxia stimulates multiple signals that contribute to the decrease in TSP-1 in ccRCC. TSP1 suppression by hypoxia elicits an autocrine stimulation of ccRCC migration.

60°C and extension over 40 cycles. Melting curves were obtained at 95°C for 15 s, 60°C for 1 min and 95°C for 15 s, labelling samples with power SYBR green (Applied Biosystems). The primer pairs used were: TSP-1 (F: ACT GGG TTG TAC GCC ATC AGG; R: CTA CAG CGA GTC CAG GAT CAC), HPRT (F: ATT GTA ATG ACC AGT CAA CAG GG; R: GCA TTG TTT TGC CAG TGT CAA), VEGF (F: TGCCAAGTGGT CCCAG; R: GTGAGGTCT TGATCCG), PHD1 (F: GCGCTGCATCACCTGTATCTAT; R: CCGC CATGCACCT TAACG), PHD2 (F: CCCTCATGAAGTACAACAGCAT; R: CATCTGCATCAA AATACCAAACAGT) PHD3 (F: TGCATCACCTGCATCTACT ATCTG; R: TACATGGTGGGATCCTGCG) and GLUT-1 (F: TCAACCGCAACGA GGAGAA; R: CTGTCCCGCGCAGCTT).

DNA cell transfection. RCC4 cells were transfected with a plasmid encoding a constitutive active form of Akt (gagAkt) or with the empty vector (pCMV6; plasmids kindly provided by Dr Ana Clara Carrera, CNB, Madrid, Spain). The cells were also transfected with plasmids encoding PHD1, PHD2 and PHD3 (PCDNA3-PHD1:flag, PHD2:flag and PHD3:flag) or the empty PCDNA3 vector as a control. Briefly, cells were seeded and grown to 50–70% confluence, and then transfected using the jetPEI reagent (Genycell Biotech, Spain). For the gagAkt or pCMV6 plasmids, 1 or 2 µg of DNA/p60 was diluted in 48 µl of 150 mM NaCl. Separately, 4 µl of jetPEI reagent was diluted in 46 µl of 150 mM NaCl and mixed with the DNA solution. This mixture was vortexed, incubated for 20 min at room temperature, and then added to the cells. The cell media was completed to 2 ml final volume containing 10% of FBS and 1% of penicillin and streptomycin, and after transfection the cells were cultured for 36 h before they were used in the experiments. When transfected with PCDNA3-PHD1, PHD2 and PHD3:flag, or the empty vector PCDNA3, 10 µg of each plasmid or vector was used, and 48 h post-transfection, the cells were subjected to serum deprivation. The cells were then processed 24 h post-deprivation, and protein or mRNA levels were analyzed in western blots (total lysate) or by Q-RT-PCR.

Cell migration and invasion assays. Migration and invasion assays were evaluated in Transwell filters (6.5-mm diameter, 8 µm pore size: from Costar Corning, NY). The ccRCC cells serum starved for 24 h were seeded in the upper transwell (20×10^3 cells/well in 160 µl RPMI without FBS) in the presence or absence of 60 nM TSP-1 (Athens Research & Technology, GA), and they were allowed to migrate for 16 h at 37°C. As chemoattractants, RPMI with 5% FBS or 10 µM LPA were added in the lower chamber, using basal media as a negative control. The cells in the upper surface of the membrane that did not migrate were gently removed with Q-tips, while the cells on the lower surface were fixed, stained with Diff-Quick (International Reagent, Kobe, Japan) and counted under the microscope (20X). An average of three random fields per condition were analysed. For invasion assays, the cells were loaded on top of Transwell filters previously coated with Collagen type I (20 µg/ml) and the experiment was carried out over 16–18 h.

Statistical analysis. Each experiment was repeated at least three times and the results were expressed as the mean ± SEM. Statistical significance was determined with the Students-T test and a $p \leq 0.05$ was considered significant.

- Rioux-Leclercq, N. *et al.* Plasma level and tissue expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma: a prospective study of 50 cases. *Hum Pathol* **38**, 1489–1495 (2007).
- Calzada, M. J. & del Peso, L. Hypoxia-inducible factors and cancer. *Clin Transl Oncol* **9**, 278–289 (2007).
- Bruick, R. K. & McKnight, S. L. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **294**, 1337–1340 (2001).

- Epstein, A. C. *et al.* C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* **107**, 43–54 (2001).
- Ivan, M. *et al.* HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292**, 464–468 (2001).
- Jaakkola, P. *et al.* Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**, 468–472 (2001).
- Mole, D. R. *et al.* Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem* **284**, 16767–16775 (2009).
- Ortiz-Barahona, A., Villar, D., Pescador, N., Amigo, J. & del Peso, L. Genome-wide identification of hypoxia-inducible factor binding sites and target genes by a probabilistic model integrating transcription-profiling data and in silico binding site prediction. *Nucleic Acids Res* **38**, 2332–2345 (2010).
- Messmer-Blust, A., An, X. & Li, J. Hypoxia-regulated angiogenic inhibitors. *Trends Cardiovasc Med* **19**, 252–256 (2009).
- Good, D. J. *et al.* A tumour suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6624–6628 (1990).
- Lawler, J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumour growth. *J Cell Mol Med* **6**, 1–12 (2002).
- Bornstein, P. Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest* **107**, 929–934 (2001).
- Henkin, J. & Volpert, O. V. In *Expert Opin Ther Targets*, Vol. 15, Edn. 2011 1369–1386 (2011).
- Castle, V., Varani, J., Fligel, S., Prochownik, E. V. & Dixit, V. Antisense-mediated reduction in thrombospondin reverses the malignant phenotype of a human squamous carcinoma. *J Clin Invest* **87**, 1883–1888 (1991).
- Tuszynski, G. P., Gasic, T. B., Rothman, V. L., Knudsen, K. A. & Gasic, G. J. Thrombospondin, a potentiator of tumour cell metastasis. *Cancer Res* **47**, 4130–4133 (1987).
- Tuszynski, G. P., Rothman, V. L., Deutch, A. H., Hamilton, B. K. & Eyal, J. Biological activities of peptides and peptide analogues derived from common sequences present in thrombospondin, properdin, and malarial proteins. *J Cell Biol* **116**, 209–217 (1992).
- Adams, J. C. & Lawler, J. The thrombospondins. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 961–968 (2004).
- Tucker, R. P. The thrombospondin type 1 repeat superfamily. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 969–974 (2004).
- Martin-Manso, G. *et al.* Thrombospondin 1 promotes tumour macrophage recruitment and enhances tumour cell cytotoxicity of differentiated U937 cells. *Cancer Res* **68**, 7090–7099 (2008).
- Isenberg, J. S. *et al.* Thrombospondin 1 and vasoactive agents indirectly alter tumour blood flow. *Neoplasia* **10**, 886–896 (2008).
- Dameron, K. M., Volpert, O. V., Tainsky, M. A. & Bouck, N. The p53 tumour suppressor gene inhibits angiogenesis by stimulating the production of thrombospondin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59**, 483–489 (1994).
- Wen, S. *et al.* PTEN controls tumour-induced angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4622–4627 (2001).
- Janz, A., Sevignani, C., Kenyon, K., Ngo, C. V. & Thomas-Tikhonenko, A. Activation of the myc oncoprotein leads to increased turnover of thrombospondin-1 mRNA. *Nucleic Acids Res* **28**, 2268–2275 (2000).
- Mettouchi, A. *et al.* SPARC and thrombospondin genes are repressed by the c-jun oncogene in rat embryo fibroblasts. *EMBO J* **13**, 5668–5678 (1994).
- Slack, J. L. & Bornstein, P. Transformation by v-src causes transient induction followed by repression of mouse thrombospondin-1. *Cell Growth Differ* **5**, 1373–1380 (1994).
- Volpert, O. V. *et al.* Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1. *Cancer Cell* **2**, 473–483 (2002).
- Wen, X. F. *et al.* HER2 signalling modulates the equilibrium between pro- and antiangiogenic factors via distinct pathways: implications for HER2-targeted antibody therapy. *Oncogene* **25**, 6986–6996 (2006).
- Watnick, R. S., Cheng, Y. N., Rangarajan, A., Ince, T. A. & Weinberg, R. A. Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumour angiogenesis. *Cancer Cell* **3**, 219–231 (2003).
- Li, Q., Ahuja, N., Burger, P. C. & Issa, J. P. Methylation and silencing of the Thrombospondin-1 promoter in human cancer. *Oncogene* **18**, 3284–3289 (1999).
- Distler, J. H. *et al.* Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **56**, 4203–4215 (2007).
- Laderoute, K. R. *et al.* Opposing effects of hypoxia on expression of the angiogenic inhibitor thrombospondin 1 and the angiogenic inducer vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* **6**, 2941–2950 (2000).
- Osada-Oka, M., Ikeda, T., Akiba, S. & Sato, T. Hypoxia stimulates the autocrine regulation of migration of vascular smooth muscle cells via HIF-1 α -dependent expression of thrombospondin-1. *J Cell Biochem* **104**, 1918–1926 (2008).
- Park, J. E. *et al.* Hypoxic tumour cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Mol Cell Proteomics* **9**, 1085–1099 (2010).
- Phelan, M. W., Forman, L. W., Perrine, S. P. & Faller, D. V. Hypoxia increases thrombospondin-1 transcript and protein in cultured endothelial cells. *J Lab Clin Med* **132**, 519–529 (1998).



35. Polotsky, V. Y. *et al.* Intermittent and Sustained Hypoxia Induce a Similar Gene Expression Profile in the Human Aortic Endothelial Cells. *Physiol Genomics* (2010).
36. Tenan, M. *et al.* Thrombospondin-1 is downregulated by anoxia and suppresses tumorigenicity of human glioblastoma cells. *J Exp Med* **191**, 1789–1798 (2000).
37. Hu, C. J. *et al.* Promoter region methylation and reduced expression of thrombospondin-1 after oxygen-glucose deprivation in murine cerebral endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* **26**, 1519–1526 (2006).
38. Zubac, D. P. *et al.* The expression of thrombospondin-1 and p53 in clear cell renal cell carcinoma: its relationship to angiogenesis, cell proliferation and cancer specific survival. *J Urol* **182**, 2144–2149 (2009).
39. Veliceasa, D. *et al.* Transient potential receptor channel 4 controls thrombospondin-1 secretion and angiogenesis in renal cell carcinoma. *FEBS J* **274**, 6365–6377 (2007).
40. Bussolati, B., Assenzio, B., Deregibus, M. C. & Camussi, G. The proangiogenic phenotype of human tumour-derived endothelial cells depends on thrombospondin-1 downregulation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Mol Med* **84**, 852–863 (2006).
41. Kwon, D. S. *et al.* Signal transduction of MEK/ERK and PI3K/Akt activation by hypoxia/reoxygenation in renal epithelial cells. *Eur J Cell Biol* **85**, 1189–1199 (2006).
42. Alvarez-Tejado, M. *et al.* Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway in PC12 cells: protective role in apoptosis. *J Biol Chem* **276**, 22368–22374 (2001).
43. Semenza, G. L. HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* **107**, 1–3 (2001).
44. Chen, K. F., Lai, Y. Y., Sun, H. S. & Tsai, S. J. Transcriptional repression of human cad gene by hypoxia inducible factor-1alpha. *Nucleic Acids Res* **33**, 5190–5198 (2005).
45. Wen, W. *et al.* Suppression of cyclin D1 by hypoxia-inducible factor-1 via direct mechanism inhibits the proliferation and 5-fluorouracil-induced apoptosis of A549 cells. *Cancer Res* **70**, 2010–2019 (2010).
46. McGray, A. J., Gingerich, T., Petrik, J. J. & Lamarre, J. Regulation of thrombospondin-1 expression through AU-rich elements in the 3'UTR of the mRNA. *Cell Mol Biol Lett* **16**, 55–68 (2011).
47. Bhattacharyya, S., Marinic, T. E., Krukovets, I., Hoppe, G. & Stenina, O. I. Cell type-specific post-transcriptional regulation of production of the potent antiangiogenic and proatherogenic protein thrombospondin-1 by high glucose. *J Biol Chem* **283**, 5699–5707 (2008).
48. Dews, M. *et al.* Augmentation of tumour angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet* **38**, 1060–1065 (2006).
49. Liu, L. Z. *et al.* MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1alpha expression. *PLoS One* **6**, e19139 (2011).
50. Polytarchou, C. *et al.* Akt2 regulates all Akt isoforms and promotes resistance to hypoxia through induction of miR-21 upon oxygen deprivation. *Cancer Res* **71**, 4720–4731 (2011).
51. Niu, Q. *et al.* Inhibition of Tie-2 signalling induces endothelial cell apoptosis, decreases Akt signalling, and induces endothelial cell expression of the endogenous anti-angiogenic molecule, thrombospondin-1. *Cancer Biol Ther* **3**, 402–405 (2004).
52. Chen, J. *et al.* Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo. *Nat Med* **11**, 1188–1196 (2005).
53. Kaur, S. *et al.* Thrombospondin-1 inhibits VEGF receptor-2 signalling by disrupting its association with CD47. *J Biol Chem* **285**, 38923–38932 (2010).
54. Jokilehto, T. & Jaakkola, P. M. The role of HIF prolyl hydroxylases in tumour growth. *J Cell Mol Med* **14**, 758–770 (2010).
55. Maxwell, P. H. *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**, 271–275 (1999).

Acknowledgements

This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovacion (MCINN) SAF2009-11113 and METOXIA, a Collaborative Project under the 7th Research Framework Programme of the European Union FP7-HEALTH-2007B (ref. HEALTH-F2-2009-222741).

Author contributions

RB-M, AO, MF-C, and GM performed the experiments. RB-M, AO, MF-C, MC-E and MJC analyzed and interpreted the data. MJC conceived and designed experiments, and wrote the paper. BJ, OS contributed to the interpretation of the data and critical reviewed the manuscript

Additional information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/scientificreports>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

License: This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivative Works 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

How to cite this article: Bienes-Martínez, R. *et al.* Autocrine stimulation of clear-cell renal carcinoma cell migration in hypoxia via HIF-independent suppression of thrombospondin-1. *Sci. Rep.* **2**, 788; DOI:10.1038/srep00788 (2012).

15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin- J_2 reveals a new pVHL-independent, lysosomal-dependent mechanism of HIF-1 α degradation

Gemma Olmos · María I. Arenas · Raquel Bienes · María Jose Calzada · Julián Aragonés · Maria Laura Garcia-Bermejo · Manuel O. Landazuri · Javier Lucio-Cazaña

Received: 23 December 2008 / Revised: 25 March 2009 / Accepted: 21 April 2009
© Birkhäuser Verlag, Basel/Switzerland 2009

Abstract Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) protein is degraded under normoxia by its association to von Hippel-Lindau protein (pVHL) and further proteasomal digestion. However, human renal cells HK-2 treated with 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin- J_2 (15d-PGJ $_2$) accumulate HIF-1 α in normoxic conditions. Thus, we aimed to investigate the mechanism involved in this accumulation. We found that 15d-PGJ $_2$ induced an over-accumulation of HIF-1 α in RCC4 cells, which lack pVHL and in HK-2 cells treated with inhibitors of the pVHL-proteasome pathway. These results indicated that pVHL-proteasome-independent mechanisms are involved, and therefore we aimed to ascertain them. We have identified a new lysosomal-dependent mechanism of HIF-1 α degradation as a target for 15d-PGJ $_2$ based on: (1) HIF-1 α colocalized with the specific lysosomal marker Lamp-2a, (2) 15d-PGJ $_2$ inhibited the activity of cathepsin B, a lysosomal protease, and (3) inhibition of lysosomal activity did not result in over-accumulation of HIF-1 α in 15d-PGJ $_2$ -treated cells.

Therefore, expression of HIF-1 α is also modulated by lysosomal degradation.

Keywords Hypoxia inducible factor · 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin- J_2 · Proximal tubular cells · Calpain · Lysosome · Heat shock protein-90

Introduction

Transcriptional adaptive responses to hypoxia are controlled primarily through the nuclear accumulation of hypoxia-inducible factor (HIF-1). HIF transcription factors are heterodimers consisting of a constitutively expressed β subunit and an oxygen-regulated α subunit, which is mainly regulated at the protein level. In normoxia, HIF- α is hydroxylated at specific proline residues by iron-dependent HIF prolyl-hydroxylases (PHDs) [1–5]. This posttranslational modification is an absolute requirement for its recognition by the protein pVHL, the substrate recognition component of an E3 ubiquitin ligase complex that targets HIF α for proteasomal degradation [1, 2]. In hypoxia, this interaction is suppressed; HIF α is thereby stabilized, and together with the β subunit and transcriptional coactivators, it binds to hypoxia-responsive elements (HRE) in target genes [6].

