

La inactivación del supresor tumoral VHL lleva al desarrollo de carcinomas renales de célula clara (CRCC) a través de los factores inducibles en hipoxia (HIFs). Aunque estos CRCC muestran una respuesta HIF dependiente constitutiva, el potencial de esta en hipoxia no está claro. Hemos visto que las líneas de CRCC RCC4 y RCC10, las cuales expresan formas mutantes de la proteína pVHL, tienen reducida la expresión de HIF1 α en hipoxia, mientras que la expresión de HIF2 α está incrementada o inalterada. Se pudieron ver efectos similares en normoxia después de inducir la inhibición de la actividad de las enzimas proil-hidroxilasas por ARNs de interferencia o inhibidores farmacológicos, también por la inhibición por medio de ARNs de interferencia la forma mutada pVHL. Esta disminución en los niveles de proteína de HIF1 α era debida a una degradación dependiente del proteasoma y mediada por la ubiquitin-ligasa SART1. La degradación de HIF1 α , en este contexto, favorece la proliferación de los CRCC, en la línea del papel atribuido a HIF1 α como supresor tumoral. Nuestros datos indican que mutantes de pVHL pueden proteger a HIF1 α de una degradación mediada por SART1 dependiente de proteasoma en condiciones de normoxia pero esta protección se pierde en condiciones de hipoxia, favoreciendo la proliferación de los CRCC. Este mecanismo de degradación de HIF1 α posiblemente esté operativo en aquellos CRCC en los que no tenga lugar la delección de HIF1 α .

TESIS DOCTORAL



Mutaciones en la proteína supresora de tumores pVHL protegen al factor inducible en hipoxia HIF1 α de degradación dependiente de proteasoma mediada por SART1

Ángel Ordóñez Navadijo 2014



Ángel Ordóñez Navadijo

TESIS DOCTORAL

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica

**Mutaciones en la proteína supresora de tumores
pVHL protegen al factor inducible en hipoxia
HIF1 α de degradación dependiente de
proteasoma mediada por SART1.**

Ángel Ordóñez Navadijo

Madrid, 2014

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**Mutaciones en la proteína supresora de tumores
pVHL protegen al factor inducible en hipoxia
HIF1 α de degradación dependiente de
proteasoma mediada por SART1**

Ángel Ordóñez Navadijo
Licenciado en Ciencias Biológicas

Director de Tesis: Dr. Manuel Ortiz de Landázuri

Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario de la
Princesa, Madrid



El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado por Ángel Ordóñez Navadijo, bajo la dirección del Dr. Manuel Ortiz de Landázuri en el Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario de la Princesa

Opta al grado de Doctor

Ángel Ordóñez Navadijo

VºBº del Director de Tesis

Dr. Manuel Ortiz de Landázuri

A mi familia

Agradecimientos

Resumen

La inactivación del supresor tumoral *VHL* lleva al desarrollo de carcinomas renales de célula clara (CRCC) a través de los factores inducibles en hipoxia (HIFs). Aunque estos CRCC muestran una respuesta HIF dependiente constitutiva, el potencial de esta en hipoxia no está claro. Hemos visto que las líneas de CRCC RCC4 y RCC10, las cuales expresan formas mutantes de la proteína pVHL, tienen reducida la expresión de HIF1 α en hipoxia, mientras que la expresión de HIF2 α está incrementada o inalterada. Se pudieron ver efectos similares en normoxia después de inducir la inhibición de la actividad de las enzimas proil-hidroxilasas por ARNs de interferencia o inhibidores farmacológicos, también por la inhibición por medio de ARNs de interferencia la forma mutada pVHL. Esta disminución en los niveles de proteína de HIF1 α era debida a una degradación dependiente del proteasoma y mediada por la ubiquitin-ligasa SART1. La degradación de HIF1 α , en este contexto, favorece la proliferación de los CRCC, en la línea del papel atribuido a HIF1 α como supresor tumoral. Nuestros datos indican que mutantes de pVHL pueden proteger a HIF1 α de una degradación mediada por SART1 dependiente de proteasoma en condiciones de normoxia pero esta protección se pierde en condiciones de hipoxia, favoreciendo la proliferación de los CRCC. Este mecanismo de degradación de HIF1 α posiblemente esté operativo en aquellos CRCC en los que no tenga lugar la delección de *HIF1 α* .