The activation of HIF is found in a large number of human pathologies as a consequence of the hypoxic environment. However, in other pathologies, like in renal pathologies, induction of HIF-1 α may have a therapeutic interest. For instance, pre-treatment of rats with a HIF-specific PHD inhibitor to increase HIF activity, or cobalt chloride, a hypoxia-mimetic agent known to stabilize HIF-1 α , resulted in improved renal clearance after clamping of the renal pedicle [7, 8]. Administration of

G. Olmos · J. Lucio-Cazaña (✉)
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina,
Universidad de Alcalá, 28471 Alcalá de Henares, Madrid, Spain
e-mail: javier.lucio@uah.es

M. I. Arenas
Departamento de Biología Celular y Genética,
Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

R. Bienes · M. J. Calzada · J. Aragonés · M. O. Landazuri
Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa,
Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

M. L. Garcia-Bermejo
Departamento de Patología,
Hospital Universitario Ramon y Cajal,
Madrid, Spain

15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin- J_2 (15d-PGJ₂), an agonist of the peroxisome proliferator-activator- γ (PPAR γ), produces a significant reduction of renal dysfunction and injury caused by ischemia/reperfusion of the kidney in an in vivo model in rodents [9]. Therefore, it is possible that the protective effect of 15d-PGJ₂ is due to 15d-PGJ₂-induced stabilization of HIF-1 α protein, which we have recently described in several types of cultured renal cells [10]. Accumulation of transcriptionally active HIF-1 α by 15d-PGJ₂ is achieved in normoxia, in a PPAR γ -independent manner, without affecting HIF-1 α mRNA levels or proteasome activity. This stabilization is dependent on the thiol-antioxidant-sensitive, electrophilic reactivity of the α,β -unsaturated carbonyl present in the 15d-PGJ₂ molecule [10]. However, the mechanism for this stabilization has not yet been described.

Multiple lines of evidence indicate that stabilization of HIF-1 α is also possible through pVHL-independent mechanisms. Thus, under normoxic conditions, HIF-1 α expression is modulated by glycogen synthase kinase-3 [11] receptor of activated protein kinase C-1 [12], histone deacetylases [13], heat shock protein 90 [14], calcium-calpain [15] and cathepsin B [16]. Our aim here was to determine the particular mechanism of 15d-PGJ₂-mediated accumulation of HIF-1 α . Our results demonstrated that pVHL-proteasome-independent mechanisms were involved in 15d-PGJ₂-induced over-accumulation of HIF-1 α . Most importantly, we have identified a new lysosomal-dependent mechanism of HIF-1 α degradation which may be acting simultaneously or not with other degradation pathways.

Materials and methods

Materials

15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin- J_2 (15d-PGJ₂), was purchased from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI). Proteasome inhibitor MG132, calpain substrate S-LLY-AMC, calpain inhibitors PD150606 (a cell-permeable, non-competitive, selective non-peptide calpain inhibitor directed towards the calcium binding sites of calpain) and calpastatin (a 27-residue peptide specific calpain inhibitor), cathepsin B inhibitor CA-074 Me and protease inhibitors were from Calbiochem (San Diego, CA). Nitrocellulose membrane was from Bio-rad (Hercules, CA). Enhanced chemiluminescence ECL detection system was from Amersham Biosciences (Arlington Heights, IL). Protein A/G Plus was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Unless otherwise stated, all the biochemical reagents used in this study were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

Anti-human protein antibodies were obtained from the following sources and used at the indicated dilutions: monoclonal HIF-1 α (1:1,000) and Hsp-90 (1:500) (Transduction Laboratories, BD Biosciences, Palo Alto, CA), anti-rabbit horseradish peroxidase antibody (1:2,000, Chemicon, CA) and cathepsin B antibody (1:2,000) were from Santa Cruz Biotechnology), and calpain antibody was from Biomol International (Hamburg, Germany). Polyclonal α -actin (1:3,000) and horseradish peroxidase-coupled sheep anti-mouse antibodies (1:3,000) were obtained from Sigma. Lysosome-associated membrane protein type 2a (Lamp2a) antibody (1:100) and polyclonal HIF-1 α were from Abcam (Cambridge, UK).

Cell Culture and treatment

Human kidney HK-2 cells were purchased from American Type Culture Collection (Rockville, MD). Cells were maintained in DMEM supplemented with hydrocortisone, Insulin-Transferrine-Selenium, non-essential amino acids, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 10% heat-inactivated fetal bovine serum. Except for antibiotics and serum, which were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA), all the other products were purchased from Sigma. Parental VHL-negative RCC4 cells (herein described as RCC4-) and the corresponding VHL stable transfectants (RCC4+) were maintained in RPMI 1640 with Glutamax-I (Life Technologies). For RCC4+, G418 sulphate (100 μ g/ml; Promega) was added to culture media. In all cases, culture media were supplemented with 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 10% fetal bovine serum.

Cells were routinely cultured in 95% air, 5% CO₂ (normoxic conditions) at 37°C. To expose the cells to hypoxia, they were placed in an airtight chamber with inflow and outflow valves (Billups-Rothenberg, Del Mar, CA) that were infused with a mixture of 1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂ (S.E. Carbueros-Metálicos, Madrid, Spain). In all experiments, cells were plated at 70–90% confluence and, when completely attached, they were treated for 6 h (unless otherwise indicated) with prostaglandin or exposed to hypoxia or desferroxamine in serum free media.

Western blot

Immediately after treatments, cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in 80 μ l of lysis buffer (50 mM Trizma, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 10 mM EDTA, 0.25% sodium deoxycholate and protease inhibitors). Cell lysates were sonicated and proteins were resolved onto 8–10% SDS-polyacrylamide gels. The proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane, blocked with 5% non-fat dry milk in PBS-T

(50 mM Trizma, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) and incubated overnight at 4°C with the corresponding antibodies. Immunolabeling was detected by enhanced chemiluminescence.

Immunoprecipitation assay

HK-2 cells were seeded in 10-cm dishes 1 day before experiments. After the different treatments, cells were lysed in 500 μ l lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 100 μ M Orthovanadate, 100 μ M PMSF and protease inhibitor cocktail, pH 8) and collected. Samples were centrifuged (12,000g for 20 min) and supernatants (500 μ g protein) were transferred into fresh tubes to pre-clear them with 20 μ l of Protein A/G Plus at 4°C for 1 h. Then, 2 μ g of antibodies anti-Hsp-90, anti-HIF-1 α or anti-Calpain-1 were added and incubated overnight at 4°C. Thereafter, 20 μ l of Protein A/G Plus were added and incubated at 4°C for an additional 3 h. Beads were collected, washed three times with 500 μ l lysis buffer and finally supplemented with 30 μ l 2 \times SDS-PAGE sample buffer and boiled at 95°C for 5 min. Beads were removed by centrifugation and supernatants were loaded onto 8% SDS-PAGE. Western blot analysis was performed using calpain-1, anti-HIF-1 α , anti-Lamp-2a or anti-Hsp-90 antibodies.

Calpain activity assay

Cells were resuspended in lysis buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.3, 145 mM NaCl, 10 mM EDTA). CaCl₂ (10 mM final concentration) was added to cell lysates, and then centrifuged for 10 min at 10,000g. CaCl₂ was substituted by EDTA in blanks. Calpain activity was measured in the supernatant fraction using the fluorogenic substrate (80 μ M) S-LLY-AMC (Calbiochem) for 30 min at 37°C [17]. Equal fractions of the supernatants were pre-incubated with the calpain inhibitor PD150606 (50 nM), for 30 min at 37°C before addition of the substrate. The fluorescence was determined by a Luminescence spectrophotometer LS50 (Perkin Elmer, Wellesley, MA) with an excitation wavelength of 380 nm and an emission wavelength of 460 nm. These enzyme activities were described as arbitrary unit/(min/mg) protein and they were expressed as percentage of the activity found in control cells. Calpain activity was determined as the difference between fluorescence measured without and with PD150606 and expressed as percentage of control.

Cathepsin B activity assay

After different cell treatments, HK-2 cells were lysed in lysis buffer (20 mM Tris pH 7; 0.5% NP-40, 250 mM

NaCl, 3 mM EDTA, 2 mM DTT, 3 mM EGTA, 0.5 mM PMSF, 20 mM glycerol phosphate, cocktail protease inhibitor) and then centrifuged for 20 min at 10,000g. Supernatant fractions were recovered and Cathepsin B activity was measured as described elsewhere [18]. Briefly, equal fractions of the cell supernatants were pre-incubated with the cathepsin B inhibitor CA-074 Me (10 μ M) and a fluorogenic substrate Z-RR-AMC (50 μ M) (Bachem, Bubendorf, Switzerland) for 60 min at 37°C. The fluorescence was analyzed by a Luminescence spectrophotometer LS50 (Perkin Elmer) with an excitation wavelength of 355 nm and an emission wavelength of 440 nm. Cathepsin B activity was determined as the difference between fluorescence measured with or without CA-074 Me, represented as percentage of control.

Immunofluorescence analysis

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, 10 min at RT, rinsed, and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS (10 min). Cells were then incubated for 1 h with 5% donkey serum in PBS to block nonspecific binding. Afterwards cells were incubated overnight at 4°C with anti-HIF-1 α antibody (1:100) and anti-Lamp-2a (1:100) and then rinsed with PBS. Finally, cells were incubated with FITC-labelled anti-mouse IgG and Texas red (anti-rabbit), both diluted 1:500, for 1 h in the darkness. Slides were then washed and mounted with FluorSaveTM Reagent (Calbiochem). Dual-color detection was performed by confocal laser scan microscopy LEICA TCS-SL (Heidelberg, Germany).

Statistical analysis

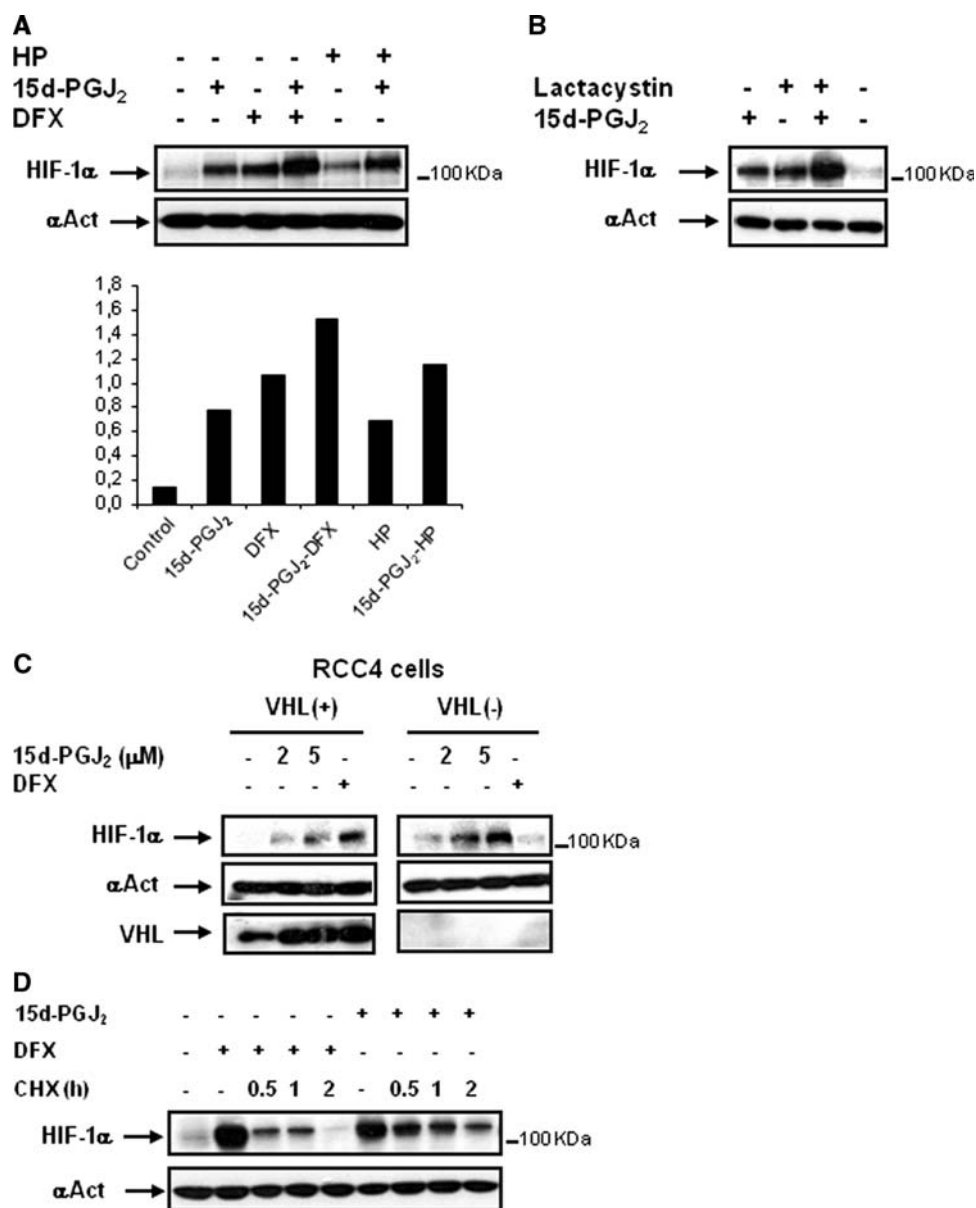
Each experiment was repeated at least three times. Results are expressed as the mean \pm SEM. Statistical analysis was performed by either nonparametric Kruskal-Wallis test or Mann-Whitney test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

pVHL-independent mechanisms are involved in 15d-PGJ₂-induced HIF-1 α stabilization

It has been widely accepted that oxygen-induced HIF-1 α degradation mainly occurs through the canonic PHD-pVHL-ubiquitin dependent proteasome pathway. Therefore, accumulation of HIF-1 α in normoxia is easily achieved when inhibiting this pathway. However, multiple lines of evidence indicate that stabilization of HIF-1 α is also possible through pVHL-independent mechanisms

Fig. 1 pVHL-independent mechanisms are involved in 15d-PGJ₂-induced HIF-1 α stabilization. **a** HK-2 cells were incubated for 6 h in normoxia or hypoxia (H, 1% O₂) and treated with or without 2 μ M 15d-PGJ₂ or in combination with 380 μ M DFX, or **b** 10 μ M lactacystin. **c** RCC4 cells and their counterparts expressing pVHL [VHL(-) or VHL(+), respectively], were incubated for 6 h in the absence or presence of (2–5) μ M 15d-PGJ₂ or with 380 μ M DFX. Cells from **a**, **b** and **c** were lysed and HIF-1 α levels were determined by Western blot analysis. As a loading control, blots were reprobated with anti- α -actin. **d** Stability of HIF-1 α was determined in cells treated with DFX or with 15d-PGJ₂. Cells were incubated for 6 h with or without 380 μ M DFX or 2 μ M 15d-PGJ₂. Thereafter, the protein translation inhibitor cycloheximide (CHX, 50 μ g/ml) was added and incubation continued for up 2 h. Each experiment was performed at least three times and representative data are shown



[11–13, 15, 19]. According to this, we have previously shown that 15d-PGJ₂ induces normoxic stabilization of HIF-1 α protein, without affecting HIF-1 α mRNA levels or chymotrypsin-like proteasome activity [10]. These studies suggested that 15d-PGJ₂ might also inhibit HIF-1 α degradation by other mechanisms. Although these results might also be compatible with a 15d-PGJ₂-mediated inhibition of HIF-1 α degradation by the known pathway, we asked whether other mechanisms than the canonic pathway were relevant for the 15d-PGJ₂-mediated accumulation of HIF-1 α .

To confirm this hypothesis, we first studied the effect of 15d-PGJ₂ on HIF-1 α accumulation in HK-2 cells in which we had previously inhibited the PHD-pVHL-ubiquitin-dependent proteasome pathway by hypoxia, desferroxamine

(DFX) or lactacystine. Our results showed that under such conditions 15d-PGJ₂ induced an over-accumulation of HIF-1 α in all instances (Fig. 1a, b). Most importantly, this was also confirmed in RCC4-cells (Fig. 1c), which lack VHL protein and therefore are unable to degrade HIF-1 α by the VHL-dependent pathway. This would not be possible if 15d-PGJ₂ were only an inhibitor of the canonic pathway of HIF-1 α degradation. Next, we studied the turnover of HIF-1 α in HK-2 cells that had been treated with either DFX or 15d-PGJ₂ for 6 h, followed by 30–120 min incubation with the protein translation inhibitor cycloheximide (CHX). Our results indicated that in 15d-PGJ₂-treated cells HIF-1 α had a longer half-life compared to DFX-treated ones (Fig. 1d). Taken together, these results suggested that PHD-pVHL-independent mechanisms contribute to

15d-PGJ₂-mediated increase on HIF-1 α half-life. Therefore, the aim of our present study is to identify those mechanisms.