Abstract

Inactivation of the *VHL* tumor suppressor drives the development of clear-cell renal cell carcinoma (ccRCC) through hypoxia inducible factors (HIFs). Although ccRCC cells exhibit constitutive normoxic HIF signaling, the potential role of hypoxia in this setting is not fully understood. We show here that the ccRCC cell lines RCC4 and RCC10, which express mutant versions of *VHL*, have reduced HIF1 α expression in hypoxia, whereas HIF2 α expression is increased or not affected. Similar findings were observed in normoxia after abrogation of prolyl hydroxylase activity by siRNA or pharmacological inhibition, and by siRNA inhibition of mutant *VHL*. This reduction of HIF1 α protein is due to proteasome-dependent degradation and is mediated by the E3 ubiquitin ligase SART1. HIF1 α degradation favors ccRCC proliferation, in line with the previously-recognized tumor suppressor capability of HIF1 α . Our data indicate that mutant *VHL* can protect HIF1 α from SART1-dependent degradation in normoxic conditions, but this protection is lost in hypoxic settings, favoring hypoxia-dependent ccRCC proliferation. This mechanism of HIF1 α degradation might operate in some *VHL*-related clear-cell renal carcinomas in which the deletion of HIF1 α locus does not occur.

Índice

AGRADECIMIENTOS.	III
RESUMEN.	VII
ABSTRACT.	XI
ÍNDICE.	3
ABREVIATURAS.	7
INTRODUCCIÓN.	11
1. CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES.	11
1.1. El síndrome hereditario de von Hippel-Lindau (VHL).	12
1.2. Tumores esporádicos: mutaciones de <i>VHL</i> .	14
1.3. El gen <i>VHL</i> .	15
1.3.1. Descripción del gen <i>VHL</i> .	15
1.3.2. Descripción de la proteína VHL (pVHL).	16
1.3.3. Funciones de pVHL.	17
1.3.4. Mutaciones en pVHL.	21
2. EL OXÍGENO Y LA RESPUESTA A HIPOXIA.	21
2.1. La respuesta a hipoxia.	22
2.2. Los factores inducibles en hipoxia HIF.	22
2.3. Regulación de los factores inducibles en hipoxia.	23
3. EL FACTOR ASOCIADO A LA HIPOXIA SART1.	27
3.1. SART1 como una proteína multifuncional.	27
OBJETIVOS.	31
MATERIALES Y MÉTODOS.	35
1. CULTIVOS CELULARES Y REACTIVO.	35
2. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT.	35
3. ANTICUERPOS.	36
4. INMUNOFUORESCENCIA DE HIF1 α .	36
5. ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL PROTEASOMA.	36
6. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE ARNs DE INTERFERENCIA.	36
7. TRANSDUCCIÓN CELULAR MEDIANTE INFECCIÓN LENTIVIRAL.	37
8. EXTRACCIÓN DE ARN Y PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL.	37
9. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR NUCLEO/CITOPLASMA.	38
10. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR.	39
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	39
RESULTADOS.	43
1. LOS NIVELES PROTEICOS DEL FACTOR HIF1 α DESCIENDEN EN CONDICIONES DE HIPOXIA EN CÉLULAS DE CRCC.	43
1.1. HIF1 α es sensible a diferentes tensiones de oxígeno en CRCC.	43

1.2.	Es necesaria la exposición a periodos largos de hipoxia para observar la disminución de HIF1 α .	45
1.3.	La expresión de HIF1 α se restablece con la reoxigenación.	46
1.4.	La proteína HIF1 α disminuye de una manera independiente de su nivel de expresión de ARN.	47
2.	LA ACTIVIDAD PHD ES ESENCIAL PARA MANTENER LOS NIVELES DE HIF1 α .	48
2.1.	La inhibición farmacológica de las PHDs disminuye los niveles de HIF1 α .	48
2.2.	Contribución de las diferentes PHDs en la expresión de HIF1 α en CRCC.	50
3.	LA BAJADA EN LOS NIVELES DE HIF1 α SE PRODUCE EN EL NÚCLEO.	52
4.	DIFERENTES MUTACIONES EN pVHL CONTRIBUYEN A MANTENER LOS NIVELES DE HIF1 α EN CRCC.	55
5.	HIF1 α DISMINUYE EN CÉLULAS DE CRCC POR ACCIÓN DE LA UBIQUITIN-LIGASA SART1.	56
5.1.	La disminución de HIF1 α es dependiente del proteasoma.	56
5.2.	SART1 media en la degradación del factor HIF1 α .	57
	DISCUSIÓN.	63
	CONCLUSIONES.	73
	BIBLIOGRAFIA.	77
	ANEXO I.	91
	ANEXO II.	123

Abreviaturas

ARNm: ARN mensajero

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

BHD: *Birt-Hogg-Dubé syndrome*.

bHLH: *Basic-helix-loop-helix*. Básico hélice-vuelta-hélice.

CCR: Carcinoma de células renales.

CHIP: *Carboxyl Terminus of Hsc70-interacting Protein*.

CK2: *Casein Kinase 2*. Caseína quinasa 2.

c-Myc: *Cellular Myelocytomatosis oncogene*.

CRCC: Carcinoma renal de célula clara.

CTAD: *C-terminal Transactivation domain*. Dominio C-terminal de Transactivación

CuI2: *Cullin2*. Culina2.

Dfo: *Desferroxamine*. Desferroxamina.

EGF: *Epidermal Growth Factor*. Factor de Crecimiento Epidérmico.

EPO: *Erythropoietin*. Eritropoyetina.

FH: *Fumarate Hydratase*. Fumarato hidratasa.

FIH: *Factor Inhibiting HIF*. Factor Inhibidor de HIF.

FLCN: *Folliculin gene*.

GSK3: *Glycogen Syntase Kinase 3*. Glucógeno sintasa quinasa 3.

HAF: *Hypoxia Associated Factor*. Factor Asociado a la Hipoxia.

HIF: *Hypoxia Inducible Factor*. Factor Inducible por Hipoxia.

HLRCC: *Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Carcinoma*. Carcinoma de células Renale y Leiomiomatosis Hereditaria.

HPRC: *Hereditary Papillary Renal Carcinoma*. Carcinoma Renal Papilar Hereditario.

HRE: *Hypoxia-Response Element*. Elemento de respuesta a hipoxia.

IGF: *Insuline-like Growth Factor*. Factor de crecimiento insulínico tipo 1.

LPS: *Lipopolysaccharide*. Lipopolisacarido.

MEC: Matriz Extracelular.

MET: *Mesenchymal-epithelial Transition Factor*.

MDM2: *Murine Doble Minute 2*.

MMPs: *Matrix Metalloproteinase*. Metaloproteínasa de matriz.

NTAD: *N-terminal Transactivation domain*. Dominio N-terminal de transactivación.

ODD: *Oxygen-dependent Degradation Domain*. Dominio de degradación dependiente de oxígeno.

PDK: *Pyruvate Dehydrogenase Kinase*. Piruvato deshidrogenasa quinasa

PHD: *Prolyl Hydroxylase Domain containing protein*. Proteína que contiene un dominio prolil hidroxilasa.

PO₂: Presión parcial de O₂.

pRb: Retinoblastoma

pVHL: Proteína VHL.

RACK1: *Receptor for Activated C Kinase 1*.

Rbx1: *Ring-Box1*.

ROS: *Reactive Oxygen Species*. Especies reactivas de oxígeno.

SART1: *Squamous cell carcinoma Antigen Recognized by T-cells*.

SDH: *Succinate Deshydrogenase*. Succinato deshidrogenasa.

shARN: *short hairping ARN*.

TSC: *Tuberous Sclerosis Complex*. Complejo de esclerosis tuberosa.

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

VHL: *von Hippel-Lindau*.

Introducción

1. Carcinoma de células renales.

El cáncer de riñón o carcinoma de células renales (CCR) comprende aproximadamente el 4% neoplasias malignas en adultos y es la décima causa de muerte por cáncer según estudios en la población de los Estados Unidos (EE.UU.). Se estima que en 2010 se diagnosticaron más de 58.000 nuevos casos de cáncer de riñón en los EE.UU. con más de 13.000 casos con resultado de muerte (Jemal *et al.*, 2010).

Aunque el cáncer renal ha estado considerado históricamente como una sola enfermedad, ahora se sabe que es un grupo diverso de tumores epiteliales renales, cada uno caracterizado por una histología distinta (Linehan *et al.*, 2003; Pavlovich and Schmidt, 2004; Zbar *et al.*, 2003) (Tabla 1), una presentación clínica única y por supuesto, una respuesta a terapia diferente, y se asocia con diferentes alteraciones genéticas. Los genes responsables de los seis principales síndromes de cáncer de riñón heredados son *VHL*, *MET*, *FLCN*, *FH*, *SDH*, *TSC1* y *TSC2* originando respectivamente los síndromes de von Hippel-Lindau (VHL) (Seizinger *et al.*, 1988; Zbar *et al.*, 1987), carcinoma renal papilar hereditario (HPRC) (Schmidt *et al.*, 1997), el síndrome de Birt-Hogg-Dubé (BHD) (Nickerson *et al.*, 2002; Pavlovich *et al.*, 2002), leiomiomatosis hereditaria y carcinoma de células renales (HLRCC) (Tomlinson *et al.*, 2002), succinato deshidrogenasa (SDH) (Vanharanta *et al.*, 2004) y el complejo de esclerosis tuberosa(TSC) (Bjornsson *et al.*, 1996).