Stabilization of HIF-1 α by 15d-PGJ₂ does not require interaction between Hsp-90 and HIF-1 α

It has been recently found that Hsp-90 is a target for modification by 15d-PGJ₂ in renal mesangial cells [20]. On the other hand, HIF-1 α degradation is regulated in an oxygen-independent manner by Hsp-90 [14]. These authors show that geldanamycin (GA), an Hsp-90 antagonist, promotes efficient ubiquitination and proteasome-mediated degradation of HIF-1 α in RCC4 cells lacking functional VHL. Taking this into consideration, we hypothesized that Hsp-90 could be involved in the 15d-PGJ₂-mediated accumulation of HIF-1 α .

In order to assess our hypothesis, we examined the effect of GA on cells incubated with DFX or 15d-PGJ₂ (Fig. 2). Whereas incubation with 250 nM GA resulted in a dramatic decrease in HIF-1 α expression in DFX-treated cells (Fig. 2a), 15d-PGJ₂-induced HIF-1 α accumulation was further increased by GA (Fig. 2b). However, co-immunoprecipitations using an anti-Hsp-90 antibody followed by detection with a HIF-1 α antibody indicated that GA had dissociated the HIF-1 α -Hsp-90 chaperone complex in 15d-PGJ₂-treated cells (Fig. 2c). Therefore, we can conclude from these results that interaction between Hsp-90 and HIF-1 α is not necessary for 15d-PGJ₂-induced stabilization of HIF-1 α .

Stabilization of HIF-1 α by 15d-PGJ₂ is not due to inhibition of calcium/calpain activity

It has been previously shown that calcium/calpain activity mediates a pVHL-independent degradation of HIF-1 α [15]. Therefore, the possibility exists that this system could be involved in the pVHL-independent accumulation of HIF-1 α by 15d-PGJ₂. To ascertain this, we aimed to determine whether inhibition of calcium/calpain-mediated degradation of HIF-1 α was inhibited by 15d-PGJ₂. To pursue this aim, we first analyzed the effect of ionomycin or thapsigargin, two agents known to promote intracellular calcium, or the effect of calpain inhibitors such as PD150606 and calpastatin on 15d-PGJ₂-induced HIF-1 α accumulation in HK-2 cells. Incubation of HK-2 cells with ionomycin or thapsigargin resulted in lower DFX- or 15d-PGJ₂-induced HIF-1 α accumulation (Fig. 3a), thus indicating that calcium-mediated HIF-1 α degradation is active in both instances. According to these results, the treatment with calpain inhibitors resulted in over-accumulation of HIF-1 α in both DFX-treated and 15d-PGJ₂-treated cells (Fig. 3b). This indicated that calpain-mediated degradation

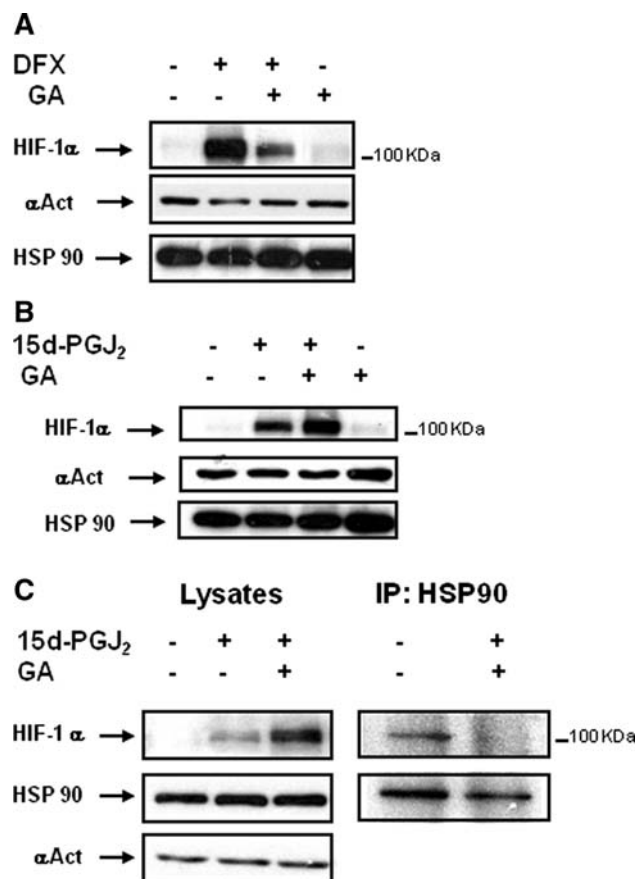


Fig. 2 Effect of the Hsp-90 inhibitor geldanamycin (GA) in the 15d-PGJ₂-mediated stability of HIF-1 α . HK-2 cells were co-incubated for 6 h with 250 nM GA and either 380 μ M DFX (a) or 2 μ M 15d-PGJ₂ (b). Cells were lysed, and HIF-1 α and Hsp-90 levels were determined by Western blot analysis. As a loading control, blots were probed with anti- α actin. Each experiment was performed at least three times and a representative one is shown. c To assess the effect of GA on 15d-PGJ₂-mediated Hsp-90 association with HIF-1 α , cells were incubated for 6 h with 15d-PGJ₂ in the absence or presence of 250 nM GA. Cells were then collected followed by immunoprecipitation with anti-Hsp-90 antibody as described in "Materials and methods". Input controls show protein expression in cell lysates. Immunoprecipitates were probed by western analysis using anti-HIF-1 α or Hsp-90 antibodies. A representative experiment out of three is shown

of HIF-1 α is still operative even after treatment with 15d-PGJ₂. To confirm these results, we performed immunoprecipitation assays to determine if there was interaction of calpain with HIF-1 α in 15d-PGJ₂-treated cells. Our results indicated that 15d-PGJ₂ did not inhibit the interaction between HIF-1 α and calpain (Fig. 3c). Finally, we assessed the effect of 15d-PGJ₂ on calpain activity in HK-2 cells. Our results showed that incubation with 15d-PGJ₂ was not proved to induce changes on calpain activity (Fig. 3d). Taken together, these results indicate that stabilization of HIF-1 α by 15d-PGJ₂ was not due to the inhibition of the calcium/calpain pathway.

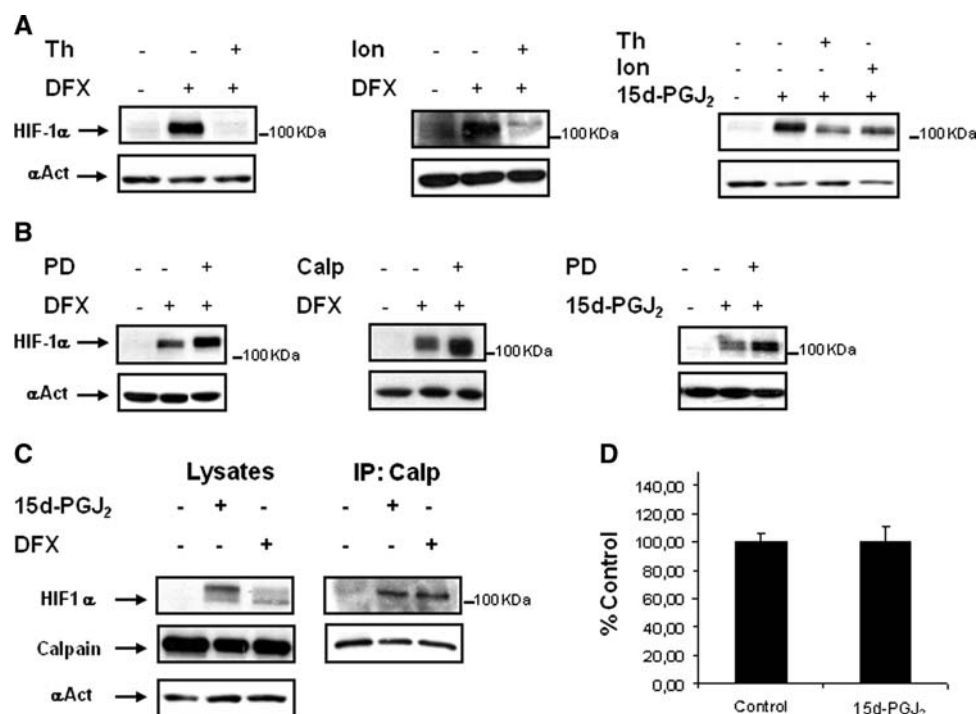


Fig. 3 Degradation of HIF-1 α via calcium/calpain in HK-2 cells and effect of 15d-PGJ₂. The effect of agents that increase cytosolic calcium or calpain inhibitors on the 15d-PGJ₂-mediated stabilization of HIF-1 α was determined. Cells were incubated for 6 h with or without 380 μ M DFX or 15d-PGJ₂ (2 μ M) in the presence or absence of the following compounds: **a** 30 nM thapsigargin (Th), 1 μ M ionomycin (Ion), and **b** calpain inhibitors such as 50 μ M PD150606 (PD) or 2 μ M calpastatin (Calp). Thereafter, cells were lysed, and HIF-1 α levels were determined by Western blot analysis. As a loading control, blots were reprobed with anti- α -actin. Each experiment was performed at least three times and a representative one is shown. **c** Cells under normoxic conditions were incubated in the presence of

380 μ M DFX or 15d-PGJ₂ for 6 h. Cells were then collected and immunoprecipitated with an anti-calpain antibody as described in “Materials and methods”. Input controls show protein expression in cell lysates. Immunoprecipitates were probed for HIF-1 α and calpain-1 protein levels using anti-HIF-1 α or anti-calpain-1 antibodies, respectively. The experiment was performed at least three times and a representative one is shown. **d** Effect of 15d-PGJ₂ on calpain activity. Cells were incubated for 6 h in the absence (control) or with 2 μ M 15d-PGJ₂ and calpain activity was determined as described in “Materials and methods”. Calpain activity is represented as percentage of control. Values are the mean \pm SD of four independent experiments

15d-PGJ₂ prevents HIF-1 α degradation by lysosomal activity

To ascertain whether other enzymatic (proteolytic) systems could be involved in HIF-1 α degradation, we determined HIF-1 α half-life in HK-2 cells where both proteasome and calcium/calpain pathways were inhibited with DFX and PD150606. In this setting, HIF-1 α levels induced by DFX were quickly reduced by \approx 50% during the first 30 min, and there was no remaining HIF-1 α after incubation for 2 h with CHX. Thus, HIF-1 α levels accumulated by DFX and PD had longer half-life than with DFX alone; however, HIF-1 α was also degraded after 2 h with CHX (Fig. 4a). This suggested the existence of other VHL-independent and calcium/calpain-independent mechanisms that are also actively degrading HIF-1 α .

It has been previously reported that inhibitors of cathepsin B stabilized HIF-1 α in retinal endothelial cells [16]. Although cathepsin B is a protease present in lysosomes, other reports have localized this protease in

extralysosomal compartments [21–23]. Therefore, it is not clear from Im et al.’s studies whether these organelles are involved in HIF-1 α degradation. Therefore, this can be an interesting pathway that might be involved in 15d-PGJ₂-induced HIF-1 α stabilization.

Firstly, we analyzed whether HIF-1 α could be localized at the lysosomal fraction. Therefore, we incubated HK-2 cells or HeLa cells under hypoxia or treated with DFX versus normoxic conditions. Confocal microscopy analysis showed that a fraction of HIF-1 α in cells treated with DFX or under hypoxia co-localized with Lamp-2a, a specific lysosomal marker (Fig. 4b and data not shown). In addition, expression of HIF-1 α increased in HK-2 cells treated with chloroquine (an inhibitor of lysosomal activity) or CA-074 Me (an inhibitor of cathepsin B) incubated under normoxia for 24 h. In RCC4- cells (which lack VHL protein) HIF-1 α expression was also increased after chloroquine stimulation for 24 h (Fig. 4c). These results indicate that lysosomes participate in the degradation of HIF-1 α in normoxia.

Given that degradation of HIF-1 α in lysosomes has not previously been described, we investigated the implication of lysosomes in the degradation of HIF-1 α in cells treated with 15d-PGJ₂. HK-2 cells were incubated for 6 h with 15d-PGJ₂, and HIF-1 α localization was assessed under confocal microscopy. We found that a fraction of HIF-1 α in HK-2 cells co-localized with Lamp-2a. To determine whether there was interaction of HIF-1 α with Lamp-2a, we performed immunoprecipitation assays with cells treated with either 15d-PGJ₂ or MG132, an inhibitor of proteasome, calpain and most lysosomal enzymes [24, 25]. Our results confirmed that HIF-1 α and Lamp-2a not only co-localized in the lysosomes but interacted with each other (Fig. 4d). The next question was to ascertain whether the degradation of HIF-1 α inside the lysosomal compartment was inhibited by 15d-PGJ₂, thus contributing to HIF-1 α stabilization. This issue was addressed by co-incubating HK-2 cells with 15d-PGJ₂ and either chloroquine or CA-074 Me. Incubation with these inhibitors did not result in over-accumulation of HIF-1 α in 15d-PGJ₂-treated cells (Fig. 4e) which suggested that lysosomal degradation of HIF-1 α was already inhibited by 15d-PGJ₂. In contrast to these results, incubation with DFX and either chloroquine or CA-074 Me resulted in an over-accumulation of HIF-1 α (Fig. 4e). Therefore, our results pointed out that 15d-PGJ₂-mediated accumulation of HIF-1 α might be due to inhibition of lysosomal degradation by this cyclopentenone prostaglandin. To confirm these results, we assessed lysosomal activity in the presence of 15d-PGJ₂. We analyzed Cathepsin B activity under different 15d-PGJ₂ concentrations, hypoxia or desferroxamine. Our results indicated that increased concentrations of 15d-PGJ₂ inhibited cathepsin B activity (34% at 2 μ M and 74% at 10 μ M vs. control). At 10 μ M, the percentage of inhibition was similar to the inhibition levels achieved by CA-074 Me compared to control with no treatment. However, cathepsin B activity was not affected by hypoxia or DFX (Fig. 4f). Therefore, these results indicated that 15d-PGJ₂ effect on HIF-1 α accumulation was due to inhibition of lysosomal activity.

In conclusion, this set of results indicated that lysosomes degrade HIF-1 α and that they are one of the targets through which 15d-PGJ₂ accumulates HIF-1 α in HK-2 cells. To our knowledge, this is the first report showing lysosomal contribution to the HIF-1 α degradation.

Semiquantitative comparison studies on the relative efficiency and kinetics of the three proposed pathways for HIF-degradation

Given that three different pathways—namely proteasome, calpain and lysosomes—are potentially involved in the degradation of HIF-1 α in HK-2 cells, we designed experiments to assess the relative efficiency and kinetics

of these three pathways. We first studied the time-course of HIF-1 α accumulation after inhibiting (1) the proteasome pathway with either hypoxia or desferroxamine, (2) the lysosomal pathway with chloroquine, and (3) the calpain pathway with PD150606. Our results shown in Fig. 5a indicated that (1) inhibition of the proteasome pathway during 6 h resulted in a strong accumulation of HIF-1 α , (2) incubation for 24 h with the inhibitor of lysosome chloroquine induced mild accumulation of HIF-1 α (while no HIF-1 α accumulation was observed at 6 h), and (3) inhibition of the calpain pathway did not result in any accumulation of HIF-1 α . In summary, this set of experiments indicated that the proteasome is the quickest and more efficient pathway for HIF-1 α degradation, that the lysosomal pathway is slower and less efficient, and that the calpain pathway itself does not contribute significantly to HIF-1 α degradation (although, as observed in Fig. 4a, calpain activity modulates the stability of HIF-1 α accumulated by simultaneous inhibition of the proteasome pathway).

We next addressed the question of the relative kinetics of HIF-1 α degradation after its accumulation by inhibiting the proteasomal or the lysosomal pathways. To this end, cells were incubated for 24 h under hypoxia or treated for 24 h with chloroquine or CA-074Me, and followed by 30–120 min incubation with the protein translation inhibitor cycloheximide (CHX). In order to compare HIF-1 α maximal stabilization, cells were incubated with MG132, an inhibitor of proteasome, calpains and lysosomal pathways [24, 25].

In cells under hypoxia, the quick reduction of HIF-1 α levels after treatment with CHX (Fig. 5b, left upper panel) indicated that pVHL-proteasome independent pathways of HIF-1 α degradation play an important role in the regulation of HIF-1 α final levels. This role is clearly indicated by the fact that inhibition of all the potential pathways of HIF-1 α degradation by MG132 results in maintained levels of HIF-1 α along the 2-h treatment with CHX (Fig. 5b, right upper panel). In CA-074Me- or chloroquine-treated cells, the reduction of HIF-1 α levels after treatment with CHX (Fig. 5b) indicated that HIF-1 α degradation was slower than that found in cells treated with the inhibitors of the proteasome pathway hypoxia (Fig. 5b) or DFX (Fig. 4a). The slower degradation of HIF-1 α probably reflects the fact that HIF-1 α is accumulated inside the lysosomes, which makes its degradation by cytosolic pathways such as proteasome and calpains difficult. Altogether, these results indicated that, although the pVHL-dependent degradation pathway is the most efficient for HIF-1 α degradation in the cytoplasm, there are also other pathways, like the lysosomal pathway, that contribute to HIF-1 α degradation, and they probably become more important when the others do not work.

Discussion

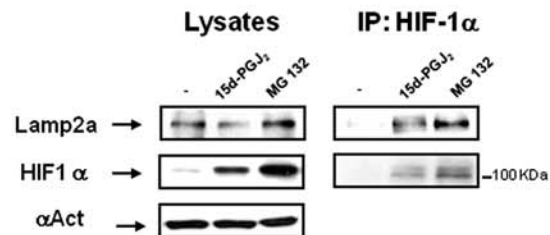
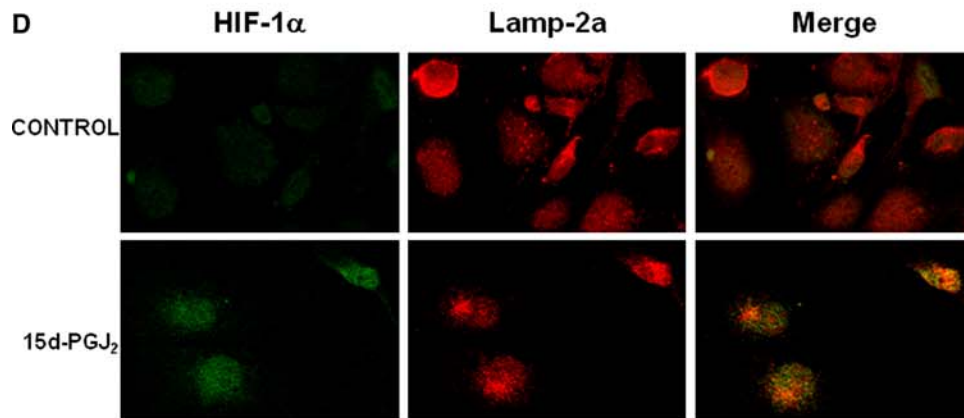
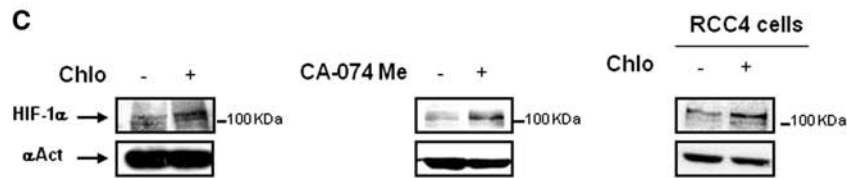
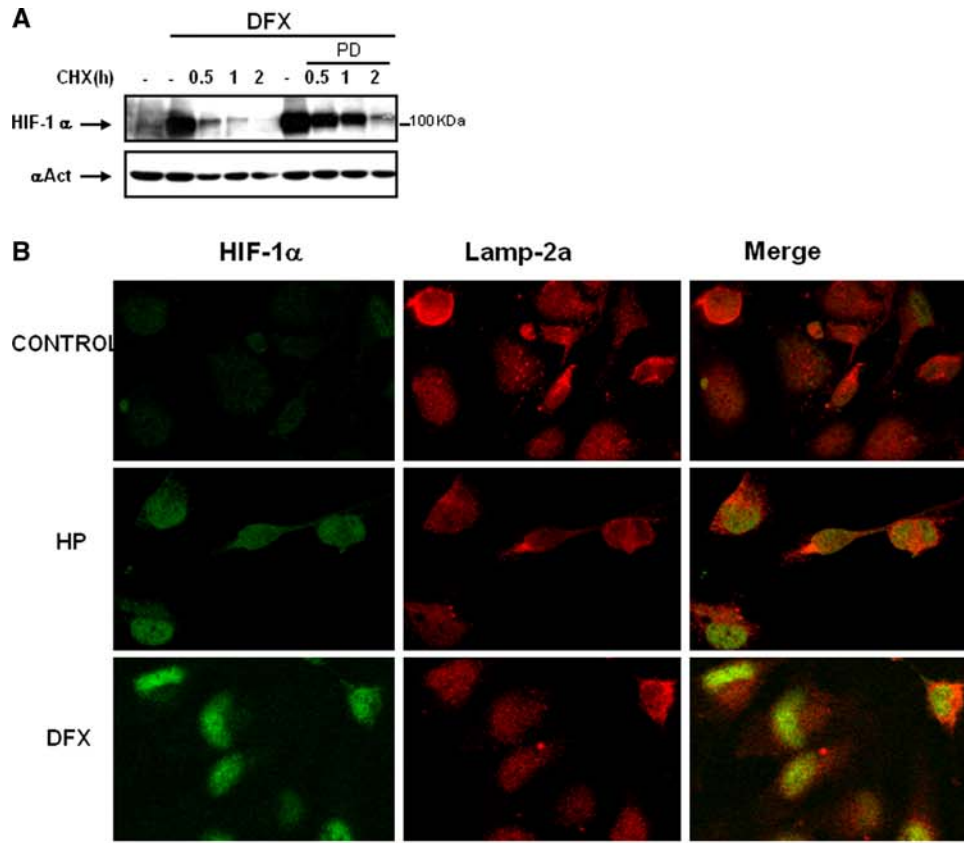
We have previously found that 15d-PGJ₂ acts as an inducer of biologically active HIF-1 α in renal cells under normoxic conditions. Although the contribution of pVHL-dependent mechanisms cannot be underestimated, here we show that 15d-PGJ₂ induced HIF-1 α accumulation by a pVHL-proteasome-independent mechanism. Our results have demonstrated that 15d-PGJ₂ effect on HIF-1 α accumulation was not through calcium/calpain-dependent pathways and did not require interaction between Hsp-90 and HIF-1 α , although HIF-1 α degradation in HK-2 cell was affected by both. Instead, 15d-PGJ₂ inhibited a sub-cellular pathway in the lysosomes, showing this lysosomal degradation of HIF-1 α as a new mechanism of HIF-1 α stabilization. These results are summarized in Fig. 6.

There are three different proteolytic activities in mammalian proteasomes: chymotrypsin-like, caspase-like and trypsin-like activities. It is widely assumed that inhibition of the chymotrypsin-like site, the primary target of the proteasome inhibitors used in research and cancer therapy, reflects the degree of inhibition of protein breakdown. Actually, this is far from being rigorously exact: when one type of active site is inactivated, the two others assume increasing importance in cleavage of the protein. Thus, not surprisingly, inhibition of either of the residual sites has a greater impact in reducing protein degradation than when that site alone is blocked [26]. We have previously described that treatment of HK-2 cells with 15d-PGJ₂ does not inhibit chymotrypsin-like proteasome activity [10]. However, since 15d-PGJ₂ inhibits the protease cathepsin B, we cannot rule out that inhibition of caspase-like and/or trypsin-like proteasomal activities by 15d-PGJ₂ might contribute to the accumulation of HIF-1 α . Furthermore, there are other ways by which 15d-PGJ₂ might affect proteasomal degradation of HIF-1 α . For instance, accumulation of HIF-1 α by 15d-PGJ₂ involves the electrophilic reaction of its α,β -unsaturated cyclopentenone moiety with thiol groups [10], and Δ^{12} -prostaglandin-J₂, whose electrophilic reactivity is very similar to 15d-PGJ₂, inhibits ubiquitin hydrolase UCH-L1 and elicits ubiquitin-dependent proteasomal degradation of proteins without proteasome inhibition [27]. If this mechanism was also triggered by 15d-PGJ₂ (currently under investigation), it would probably contribute to the accumulation of HIF-1 α . It is tempting to speculate that 15d-PGJ₂ might also inhibit PHD-pVHL-dependent HIF-1 α degradation by lowering the availability of Fe(II). This could be achieved either by oxidation of Fe(II) or by the action of 15d-PGJ₂ on lysosomes (see below). Nevertheless, it will be necessary to measure the cell levels of Fe(II) to confirm this hypothesis. However, taking into account that the inhibition of lysosomes only needed 24 h to accumulate HIF-1 α (Fig. 4c), it

Fig. 4 Effect of 15d-PGJ₂ on lysosomal activity and its contribution to HIF-1 α stabilization. **a** The effect of PD150606 calpain inhibitor on HIF-1 α half-life was determined in HK-2 cells. Cells were incubated for 6 h with 380 μ M DFX in the presence or absence of 50 μ M PD150606. Thereafter, the protein translation inhibitor cycloheximide (CHX, 50 μ g/ml) was added and incubation continued for up to 2 h. HIF-1 α protein levels were determined by Western blot. **b** Immunofluorescence experiments were performed to determine whether HIF-1 α , accumulated under several conditions, co-localizes with the lysosomal protein Lamp-2a. Role of lysosomes in HK-2 cells under hypoxia or DFX treated cells versus normoxic conditions. HK-2 cells were incubated for 6 h with 380 μ M DFX or incubated under hypoxic conditions (1% O₂). Then, cells were fixed and incubated with anti-HIF-1 α and anti-Lamp-2a antibodies as described in “Materials and methods”. Immunofluorescence for Lamp-2a (red) and HIF-1 α (green) is shown. **c** Accumulation of HIF-1 α by lysosome inhibitors in normoxia. Cells were incubated for 24 h in the presence or absence of 50 μ M chloroquine or 10 μ M CA-074 Me. After incubation, cells were lysed, and HIF-1 α levels were determined by Western blot analysis. **d** HK-2 cells were incubated for 6 h with 2 μ M 15d-PGJ₂. Then, cells were fixed and co-incubated with anti-HIF-1 α and anti-Lamp-2a antibodies as described in “Materials and methods”. Immunofluorescence for Lamp-2a (red) and HIF-1 α (green) is shown. As cells were incubated in parallel with DFX and hypoxia treatment, the control is the same as shown in Fig. 2b. Association of HIF-1 α with lysosome marker Lamp-2a was assessed by immunoprecipitating the cells after 6 h in the presence of 15d-PGJ₂ (2 μ M) or MG132 (10 μ M) as control of HIF-1 α accumulation with an anti-HIF-1 α antibody as described in “Materials and methods”. Immunoprecipitates were then probed by Western blot analysis using anti-HIF-1 α or Lamp2a antibodies. Input controls show protein expression in cell lysates. A representative experiment out of three is shown. **e** Effect of chloroquine (Chlo) or the cathepsin B inhibitor CA-074 Me on 15d-PGJ₂ or DFX-mediated HIF-1 α stabilization. Cells were incubated for 24 h with 2 μ M 15d-PGJ₂ or 380 μ M DFX in the presence or absence of 50 μ M chloroquine or 10 μ M CA-074 Me. HIF-1 α expression levels were analyzed by Western Blot. **f** To determine the effect of 15d-PGJ₂ on cathepsin B activity, cells were incubated for 24 h with 10 μ M cathepsin B inhibitor CA-074Me, 2-5-10 μ M 15d-PGJ₂, 380 μ M DFX or under hypoxic conditions (1% O₂). Cathepsin B activity was measured as described in “Materials and methods”. The experiment was performed three times and each bar is the mean \pm SD of the obtained results. **P* < 0.01 versus control

seems reasonable to hypothesize that the high degree of HIF-1 α stabilization after 6 h incubation with 15d-PGJ₂ (Fig. 1d) can only be achieved by the inhibition of the efficient pVHL-dependent pathway and the simultaneous inhibition of other(s) pathways.

In this paper, we have studied the effect of 15d-PGJ₂ on non-canonic pathways involved in HIF-1 α accumulation. Among the pVHL-independent, proteasome-dependent mechanisms of HIF-1 α accumulation which could be potentially affected by 15d-PGJ₂, we studied that involving Hsp-90 [14] because this is a previously described target for 15d-PGJ₂ [20]. Among the proteasome-independent mechanisms, we studied the effect of 15d-PGJ₂ on the calcium/calpain pathway because calpains have a cysteine residue at their active site [28] which might be inactivated by its reaction with 15d-PGJ₂, since it is known to bind



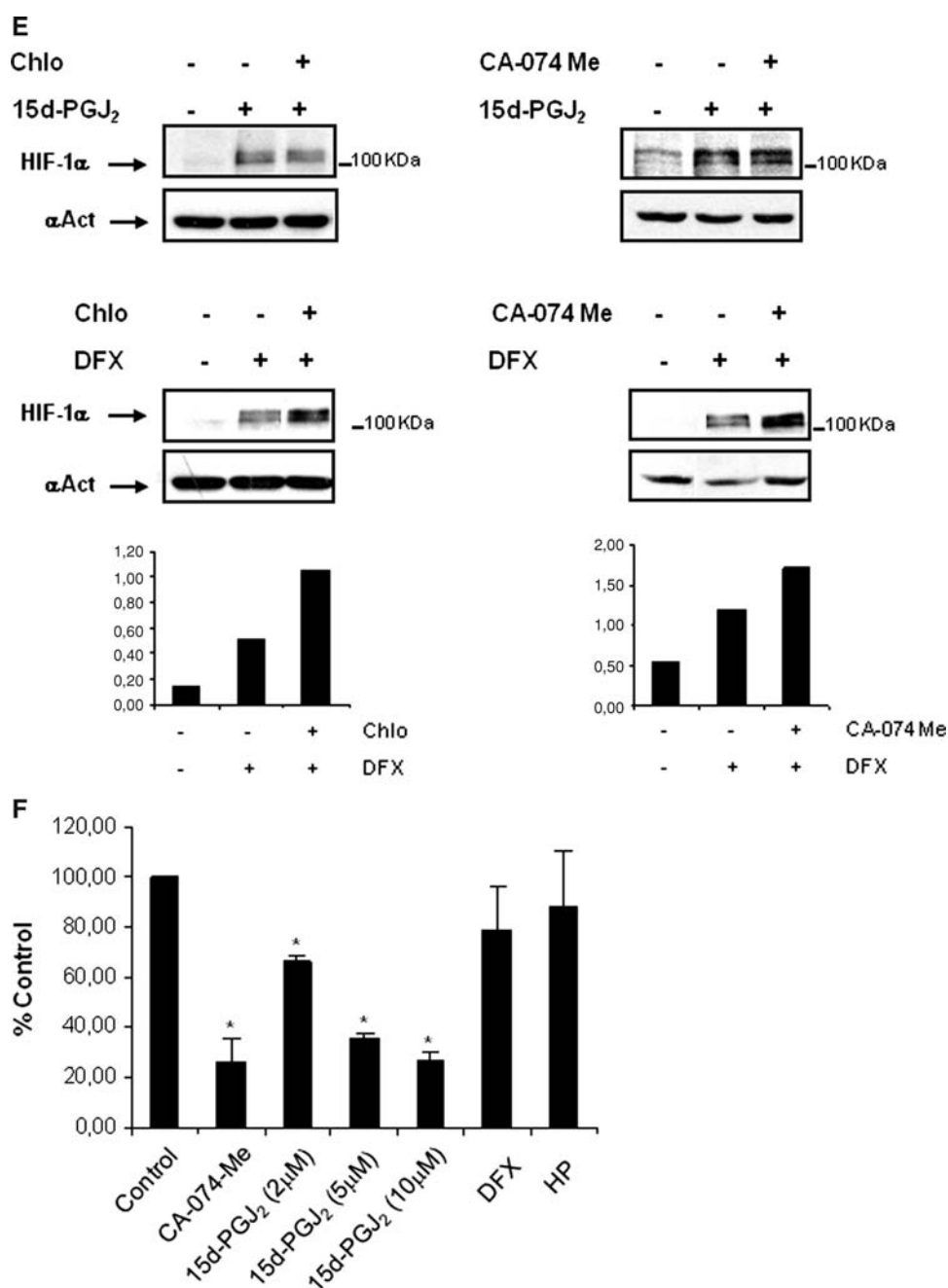
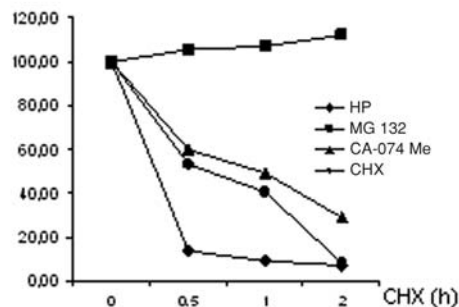
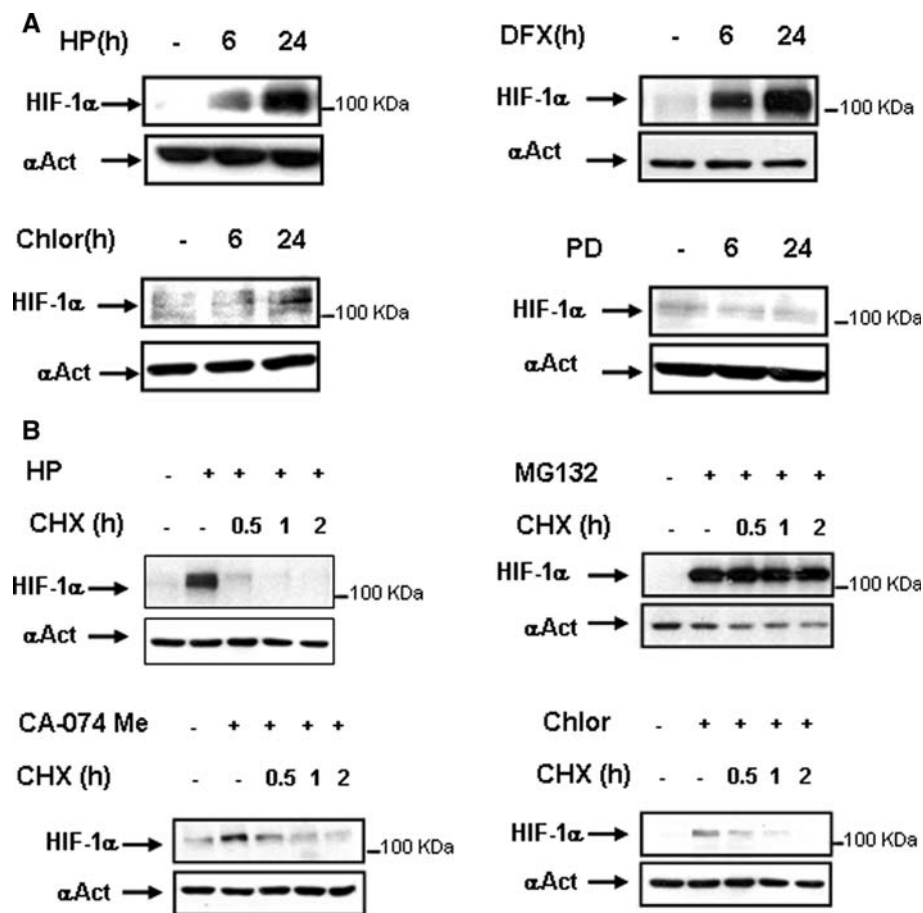