Tipo de carcinoma de célula renal (CCR)	% Incidencia
Carcinoma renal de célula clara	75-80
CCR papilar	10-15
CCR cromóforo	5
CCR del tubo colector	1

Tabla 1. Clasificación del síndrome de von Hippel-Lindau por su relación genotipo fenotipo

En esta tesis doctoral nos hemos centrado en tumores renales que tienen afectado el gen *VHL*.

1.1 El Síndrome hereditario de von Hippel-Lindau (VHL).

La enfermedad de von Hippel-Lindau (VHL) es una enfermedad hereditaria caracterizada por una predisposición a hemangioblastomas de sistema nervioso central y retina, carcinoma renal de célula clara (CRCC) y feocromocitomas. Descrita por primera vez en la literatura en 1894 por Treacher Collins (Collins, 1894), sin embargo tomó su nombre del oftalmólogo alemán Eugene von Hippel y del patólogo sueco Arvid Lindau que estudiaron por separado, una década más tarde que el Dr. Collins, las lesiones retinianas y cerebelosas de la enfermedad (Hippel, 1904; Lindau, 1927).

La enfermedad presenta una herencia autosómica recesiva, aunque clínicamente hablando se considera enfermedad autosómica dominante, debido a la alta probabilidad de inactivación del alelo homólogo del gen *VHL* a lo largo de la vida del paciente. La incidencia es de 1/35000 individuos (Maher *et al.*, 1991). Los individuos con la enfermedad de VHL poseen un alelo *VHL* salvaje y un alelo de *VHL* inactivado, son heterocigotos para *VHL*, por lo tanto, el desarrollo de tumores o quistes en la enfermedad de von Hippel-Lindau está unido a la inactivación o pérdida somática del alelo salvaje (Figura1). Las alteraciones en el gen *VHL* comprenden deleciones, mutaciones o hipermetilaciones del promotor (Banks *et al.*, 2006; Kaelin, 2007). En total se han descrito más de 150 mutaciones de *VHL* asociadas a la enfermedad (Zbar *et al.*, 1996).

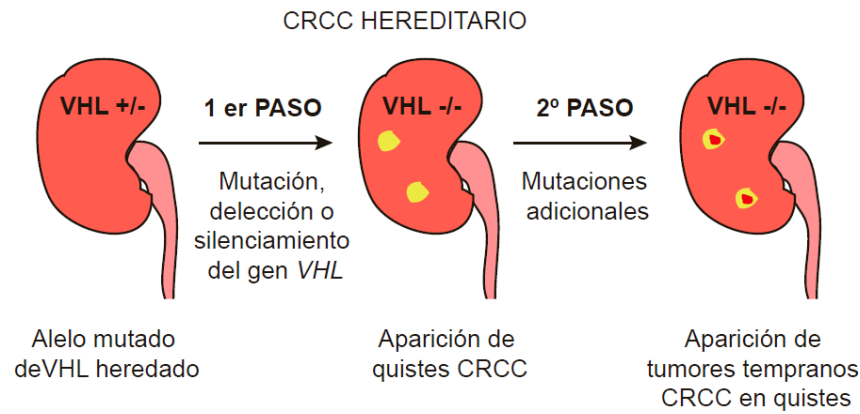


Figura 1. Pasos en el desarrollo del carcinoma renal de célula clara (CRCC) hereditario.