Fig. 4 continued

covalently to cysteines residues in proteins [29–31]. However, according to our results, none of these pathways (Hsp-90 or calcium/calpain) seemed to be involved in 15d-PGJ₂-induced HIF-1 α accumulation. This led us to study the contribution of other degradative pathways involved in HIF-1 α degradation. It has previously been reported that inhibitors of the lysosomal protease cathepsin B stabilize HIF-1 α in retinal endothelial cells [16]. In this report, we have demonstrated that lysosomes contribute to the degradation of HIF-1 α since: (1) inhibition of lysosomal

activity resulted in the accumulation of HIF-1 α in normoxic HK-2 cells, (2) incubation with chloroquine or inhibiting cathepsin B resulted in over-accumulation of HIF-1 α in DFX-treated cells, and (3) a fraction of HIF-1 α , accumulated by hypoxia or by treatment with DFX or 15d-PGJ₂, co-localized and immunoprecipitated with the specific lysosomal protein Lamp-2a. The last suggests that lysosomes are a constitutively operative system for HIF-1 α degradation. This might help to avoid an excessive increase in the intracellular levels of HIF-1 α (which could possibly

Fig. 5 Comparative studies of the relative efficiency and kinetics of the three proposed pathways for HIF-1 α -degradation. **a** HK-2 cells were incubated for 6 or 24 h in the presence of 380 μ M DFX; 50 μ M calpain inhibitor PD150606 (PD), 50 μ M cloroquine or under hypoxia (1% O₂). **b** Cells were incubated with 10 μ M MG132 or under hypoxia (1% O₂) for 6 h or with cloroquine (50 μ M) or CA-074 Me (10 μ M) for 24 h. Thereafter, 50 μ g/ml of the protein translation inhibitor cycloheximide (CHX,) was added and incubation continued for up to 2 h. Cells were lysed immediately, and HIF-1 α levels were determined by Western blot analysis. As a loading control, blots were reprobed with anti- α -actin. Each experiment was performed at least three times and a representative one is shown. Densitometric analysis is shown below

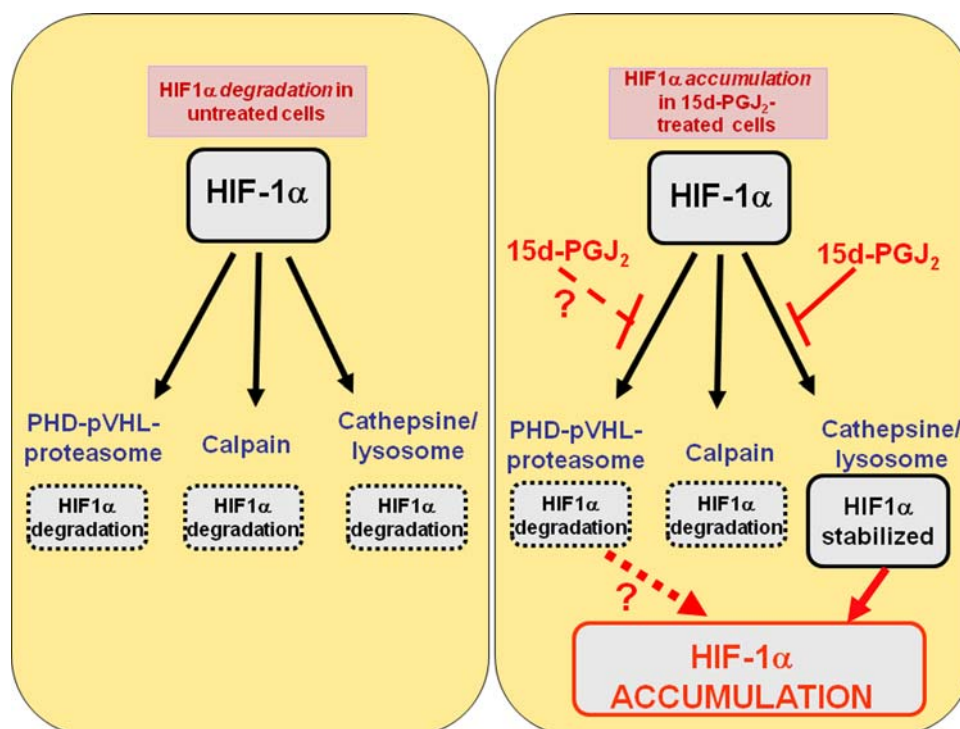


occur after the inhibition of its degradation through the highly efficient proteasome pathway). In fact, an increase in the number of lysosomes in the adrenal glomerulosa zone in rats under chronic hypoxia [32] as well as in the myocardium of diabetic rats under acute hypoxia has previously been shown [33]. This lysosomal proliferation could enhance the efficiency of the lysosomal-mediated degradation of HIF-1 α when hypoxia blocks its proteasomal degradation.

Chaperone-mediated autophagy (CMA) is a generalized form of highly selective autophagy. All the CMA substrate proteins described to date are soluble cytosolic proteins containing a targeting motif biochemically related to the pentapeptide KFERQ (reviewed by [34]). This motif is

recognized by the cytosolic chaperone heat shock cognate protein which, after interacting with several cochaperones including Hsp-90 [35], targets the substrate to the lysosomal membrane. In this location it interacts with Lamp-2a, which is responsible of substrate uptake [34]. Interestingly, Hsp-90 is also found in the lysosomal lumen. However, although it has two KFERQ-related motifs, it remains unknown whether it is functional or it is only internalized to be degraded [36]. Although amino acid sequence analysis of HIF-1 α revealed the absence of KFERQ motifs (unpublished observations), the interaction between Lamp-2a and HIF-1 α -which was indicated by our immunoprecipitation data (Fig. 4d) suggests that CMA could be responsible for the lysosomal degradation of

Fig. 6 Enzymatic systems involved in the degradation of HIF-1 α in human proximal tubular renal cells HK-2. *Left*: there are three operative enzymatic systems for the degradation of HIF-1 α in HK-2 cells: proteasome (mainly through the PHD-pVHL-pathway, but also through other PHD-pVHL independent pathways such as this triggered by Hsp-90 inhibitor geldanamycin), calcium/calpain and cathepsin B/lysosome. *Right*: incubation with 15d-PGJ₂ results in HIF-1 α stabilization through the inhibition of cathepsin B/Lysosome, although the high degree of stabilization of HIF-1 α strongly suggests that 15d-PGJ₂ could also inhibit the PHD-pVHL-dependent proteasomal degradation of HIF-1 α



HIF-1 α . We hypothesize that Hsp-90, which has KFERQ motifs, acts as a carrier for HIF-1 α , targeting it to lysosomes. This proposed mechanism also could contribute to HIF-2 α degradation, since HIF-2 α also interacts with Hsp-90 [37].

The localization of HIF-1 α degradation in the nucleus or in the cytoplasm has been found to be a cell-type characteristic parameter but, whatever the cell type, degradation of HIF-1 α in the cytoplasm was always observed [38]. Furthermore, HIF-1 α has been found in organelles. For instance, in hepatocytes, hypoxia targeted HIF-1 α to the peroxisome, rather than the nucleus, where it co-localized with pVHL and the HIF hydroxylases [39]. It has also been found HIF-1 α in endoplasmic reticulum, in normoxia [40]. Therefore, it is likely that part of cytoplasmic HIF-1 α may reach other organelles, such as lysosomes, and that it undergoes proteolysis. On the other hand, the inhibition of lysosomal activity might also diminish the Fe(II)-dependent and pVHL-mediated degradation of HIF-1 α , since chloroquine, through the inhibition of lysosomal proteolysis of ferritin, causes three-fold more iron to be retained in ferritin in hepatoma cells [41]. The role of this mechanism in 15d-PGJ₂-induced accumulation of HIF-1 α remains to be confirmed. In addition, the possibility exists that 15d-PGJ₂ also increases the rate at which HIF-1 α enters into the lysosomal compartment which would help its lysosomal accumulation. Alternatively, cathepsin B may control the level of HIF-1 α indirectly, by degrading proteins such as Hsp-90, which are required for stabilizing HIF-1 α [14].

The role of Hsp-90 in the physiological degradation of HIF-1 α deserves further discussion. Interestingly, this role has been indirectly suggested by the experiments with 15d-PGJ₂ and GA. First of all, the fact that 15d-PGJ₂-induced HIF-1 α accumulation was not reversed by GA (Fig. 3b) suggests that the GA-triggered ubiquitin- and proteasome-dependent pathway of HIF-1 α degradation—which is likely responsible for the GA-induced HIF-1 α degradation in DFX-treated cells (Fig. 3a)—is inhibited by 15d-PGJ₂. As indicated above, electrophilic prostaglandins like 15d-PGJ₂ may inhibit ubiquitin-dependent proteasome degradation of proteins [27]. However, the inhibition of this pathway itself does not explain why HIF-1 α does actually increase in cells treated with 15d-PGJ₂ and GA (Fig. 3b). Let us suppose (1) that there is still another unidentified, low-efficiency pathway for HIF-1 α degradation which obligatorily requires that HIF-1 α is bound to Hsp-90 (this might be the pathway responsible for lysosomal entry of HIF-1 which we have hypothesized above), and (2) that 15d-PGJ₂ also inhibits this pathway. In DFX-treated cells, the disruption by GA of the interaction HIF-1 α -Hsp-90 would inhibit the hypothetical Hsp-90 pathway of degradation, but HIF-1 α will still decrease through the very efficient pVHL-independent, ubiquitin- and proteasome-dependent pathway. Let us consider the situation in 15d-PGJ₂-treated cells: treatment with GA will result, as expected, in the disruption of the interaction HIF-1 α -Hsp-90 and the consequent inhibition of the hypothetical Hsp-90-dependent pathway of HIF-1 α degradation. However, now the ubiquitin, proteasome-

dependent pathway is inhibited by 15d-PGJ₂ and, therefore, HIF-1 α will over-accumulate after GA treatment.

15d-PGJ₂ is able to modify proteins covalently [20] and its binding to free thiol groups of critical cellular proteins, and particularly its effect modifying cysteines, is likely to be in part the cause of its biological effects [29–31, 42–44]. It is conceivable that lysosomal cathepsins B, H, L and S—which are cysteine proteases and have a cysteine residue at their active site [28]—might be inactivated by its reaction with 15d-PGJ₂. In this context, the sulfhydryl reagent chloroacetaldehyde, a metabolite of the alkylating agent ifosfamide, has been shown to inhibit the cysteine proteases caspase-3, caspase-8 and cathepsin B in proximal tubule cells in primary culture [45]. In fact, we have previously shown that induction of HIF1- α by 15d-PGJ₂ is blocked by thiol-reducing agents N-acetylcysteine and dithiothreitol [10] and we have shown here that the activity of cathepsin B was inhibited by 15d-PGJ₂.

In conclusion, lysosomes degrade HIF-1 α , and they are one of the targets through which 15d-PGJ₂ accumulates HIF-1 α in HK-2 cells. The high degree of HIF-1 α stability induced by 15d-PGJ₂ points out to a potentially powerful effect of agents that induce protein thiol modification to accumulate HIF-1 α .

Our work also highlights the potential of pVHL-independent pathways in HIF-1 α degradation, particularly when the quickest and more efficient pVHL-dependent pathway has been physiologically or pharmacologically inhibited. For instance, the relatively quick semi-quantitative kinetics of HIF-1 α degradation in cells having inhibited the pVHL-pathway by DFX or hypoxia (Figs. 4a, 5b) reflect the important activity of pVHL-independent pathways in the degradation of HIF-1 α . However, these pathways are much less efficient than the pVHL-dependent pathway since (1) inhibition of calpain does not affect HIF-1 α accumulation (Fig. 5a) unless the pVHL-pathway is also inhibited (Fig. 4a), and (2) inhibition of lysosomal degradation only results in HIF-1 α accumulation after 24 h (Fig. 4c). Therefore, the maximal stabilization of HIF-1 α will be achieved when the three pathways of degradation—namely pVHL-dependent proteasome, calpain-dependent and lysosome dependent—are simultaneously inhibited, as when MG132 was used (Fig. 5b).

Since HIF-1 α is known to upregulate factors that have been shown to be cytoprotective during acute renal injury, inhibition of HIF-1 α proteolysis by 15d-PGJ₂ might be a useful preventative strategy to improve clinical outcome of ischemia/reperfusion injuries such as those associated with procedures that involve cardiothoracic surgery or renal cadaveric transplantation.

Acknowledgments This work was supported by grants SAL-0311-2006 from the Comunidad de Madrid, SAF2008-01767 from the

Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación and CCG08-UAH/BIO-4102 from University of Alcalá.

References

1. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim AA, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001) Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292(5516):468–472
2. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr (2001) HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292(5516):464–468
3. Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001) Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J* 20:5197–5206
4. Hirsila M, Koivunen P, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J (2003) Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 278(33):30772–30780
5. Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS (2001) HIF-1 α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(17):9630–9635
6. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML (2002) Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: a hypoxic switch. *Science* 295(5556):858–861
7. Matsumoto M, Makino Y, Tanaka T, Tanaka H, Ishizaka N, Noiri E, Fujita T, Nangaku M (2003) Induction of renoprotective gene expression by cobalt ameliorates ischemic injury of the kidney in rats. *J Am Soc Nephrol* 14(7):1825–1832
8. Guo G (2004) Improvement of kidney function in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury by treatment with a novel HIF prolyl-hydroxylase inhibitor. *ASN annual meeting, St Louis MO. J Am Soc Nephrol* 15:460A
9. Chatterjee PK, Patel NS, Cuzzocrea S, Brown PA, Stewart KN, Mota-Filipe H, Britti D, Eberhardt W, Pfeilschifter J, Thiemermann C (2004) The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin-J₂ ameliorates ischemic acute renal failure. *Cardiovasc Res* 61:630–643
10. Olmos G, Conde I, Arenas MI, Del Peso L, Castellanos C, Landazuri MO, Lucio-Cazana FJ (2007) Accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α through a novel electrophilic, thiol antioxidant-sensitive mechanism. *Cell Signal* 19:2098–2105
11. Flügel D, Görlach A, Michiels C, Kietzmann T (2007) Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1 α and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Mol Cell Biol* 27:3253–3265
12. Liu YV, Baek JH, Zhang H, Diez R, Cole RN, Semenza GL (2007) 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* 25:207–217
13. Qian DZ, Kachhap SK, Collis SJ, Verheul HMW, Carducci MA, Atadja P, Pili R (2006) Class II histone deacetylases are associated with VHL-independent regulation of hypoxia-inducible factor 1A. *Cancer Res* 66:8814–8821
14. Isaacs JS, Jung Y, Mimnaugh EG, Martine ZA, Cuttitta F, Neckers LM (2002) Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 α -degradative pathway. *J Biol Chem* 277:29936–29944
15. Zhou J, Köhl R, Herr B, Frank R, Brüne B (2006) Calpain mediates a von hippel-lindau protein-independent destruction of hypoxia-inducible factor-1 α . *Mol Cell Biol* 17:1549–1558

16. Im E, Venkatakrishan A, Kazlauskas A (2005) Cathepsin B regulates the intrinsic angiogenic threshold of endothelial cells. *Mol Biol Cell* 16:3488–3500
17. Waters SL, Sarang SS, Wang KKW, Schnellmann RG (1997) Calpain mediate calcium and chloride influx during the late phase of cell injury. *J Pharmacol Exp Ther* 117:7–1184
18. Wu TY, Tan HL, Huang Q, Kim YS, Pan N, Ong WY, Liu ZG, Ong CN, Shen HM (2008) Autophagy plays a protective role during zVAD-induced necrotic cell death. *Autophagy* 4:457–466
19. Kong W, Alvarez-Castelao B, Lin ZJ, Castano JG, Caro J (2007) Constitutive/Hypoxic Degradation of HIF- α Proteins by the Proteasome Is Independent of von Hippel Lindau Protein Ubiquitylation and the Transactivation Activity of the Protein. *J Biol Chem* 282:15498–15505
20. Stamatakis K, Sanchez-Gomez FJ, Perez-Sala D (2006) Identification of novel protein targets for modification by 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin-J₂ in mesangial cells reveals multiple interactions with the cytoskeleton. *J Am Soc Nephrol* 17:89–98
21. Schotte P, Schauliege R, Janssens S, Beyaert R (2001) The cathepsin B inhibitor z-FA.fmk inhibits cytokine production in macrophages stimulated by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 276:21153–21157
22. Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H, Bronk SF, Svingen PA, Peters C, Kaufmann SH, Gores G (2000) Cathepsin B contributes to TNF α -mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* 106:1127–1137
23. Riccio M, Di Giaimo R, Pianetti S, Palmieri PP, Melli M, Santi S (2001) Nuclear localization of cystatin B, the cathepsin inhibitor implicated in myoclonus epilepsy (EPM1). *Exp Cell Res* 262:84–94
24. Lee DH, Goldberg AL (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 8:397–403
25. Fuertes G, Martín de Llano JJ, Villarroya A, Rivett A, Knecht E (2003) Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions. *Biochem J* 375:75–80
26. Kisselev AF, Callard A, Goldberg AL (2006) Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem* 281:8582–8590
27. Li Z, Melandri F, Berdo I, Jansen M, Hunter L, Wright S, Valbrun D, Figueiredo-Pereira M (2004) Δ 12-prostaglandin J₂ elicits ubiquitin-protein aggregation without proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 319:1171–1180
28. Branca D (2004) Calpain-related diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 322:1098–1104
29. Shibata T, Yamada T, Kondo M, Tanahashi N, Tanaka K, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J, Uchida K (2003) An endogenous electrophile that modulates the regulatory mechanism of protein turnover: inhibitory effects of 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin-J₂ on proteasome. *Biochemistry* 42(47):13960–13968
30. Levonen AL, Landar A, Ramachandran A, Ceaser EK, Dickinson DA, Zanoni G, Morrow JD, Darley-Usmar VM (2004) Cellular mechanisms of redox cell signaling: the role of cysteine modification in controlling antioxidant defenses in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J* 378:373–382
31. Sanchez-Gomez FJ, Cernuda-Morollon E, Stamatakis K, Perez-Sala D (2004) Protein thiol modification by 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J₂ addition in mesangial cells: role in the inhibition of pro-inflammatory genes. *Mol Pharmacol* 66(5): 1349–1358
32. Lorente M, Mirapeix RM, Miguel M, Longmei W, Volk D, Cervós-Navarro J (2002) Chronic hypoxia induced ultrastructural changes in the rat adrenal zona glomerulosa. *Histol Histopathol* 17(1):185–190
33. Welt K, Fitzl G, Schepper A (2001) Experimental hypoxia of STZ-diabetic rat myocardium and protective effects of Ginkgo biloba extract. II. Ultrastructure investigation of microvascular endothelium. *Exp Toxicol Pathol* 52(6):503–512
34. Massey A, Kiffin R, Cuervo AM (2004) Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2420–2434
35. Agarraberes F, Dice J (2001) A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci* 114:2491–2499
36. Kiffin R, Christian C, Knecht E, Cuervo AM (2004) Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Biol Cell* 15:4829–4840
37. Katschinsk D, Le L, Schindler S, Thomas T, Voss A, Wenger R (2004) Interaction of the PAS B Domain with HSP90 Accelerates Hypoxia-Inducible Factor-1 α Stabilization. *Cell Physiol Biochem* 14:4–6
38. Zheng X, Ruas JL, Cao R, Salomons FA, Cao Y, Poellinger L, Pereira T (2006) Cell-type-specific regulation of degradation of hypoxia-inducible factor 1 alpha: role of subcellular compartmentalization. *Mol Cell Biol* 26:4628–4641
39. Khan Z, Michalopoulos GK, Stolz DB (2006) Peroxisomal localization of hypoxia-inducible factors and hypoxia inducible factor regulatory hydroxylases in primary rat hepatocytes exposed to hypoxia-reoxygenation. *Am J Pathol* 169(4):1251–1269
40. Liu Q, Berchner-Pfannschmidt U, Moller U, Brecht M, Wotzlaw C, Acker H, Jungermann K, Kietzmann T (2004) Fenton reaction at the endoplasmic reticulum is involved in the redox control of hypoxia-inducible gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4302–4307
41. Kidane TZ, Sauble E, Linder MC (2006) Release of iron from ferritin requires lysosomal activity. *Am J Physiol* 291:C445–C455
42. Cernuda-Morollon E, Pineda-Molina E, Canada FJ, Perez-Sala D (2001) 15-Deoxy-Delta 12, 14-prostaglandin J₂ inhibition of NF-kappaB-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J Biol Chem* 276(38):35530–35536
43. Strauss DS, Glass CK (2001) Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev* 21(3):185–210
44. Liu JD, Tsai SH, Lin SY, Ho YS, Hung LF, Pan S, Ho FM, Lin CM, Liang YC (2004) Thiol antioxidant and thiol-reducing agents attenuate 15-deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J₂-induced heme oxygenase-1 expression. *Life Sci* 74:2451–2463
45. Benesic A, Schwerdt G, Freudinger R, Mildnerberger S, Groezinger F, Wollny B, Kirchhoff A, Gekle M (2006) Chloroacetaldehyde as a sulfhydryl reagent: the role of critical thiol groups in ifosfamide nephropathy. *Kidney Blood Press Res* 29:280–293

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacological Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yphrs

15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin-J₂ up-regulates cyclooxygenase-2 but inhibits prostaglandin-E₂ production through a thiol antioxidant-sensitive mechanism

Patricia Reyes-Martin^a, Sara Ramirez-Rubio^b, Trinidad Parra-Cid^b,
Raquel Bienes-Martínez^a, Javier Lucio-Cazana^{a,*}

^a Department of Physiology, University of Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid 28871, Spain

^b Unit of Investigation, Hospital of Guadalajara, Guadalajara, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Accepted 17 March 2008

Keywords:
Prostaglandin
Cyclooxygenase
Interleukin-1 β
Mesangial cells
Thiol groups

ABSTRACT

15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin-J₂ (15d-PGJ₂) has potent anti-inflammatory effects including the inhibition of interleukin-1 β (IL-1 β)-induced expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostaglandin E₂ (PGE₂) production in several cell types. 15d-PGJ₂ contains an α,β -unsaturated electrophilic ketone and several evidences suggest that thiol reducing agents prevent or revert the cellular effects of 15d-PGJ₂. The present study was devoted to analyze the effect of 15d-PGJ₂ on COX-2 expression in cultured human mesangial cells (HMC). 15d-PGJ₂ induced an increase in the reduced glutathione (GSH) content and up-regulated COX-2 protein expression, but not COX-1, in a manner which was unaffected by selective peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) blockade nor mimicked by ciglitazone, a PPAR γ agonist. *N*-acetylcysteine (NAC), a thiol reducing agent, but not reactive oxygen species scavengers, prevented 15d-PGJ₂-induced COX-2 up-regulation. Depletion of GSH by buthionine sulfoximine, which diminishes thiol antioxidant activity, cooperated with 15d-PGJ₂ to accumulate COX-2. Therefore, 15d-PGJ₂ up-regulated COX-2 through a thiol antioxidant-sensitive mechanism. Interestingly, NAC did not inhibit the COX-2 expression induced by the electrophilic α,β -unsaturated compound PGA₂. Up-regulation of COX-2 by 15d-PGJ₂ did not result in increased PGE₂ production. Furthermore, preincubation with 15d-PGJ₂ inhibited IL-1 β -induced PGE₂ production although IL-1 β -induced COX-2 expression remained unaffected by the treatment with 15d-PGJ₂. On the contrary, PGA₂ elicited an increase in PGE₂ production and it acted synergistically with IL-1 β to enhance PGE₂ production. These results indicate for the first time that 15d-PGJ₂ inhibits PGE₂ production independently of its effect on COX-2 expression.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Glomerular cells and especially mesangial cells play an active part in the inflammatory response to glomerular injury. On activation, mesangial cells are able to proliferate, produce extracellular

Abbreviations: BSO, buthionine sulfoximine; COX, cyclooxygenase; COX-1, cyclooxygenase-1; COX-2, cyclooxygenase-2; DCFH-DA, 2',7'-dichloro-fluorescein diacetate; DMSO, dimethyl sulfoxide; ERK1/2, extracellular-regulated 1/2 kinase; FBS, fetal bovine serum; GSH, reduced glutathione; H₂O₂, hydrogen peroxide; HMC, human mesangial cells; IL-1 β , interleukin-1 β ; JNK, c-Jun N-terminal kinase; NAC, *N*-acetylcysteine; p-38, p38 MAP kinase; PBS, phosphate-buffered saline; PG, prostaglandin; PGE₂, prostaglandin E₂; PGF_{2 α} , prostaglandin F_{2 α} ; 15d-PGJ₂, 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J₂; PPAR γ , peroxisome-proliferator activated receptor γ ; ROS, reactive oxygen species.

* Corresponding author. Tel.: +34 918854515; fax: +34 918854590.

E-mail address: javier.lucio@uah.es (J. Lucio-Cazana).

1043-6618/\$ – see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.phrs.2008.03.007

matrix proteins and release numerous cytokines, growth factors and prostaglandins (PGs) [1].

Cyclooxygenase (COX) is a key enzyme in PG synthesis. COX catalyzes the conversion of arachidonic acid to PGG₂ by its cyclooxygenase activity and, of PGG₂ to PGH₂, by its peroxidase activity. Two COX isoforms called COX-1 and COX-2 are currently known. The COX-1 isoenzyme is constitutively expressed in many tissues and is assumed to be responsible for the physiological functions of PGs such as maintenance of the integrity of gastric mucosa. In contrast COX-2 is an immediate early response gene that is undetectable in most mammalian tissues, but not all. For instance, COX-2 is constitutively expressed in several kidney segments [2] and in cultured renal cells such as human mesangial cells and Madin-Darby canine kidney cells [3,4]. COX-2 is rapidly induced by several stimuli, being inflammatory mediators among them [5]. Particularly relevant for our work, up-regulation of COX-2 by the inflammatory cytokine interleukin-

1 β (IL-1 β) has also been evidenced in cultured mesangial cells [6].

In the kidney, an uncontrolled inflammatory response to an acute insult may lead to chronic inflammation, permanent tissue damage and progressive renal insufficiency. The cyclopentenone 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) has been shown to display protective effects against injury or inflammation [7]. 15d-PGJ₂ is the dehydration end product of prostaglandin D₂ (PGD₂). No specific receptor for 15d-PGJ₂ has been identified to date [8]. Instead, 15d-PGJ₂ is a ligand for the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) [9]. However, it has been realized that 15d-PGJ₂ may also modulate multiple cellular functions by mechanisms independent of receptors. Part of the biological effects of 15d-PGJ₂ are likely to be caused by its ability to lower intracellular reduced glutathione (GSH) levels and/or by its binding to free thiol groups of critical cellular proteins [10–14] and, interestingly, several evidences suggest that thiol reducing agents prevent or revert the cellular effects of 15d-PGJ₂ [11,15–18].

COX-2 is one of the targets for the anti-inflammatory effects of 15d-PGJ₂. Both COX-2 expression and PGE₂ production induced by IL-1 β , bacterial lipopolysaccharide or phorbol 12-myristate 13-acetate plus calcium ionophore have been previously shown to be inhibited by 15d-PGJ₂ in cultured cells, including rat fetal hepatocytes [19], human osteoarthritic chondrocytes [20], human colon carcinoma cell [16], human synovial fibroblasts [21] and rat mesangial cells [6,13]. However, even though 15d-PGJ₂ is likely to play a role in the prevention and/or resolution of glomerular inflammation, there are no data on the effect of 15d-PGJ₂ in the expression and activity of COX-2 in cultured human mesangial cells. Therefore the present study was devoted to analyze the effect of 15d-PGJ₂ in the expression and activity of COX-2 in cultured human mesangial cells either in basal conditions or after being up-regulated in response to the inflammatory cytokine IL-1 β .

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The prostaglandins 15-deoxy-delta12,14-15d-PGJ₂ (indicated as 15d-PGJ₂ along the manuscript), PGE₂, PGA₂, 9,10-dihydro-15d-PGJ₂, PGF_{2 α} , iloprost, ciglitazone and PPAR γ antagonist, GW9662, were purchased from Cayman Chemical (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI). Cycloheximide, catalase, *N*-acetylcysteine (NAC), buthionine sulfoximine (BSO), Tiron and allopurinol were purchased from Sigma–Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA). 2',7'-dichloro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) was supplied by Molecular Probes (Oregon, USA).

2.2. Cell culture

Human mesangial cells (HMC) were obtained from adult specimens, as we previously described [22]. The identity of the cells was confirmed by morphologic and functional criteria. Under phase-contrast microscopy, all cells appeared large and stellate and no cells with epithelial or endothelial morphologic characteristics were seen. HMC showed histochemical evidence of containing actomyosin fibres, and they did not stain for factor VIII, unlike endothelial cells. In addition, all cells examined contracted after incubation with platelet-activating factor, angiotensin II and arginin-vasopresin. The culture medium was Roswell Park Memorial Institute 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 20 mM L-glutamine and antibiotics (penicillin 100 U ml⁻¹ and streptomycin 100 μ g ml⁻¹). Confluent cells between 6th and 15th passages were used and they were made quiescent when

appropriate by 24 h incubation with medium supplement with 0.5% FBS.

2.3. Determination of ROS production

DCFH-DA is a nonpolar substance and freely diffuses through the cell membrane; within the cell it is hydrolysed to fluorescein (DCFH), a polar compound that is trapped within the cell. DCFH is a substrate that is easily oxidized to DCF by hydrogen peroxide (and others substances generated by oxidative metabolic burst) emitting fluorescence at 560 nm. DCFH-DA (5 μ M) was incubated with mesangial cells for 45 min at 37 °C and washed before the addition of experimental treatments. Afterwards cells were detached by trypsinization, washed and cellular fluorescence intensity was quantified by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson). Each assay was repeated three times and all experiments were performed in quadruplicate wells.

2.4. Western blot analysis

Cells were homogenized in Tris–HCl buffer (pH 7.4) containing 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% deoxycholic acid, 0.1% SDS, 1% Triton X-100 and protease inhibitors 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 10 μ g/ml aprotinin, 2 μ g/ml leupeptin and the phosphatase inhibitor 0.2 mM NaVO₄. Cell proteins (30–40 μ g) were run in a 8–10% SDS-polyacrilamide gel, transferred onto a nitrocellulose membrane (Trans-Blot Transfer Medium, BioRad, CA, USA) and incubated overnight at 4 °C with antibodies recognizing specifically COX-1 or COX-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) as described previously [10]. This incubation was followed by a second incubation with a peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and immunoreactive products were detected by chemiluminescence using the ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) following the protocol provided by the manufacturer. As a loading control, blots probed were subsequently re-probed with anti- α -actin (Sigma–Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA).

2.5. Determination of PGE₂ formation

PGE₂ in the medium was determined in triplicate using an EIA kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI) following the manufacturer's protocol. The culture medium of HMC cells grown in six well-plates and treated as described in the legend of Fig. 3 was collected and diluted two times with PGEM Assay Buffer. The assay was performed in a total volume of 150 μ l, with the following components being added in 50- μ l volumes: standards or biological samples, enzymatic tracer and specific antiserum. After overnight incubation at 4 °C, the plates were washed, and 200 μ l Ellman's reagent was added into each well. After 1–2 h, the absorbance at 405 nm of each well was measured. Standard curve from 50 to 0.39 pg ml⁻¹ was used to evaluate the concentrations of PGE₂. Results were calculated by using the nonlinear regression of a four-parameter logistic model.

2.6. Determination of reduced glutathione (GSH) content

Cells for reduced glutathione content measurement were lysed in a cold room. Cellular proteins were precipitated with 0.9 ml perchloric acid. After neutralization with 0.3 ml 1 M KOH/KHCO₃ and centrifugation, 0.15 ml of supernatant were collected on plastic tubes, *o*-phthaldialdehyde was added (0.15 ml of a 7.46 μ M solution) and tubes were incubated at room temperature for 15 min.

Reduced glutathione content was measured in a scanning fluorescence spectrophotometer (PerkinElmer model LS-5B) at 420 nm with excitation wavelength of 350 nm, using a standard curve [23].

2.7. Statistical analysis

All values are represented as means \pm standard deviation (S.D.). All experiments were repeated a minimum of three times. Statistical significance between individual groups was tested using the nonparametric unpaired Mann–Whitney *U* test (GraphPad Prism). A *p* value of <0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. 15d-PGJ₂ up-regulates the expression of COX-2 protein in HMC

Expression of COX-1 and COX-2 in unstimulated and 15d-PGJ₂-stimulated HMC was examined. Serum-deprived cultured HMC constitutively expresses both COX-1 and COX-2 in the absence of stimulation. 15d-PGJ₂ treatment for 24 h dose-dependently induced COX-2 protein expression at micromolar concentrations (Fig. 1A, upper left panel). The maximum effect was observed at

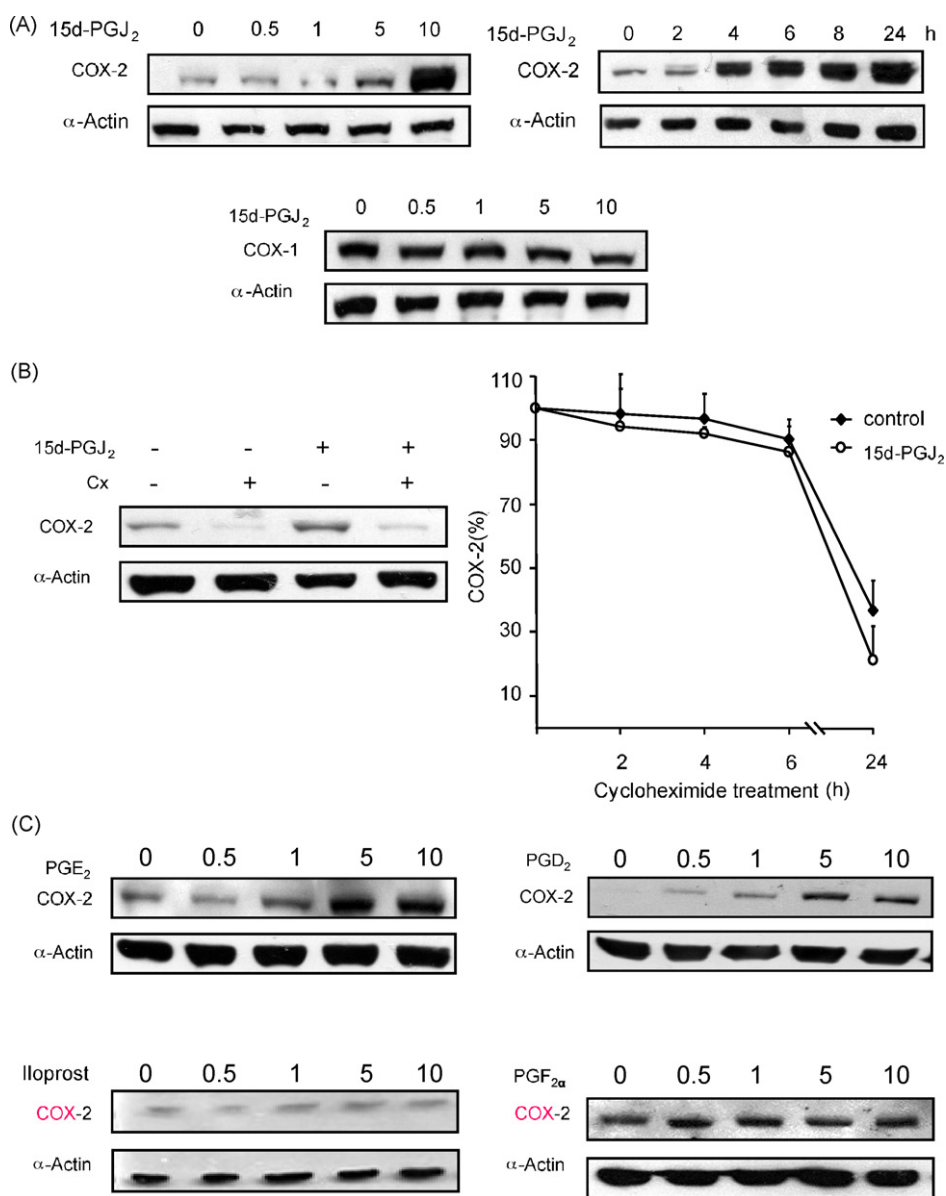


Fig. 1. Modulation of COX-2 expression by 15d-PGJ₂ and other PGs. (A) Expression of COX-2 protein was analyzed by Western blot in HMC incubated for 24 h with the indicated concentrations (μ M) of 15d-PGJ₂ (upper left panel) or incubated with 5 μ M 15d-PGJ₂ for the indicated times (h) (upper right panel). The lower panel shows the absence of effect of 15d-PGJ₂ on COX-1 expression. (B) 15d-PGJ₂-induced increase of COX-2 protein expression is inhibited by cycloheximide and is not due to increased stability of COX-2 protein. Expression of COX-2 protein after 24 h incubation with 15d-PGJ₂ vehicle or with 5 μ M 15d-PGJ₂ was analyzed by Western blot in either HMC preincubated for 1 h in control conditions or with 10 μ M cycloheximide (Cx) (left) or in HMC incubated for 0 to 24 h with 10 μ M cycloheximide (right) to analyze the stability of COX-2 protein. The graphic represents the COX-2 protein levels normalized to α -actin. Results from the densitometric analysis of three different experiments were expressed as arbitrary values and plotted relative to the zero time point. The protein stability was similar between control and 15d-PGJ₂-treated cells. (C) Effect of PGE₂, PGD₂, PGF_{2 α} and iloprost (an stable analogue of PGJ₂) on COX-2 expression. Expression of COX-2 protein was analyzed by Western blot in HMC incubated for 24 h with the indicated concentrations of each compound (μ M). (A–C) Equal protein loading in Western blot analysis was confirmed by probing with an anti- α -actin antibody. Each photograph represents at least three repeated experiments.

10 μM concentration. Equal protein loading was confirmed by probing with an anti- α -actin antibody. 15d-PGJ₂ did not modify the mesangial levels of COX-1 (Fig. 1A, lower panel).

The effects of 15d-PGJ₂ on the levels of COX-2 protein were examined further using different incubation times. HMC were treated with 15d-PGJ₂ (5 μM) for up to 24 h and Western blot analysis was performed. As shown in Fig. 1A (right panel), 15d-PGJ₂ induced an increase in COX-2 protein after 4 h incubation and this effect lasted at least 24 h.

To clarify whether the enhancement by 15d-PGJ₂ of COX-2 expression was due to *de novo* synthesis or not, we examined the effect of cycloheximide, an inhibitor of protein synthesis. As shown in Fig. 1B (left), preincubation of HMC with 10 μM cycloheximide resulted in an inhibition of 15d-PGJ₂-induced increase of

COX-2 protein expression as compared to cells preincubated with vehicle. We also studied whether 15d-PGJ₂ increases the stability of COX-2 protein. HMC were incubated for 24 h with either 15d-PGJ₂ vehicle or 5 μM 15d-PGJ₂. Afterwards, cells were incubated for 0–24 h with 10 μM cycloheximide and Western blot of COX-2 protein was evaluated quantitatively by densitometric analysis. Results (Fig. 1B, right) showed no difference in the rate of COX-2 degradation regardless whether cells were incubated or not with 15d-PGJ₂.

Finally, we assessed the effect of PGE₂, PGD₂, iloprost (a stable analogue of PGI₂) and PGF_{2 α} on COX-2 expression in HMC and we found that PGE₂ and PGD₂ also up-regulated it whereas iloprost and PGF_{2 α} had no effect (Fig. 1C). None of these compounds modified COX-1 expression (results are not shown).

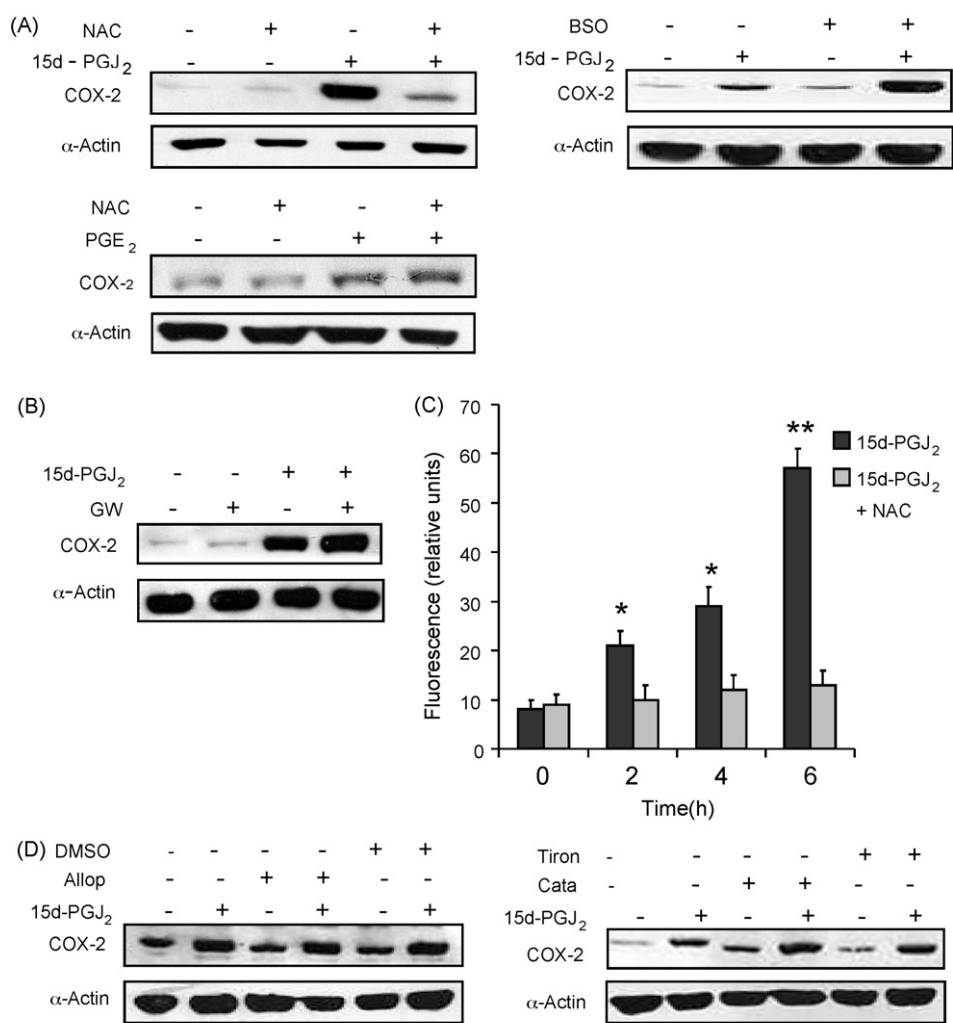


Fig. 2. Investigation on mechanisms potentially involved in the induction of COX-2 by 15d-PGJ₂. (A) Induction of COX-2 by 15d-PGJ₂ is blocked by N-acetylcysteine, a thiol antioxidant and thiol reducing agent, and it is increased by buthionine sulfoximine, an inhibitor of glutathione synthesis. Expression of COX-2 protein after 24 h incubation with 15d-PGJ₂ vehicle or with 5 μM 15d-PGJ₂ was analyzed by Western blot in HMC preincubated for 1 h with or without 10 μM N-acetylcysteine (NAC) (left upper panel) or with or without 500 μM buthionine sulfoximine (BSO) (right panel). Finally, expression of COX-2 protein after 24 h incubation with PGE₂ vehicle or with or without 5 μM PGE₂ was in HMC preincubated for 1 h with 10 μM N-acetylcysteine (NAC) (left lower panel). (B) Induction of COX-2 by 15d-PGJ₂ is not inhibited by the PPAR γ antagonist GW9662. Expression of COX-2 protein after 24 h incubation with 15d-PGJ₂ vehicle or with 5 μM 15d-PGJ₂ was analyzed by Western blot in HMC preincubated for 1 h with or without 10 μM GW9662 (GW). (C) Intracellular oxidation. Cells were preincubated with the fluorescent probe DCFH-DA (10 μM) for 30 min and then treated for 1–6 h with 15d-PGJ₂ with or without 1 h pre-incubation with 10 μM N-acetylcysteine (NAC). The fluorescence intensity of at least 10,000 cells was analysed using a flow cytometer. Values of fluorescence (relative units) are mean \pm S.D. of three different experiments in triplicate, **P* < 0.01 versus NAC-treated cells and control ***P* < 0.01 versus all other values. (D) Effect of scavengers of reactive oxygen species on 15d-PGJ₂-induced COX-2 expression. Cells were preincubated for 2 h with one of these antioxidants allopurinol (Allop, 500 (M); dimethyl sulfoxide (DMSO, 0.5%); catalase (Cata, 500 units ml⁻¹) and then treated with 15d-PGJ₂ (5 μM) for 24 h. Thereafter cells were lysed and COX-2 determined by Western blot analysis. The results shown were similar to these found with higher concentrations of these scavengers (data not shown). (A to B and D) Equal protein loading in Western blot analysis was confirmed by probing with an anti- α -actin antibody. Each photograph represents at least three repeated experiments.

3.2. Investigation on mechanisms potentially involved in the induction of COX-2 by 15d-PGJ₂

3.2.1. Induction of COX-2 by 15d-PGJ₂ is blocked by thiol antioxidant and thiol reducing agent N-acetylcysteine (NAC) and it is increased by buthionine sulfoximine (BSO), an inhibitor of GSH synthesis

To explore the role of the modulation of intracellular GSH levels in the induction on COX-2 protein by 15d-PGJ₂ we first analyzed the effect of NAC, a thiol antioxidant, which was added 2 h before 15d-PGJ₂. NAC is a unique compound which acts by its own reducing power and by stimulating the synthesis of GSH [24]. Fig. 2A, left upper panel, illustrates that 10 μM NAC almost completely inhibited 15d-PGJ₂-dependent COX-2 accumulation. This effect of NAC seemed to be specific for 15d-PGJ₂ since up-regulation of COX-2 by PGE₂, IL-1β or PGA₂ (which, like 15d-PGJ₂, contains an α,β-unsaturated keto group) was unaffected by preincubation with NAC (Fig. 2A, left lower panel, and insets in Fig. 3A and 3B). These results prompted us to obtain additional evidence for the role of thiol groups in this pathway. For this purpose we pre-treated HMC with buthionine sulfoximine (BSO), an inhibitor of GSH biosynthesis, in order to diminish thiol antioxidant activity. In Fig. 2A, right, we observe that BSO acts synergistically with 15d-PGJ₂ to accumulate COX-2. Taken together, these results suggest that free thiols are a major target in the mechanism through which 15d-PGJ₂ increases the mesangial expression of COX-2.

To address the point whether the induction of COX-2 is simply by GSH depletion, cells were incubated for 24 h either with 15d-PGJ₂ vehicle or with 5 μM 15d-PGJ₂ and GSH content was measured thereafter. Our data indicated that treatment with 15d-PGJ₂ induced an increase in cell GSH content (73.5 ± 3.9 ng mg⁻¹ protein versus 23.5 ± 2.9 ng mg⁻¹ protein control cells), which suggests that free thiols in proteins, rather than in GSH, are the target through which 15d-PGJ₂ increases the mesangial expression of COX-2. In fact BSO alone, which caused an important decrease in cell GSH (results are not shown) did not modify the expression of COX-2 (Fig. 2A).

3.2.2. 15d-PGJ₂ acts independently of PPARγ to induce COX-2 expression in HMC

We first assessed the role of PPARγ in 15d-PGJ₂-induced COX-2 accumulation in cells preincubated with the PPARγ antagonist, GW9662, and then treated with 15d-PGJ₂. 15d-PGJ₂-induced COX-2 accumulation was unaffected by GW9662 (Fig. 2B). These results and the fact that the PPARγ agonist, ciglitazone, was a very weak inducer of COX-2 (results are not shown) suggest that PPARγ is not involved in the response to 15d-PGJ₂.

3.2.3. 15d-PGJ₂ acts independently of intracellular reactive oxygen species (ROS) to induce COX-2 expression in HMC

Since 15d-PGJ₂ has a stimulatory effect on ROS production [10], we studied the importance of ROS in 15d-PGJ₂-dependent COX-2 expression. We first analyzed whether 15d-PGJ₂ was able to alter intracellular ROS levels in HMC. ROS were detected using DCFH-DA, an established sensor of oxidative stress. Fig. 2C shows that 15d-PGJ₂ induced a significant ROS production which was inhibited by preincubation with NAC. To evaluate the possibility that the increase of COX-2 by 15d-PGJ₂ were due to enhanced ROS production, we tested the effect of ROS scavengers allopurinol, catalase, Tiron and dimethyl sulfoxide (DMSO) on 15d-PGJ₂-induced COX-2 expression. Pre-treatment with these compounds did not suppress COX-2 expression induced by 15d-PGJ₂ (Fig. 2D). This set of data suggests that intracellular ROS are not directly involved in the accumulation of COX-2 protein by 15d-PGJ₂.

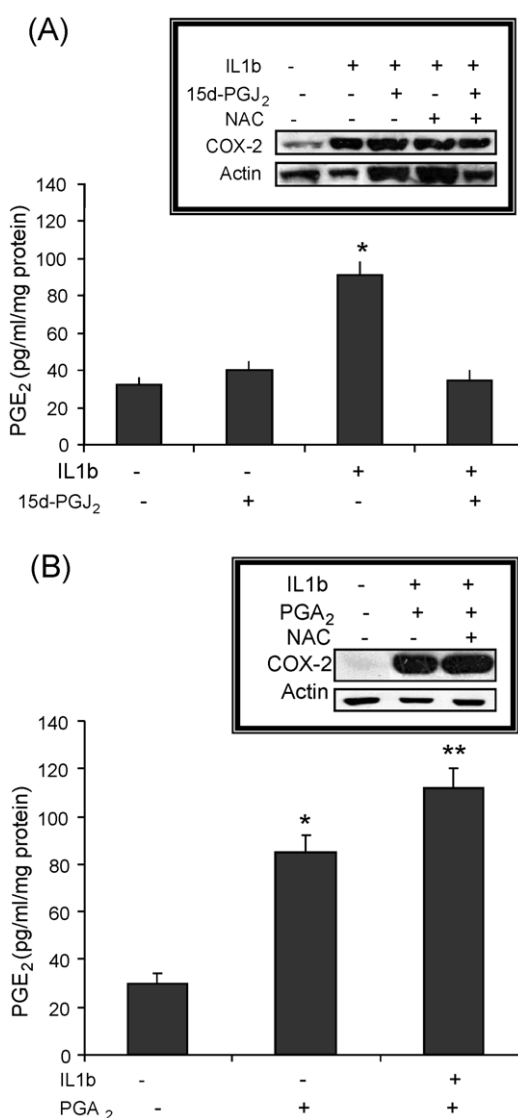


Fig. 3. Effect of 15d-PGJ₂ and PGA₂ on PGE₂ production in HMC incubated or not with interleukin-1β. (A) Effect of 15d-PGJ₂. HMC were incubated for 24 h with 5 μM 15d-PGJ₂, being IL-1β (10 ng ml⁻¹) added after the first hour of incubation. After the 24 h incubation, PGE₂ in the medium was determined in triplicate in four separate experiments *P < 0.01 versus all other values. For comparison, the effects of these treatments on the expression of COX-2 (inset) were analyzed in parallel (inset). The effect of 10 μM N-acetylcysteine (NAC) was assessed by preincubation for 1 h before starting other treatments. (B) Effect of PGA₂. HMC were incubated for 24 h with 5 μM 15d-PGA₂, being IL-1β (10 ng ml⁻¹) added after the first hour of incubation. After the 24 h incubation, PGE₂ in the medium was determined in triplicate in four separate experiments *P < 0.01 versus control; **P < 0.01 versus all other values. For comparison, the effects of these treatments on the expression of COX-2 (inset) were analyzed in parallel (inset). The effect of 10 μM N-acetylcysteine (NAC) was assessed by preincubation for 1 h before starting other treatments.

Taken together, these results suggest that free thiols in GSH or in proteins are a major target in the mechanism through which 15d-PGJ₂ increases the expression of COX-2 in HMC.

3.3. Effect of 15d-PGJ₂ and PGA₂ on PGE₂ production

The effect of 15d-PGJ₂ on PGE₂ production, which is one of the major products of COX-2, was examined in HMC in either basal conditions or in cells stimulated with IL-1β. Although from the increase in COX-2 expression in HMC incubated with 15d-PGJ₂, it could be expected a parallel increase in PGE₂ production, there was

no change after at 24 h incubation, as compared to control HMC (Fig. 3A). Furthermore, increased PGE₂ production in cells incubated with IL-1 β (10 ng ml⁻¹) was fully inhibited by preincubation for 1 h with 5 μ M 15d-PGJ₂ (Fig. 3A) even though 15d-PGJ₂ did not inhibit IL-1 β -induced increase in COX-2 expression (Fig. 3A, inset).

We next explored the possibility that the electrophilic activity in the cyclopentenone ring of 15d-PGJ₂ might be involved in the inhibition of PGE₂ production. HMC were incubated with for 1 h with the electrophilic PGA₂ (5 μ M) and then incubated for 24 h with or without IL-1 β (10 ng ml⁻¹). PGA₂ elicited an increase in PGE₂ production and it acted synergistically with IL-1 β to enhance PGE₂ production in HMC (Fig. 3B). Preincubation with NAC did not have any effect on the synergism between IL-1 β and PGA₂ (Fig. 3B, inset). Given that there may be differences in the electrophilic activities of PGA₂ and 15d-PGJ₂ that could explain their different effects on PGE₂ production, further studies will be needed to clarify whether the electrophilic activity of 15d-PGJ₂ is responsible for its inhibitory effect on PGE₂ production.

In summary, 15d-PGJ₂ increases COX-2 expression (but not PGE₂ production) through a thiol antioxidant-sensitive mechanism. However 15d-PGJ₂ inhibits IL-1 β -induced PGE₂ production. Here, the role, if any, of its electrophilic activity remains to be elucidated.

4. Discussion

The COX metabolite 15d-PGJ₂ is a natural PPAR γ ligand and is considered a potent negative regulator of inflammatory and immune responses. However, the pharmacological effect of 15d-PGJ₂ by itself on the expression of COX-2 remains controversial and scarcely studied. One study demonstrated that 15d-PGJ₂ inhibited COX-2 expression in rat fetal hepatocytes [19] whereas other studies have shown that 15d-PGJ₂ either enhanced COX-2 expression (in human osteoarthritic chondrocytes) [20] or had no effect in rat mesangial cells [6]. Since 15d-PGJ₂ has been envisaged as a promise in the treatment of renal glomerular disease, we studied first its effect in cultured glomerular HMC. Our results (Fig. 1A) indicated that 15d-PGJ₂ up-regulated the expression of COX-2 in a manner dose- and time-dependent. Since 15d-PGJ₂ did not increase the stability of COX-2 protein (Fig. 1B). COX-2 up-regulation is likely due to the effect of 15d-PGJ₂ increasing COX-2 mRNA synthesis and/or COX-2 mRNA stability.

Regarding the signalling, 15d-PGJ₂ acted independently of PPAR γ receptors and ROS production since: (1) 15d-PGJ₂-induced COX-2 accumulation was unaffected by GW9662, a selective PPAR γ antagonist; (2) the PPAR γ agonist ciglitazone only increased COX-2 expression slightly; (3) Although ROS production was induced by 15d-PGJ₂, pre-treatment with ROS scavengers Tiron, catalase, dimethyl sulfoxide or allopurinol did not affect COX-2 accumulation in 15d-PGJ₂-treated HMC.

Therefore, a ROS-dependent COX-2 accumulation or a PPAR γ -dependent mechanism are both unlikely involved in the mechanism through which 15d-PGJ₂ induces COX-2 accumulation in HMC.

On the other hand thiols may play an important role in this new mechanism for COX-2 accumulation: thiol antioxidants/thiol reducing compound NAC dramatically diminished 15d-PGJ₂-induced COX-2 expression whereas preincubation with the inhibitor of GSH synthesis, BSO acted synergistically with 15d-PGJ₂ to accumulate COX-2.

Interestingly, up-regulation of COX-2 by 15d-PGJ₂ did not result in increased PGE₂ production. Furthermore, preincubation with 15d-PGJ₂ inhibited IL-1 β -induced PGE₂ production although IL-1 β -induced COX-2 expression remained unaffected by the treatment with 15d-PGJ₂ (Fig. 3A). These results indicate that 15d-PGJ₂

inhibits PGE₂ production independently of its effect on COX-2 expression. On the opposite, the COX-2 up-regulated by PGA₂ was fully active and PGA₂ synergized with IL-1 β to increase PGE₂ production in HMC (Fig. 3B) This is the first time, to our knowledge, that it has been clearly shown that 15d-PGJ₂ inhibits directly the production of PGE₂ induced by inflammatory stimuli: although this effect had been previously reported [6,13,19–21,25], it was always parallel to a decrease in COX-2 expression making difficult to identify any direct effect of 15d-PGJ₂ on PGE₂ production. In cultured rat mesangial cells, 15d-PGJ₂ inhibits the expression of proinflammatory genes [6,13,26]. Therefore, it has been envisaged as a promise in the treatment of renal disease. Our results provide further support to this view.

We have not performed specific experiments to elucidate the role in the inhibition of PGE₂ production of an inhibitory effect of 15d-PGJ₂ on the activity of COX-2 and/or COX-1 as well as on the expression and activity of PGE₂ synthase. The fact that the inhibitory effect of 15d-PGJ₂ never reduces PGE₂ production below the basal values in HMC treated or not with IL-1 β suggest that 15d-PGJ₂ is preferentially acting through the inhibition of COX-2, which is the only COX isoform induced in our experiments by 15d-PGJ₂ alone or in combination with IL-1 β . However, further experiments should be performed to identify the targets responsible of the inhibitory effect of 15d-PGJ₂ on PGE₂ production.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Education and Science, the Community of Madrid-University of Alcalá and the Medical Foundation Mutua Madrileña Automovilista. P. Reyes-Martin is fellow of the University of Alcalá.

References

- [1] Pfeilschifter J. Mesangial cells orchestrate inflammation in the renal glomerulus. *News Physiol Sci* 1994;9:271–6.
- [2] Khan KN, Venturini CM, Bunch RT, Brassard JA, Koki AT, Morris DL, et al. Interspecies differences in renal localization of cyclooxygenase isoforms: implications in nonsteroidal antiinflammatory drug-related nephrotoxicity. *Toxicol Pathol* 1998;26:612–20.
- [3] Alique M, Moreno V, Kitamura M, Xu Q, Lucio-Cazana FJ. Kinase-dependent, retinoic acid receptor-independent up-regulation of cyclooxygenase-2 by all-trans retinoic acid in human mesangial cells. *Br J Pharmacol* 2006;149:215–25.
- [4] Reyes-Martin P, Alique M, Parra T, Perez de Hornedo J, Lucio-Cazana J. Cyclooxygenase-independent inhibition of H₂O₂-induced cell death by s-ketoprofen in renal cells. *Pharmacol Res* 2007;4:295–302.
- [5] Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000;69:145–82.
- [6] Sawano H, Haneda M, Sugimoto T, Inoki K, Koya D, Kikkawa R. 15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin J₂ inhibits IL-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression in mesangial cells. *Kidney Int* 2002;61:1957–67.
- [7] Scher JU, Pillingner MH. 15d-PGJ₂: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clin Immunol* 2005;114:100–9.
- [8] Straus DS, Glass CK. Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev* 2001;3:185–210.
- [9] Kliewer SA, Lenhard JM, Wilson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J₂ metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 1995;83:813–9.
- [10] Alvarez-Maqueda M, El Bekay R, Alba G, Monteseirin J, Chacon P, Vega A, et al. 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J₂ induces heme oxygenase-1 gene expression in a reactive oxygen species-dependent manner in human lymphocytes. *J Biol Chem* 2004;279:21929–37.
- [11] Cernuda-Morollon E, Pineda-Molina E, Canada FJ, Perez-Sala D. 15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin J₂ inhibition of NF-kB-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J Biol Chem* 2001;276:35530–6.
- [12] Levenon AL, Landar A, Ramachandran A, Ceaser EK, Dickinson DA, Zanoni G, et al. Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J* 2004;378:373–82.
- [13] Sanchez-Gomez FJ, Cernuda-Morollon E, Stamatakis K, Pérez-Sala D. Protein thiol modification by 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J₂ addition in mesangial cells: role in the inhibition of pro-inflammatory genes. *Mol Pharmacol* 2004;66:1349–58.

- [14] Liu JD, Tsai SH, Lin SY, Ho YS, Hung LF, Pan S, et al. Thiol antioxidant and thiol-reducing agents attenuate 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J₂-induced heme oxygenase-1 expression. *Life Sci* 2004;74:2451–63.
- [15] Wung BS, Wu CC, Hsu MC, Hsieh CW. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ suppresses IL-6-induced STAT3 phosphorylation via electrophilic reactivity in endothelial cells. *Life Sci* 2006;78:3035–42.
- [16] Grau R, Iñiguez MA, Fresno M. Inhibition of activator protein 1 activation, vascular endothelial growth factor and cyclooxygenase-2 expression by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ in colon carcinoma cells: evidence for a redox-sensitive peroxisome proliferator-activated receptor γ -independent mechanism. *Cancer Res* 2004;64:5162–71.
- [17] Oliva JL, Perez-Sala D, Castrillo A, Martínez N, Cañada FJ, Bosca L, et al. The cyclopentenone 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J₂ binds to and activates H-Ras. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4772–7.
- [18] Olmos G, Conde I, Arenas I, Del Peso L, Castellano C, Landazuri MO, et al. Accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α through a novel electrophilic, thiol antioxidant-sensitive mechanism. *Cell Signal* 2007;19:2098–105.
- [19] Callejas NA, Castrillo A, Bosca L, Martin-Sanz P. Inhibition of prostaglandin synthesis up-regulates cyclooxygenase-2 induced by lipopolysaccharide and peroxisome proliferators. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288:1235–41.
- [20] Fahmi H, Pelletier JP, Mineau F, Martel-Pelletier J. 15d-PGJ₂ is acting as a “dual agent” on the regulation of COX-2 expression in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoart Cartil* 2002;10:845–8.
- [21] Farrajota K, Cheng S, Martel-Pelletier J, Affif H, Pelletier JP, Li X, et al. Inhibition of interleukin-1beta-induced cyclooxygenase 2 expression in human synovial fibroblasts by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J₂ through a histone deacetylase-independent mechanism. *Arthritis Rheum* 2005;52:94–104.
- [22] Moreno V, Sepulveda JC, Jimenez J, Rodriguez M, Rodriguez D, Kitamura M, et al. Human renal mesangial cells are a target for the anti-inflammatory action of 9-cis retinoic acid. *Br J Pharmacol* 2000;131:1673–83.
- [23] Hissin PJ, Hilf R. A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976;74:214–26.
- [24] Cotgreave IA. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol* 1997;38:205–27.
- [25] Inoue H, Tanabe T, Umesono K. Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma. *J Biol Chem* 2000;275:28028–32.
- [26] Rovin BH, Lu L, Cosio A. Cyclopentenone prostaglandins inhibit cytokine-induced NF-kappaB activation and chemokine production by human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1659–67.