Se han realizado correlaciones entre el fenotipo y el genotipo de la enfermedad de VHL siendo estas útiles para el asesoramiento de los pacientes sobre el riesgo de desarrollar tumores específicos como el feocromocitoma (Tabla 2). Clínicamente obtenemos dos grupos atendiendo a la ausencia (Tipo 1) o presencia (Tipo 2) de feocromocitomas (Chen *et al.*, 1995). El grupo de tipo 2 se podía dividir en los subtipos 2A y 2B con bajo riesgo de padecer CCR y el subtipo 2C que únicamente presentan feocromocitomas (Maher *et al.*, 2011; Zbar *et al.*, 1996). Existe otro grupo en el que se incluyen los afectados por la policitemia de Chuvash. Presentan un elevado hematocrito, altos niveles de eritropoyetina (EPO) y del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) en suero pero ninguno de los demás síntomas relacionados con el síndrome de VHL (Calzada, 2010). Atendiendo a los defectos en *VHL* así como en las consecuencias moleculares de tal defecto (Tabla 2), encontramos que el tipo 1 se caracteriza por delecciones o mutaciones en *VHL* que provocan la terminación prematura de la proteína originando defectos importantes. Las consecuencias moleculares vendrían de una regulación defectuosa de la subunidad alfa de HIF (factor inducible por hipoxia) (Richard *et al.*, 2012). En el grupo tipo 2 se observan mutaciones que alteran parcialmente la función de la proteína VHL de manera que los subgrupos 2A y 2B presentan defectos en la regulación de los factores HIF α y en el ensamblaje de la matriz extracelular (Ohh *et al.*, 1998; Richard *et al.*, 2012). El subtipo 2C, aún presentando mutaciones en *VHL*, estos defectos no afectan a la regulación de los factores

HIF α pero sí ven afectada su capacidad para regular el ensamblaje de fibronectina (Hoffman *et al.*, 2001).

	Mutación	Defecto Molecular	Manifestación Clínica
Tipo 1	Pérdida de VHL y mutaciones que afectan a la integridad de la proteína	Estabilización de HIF1 α Defectos en el ensamblaje de la matriz extracelular	Hemangioblastoma Carcinoma renal de célula clara
Tipo 2A	Mutaciones puntuales sin sentido	Estabilización de HIF1 α Defectos en el ensamblaje de la matriz extracelular	Hemangioblastoma Feocromocitoma
Tipo 2B	Mutaciones puntuales sin sentido	Estabilización de HIF1 α Defectos en el ensamblaje de la matriz extracelular	Hemangioblastoma Feocromocitoma Carcinoma renal de célula clara
Tipo 2C	Mutaciones puntuales sin sentido	Regulación de HIF1 α Defectos en el ensamblaje de la matriz extracelular	Feocromocitoma
Tipo 3	Mutaciones puntuales sin sentido	Estabilización de HIF1 α	Síndrome de Chuvash

Tabla 2. Clasificación del síndrome de von Hippel-Lindau por su relación genotipo fenotipo.

1.2 Tumores esporádicos: Mutaciones de *VHL*

Mientras que la mayoría de los CCR son esporádicos o no hereditarios (96%) sólo una minoría son hereditarios (4%) (Linehan *et al.*, 2003). Alrededor del 50% de los CRCC esporádicos no tienen la capacidad de producir una proteína VHL (pVHL) normal (Kim and Kaelin, 2004). Normalmente este hecho se produce por la mutación intragénica de uno de los alelos de *VHL* unido a la pérdida del alelo homólogo por delección. En otros tumores la pérdida del alelo salvaje se produce como consecuencia del silenciamiento transcripcional tanto del alelo materno como del paterno como resultado de la hipermetilación de su promotor (Figura 2). Existiría un tercer grupo de CRCC en el cual tendrían una inactivación de *VHL* pero sin mutación o hipermetilación del promotor demostrable (Beroukhir *et al.*, 2009).

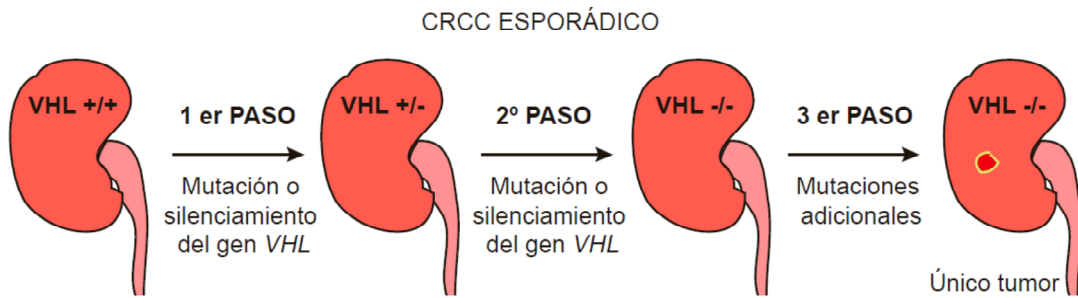


Figura 2. Pasos en el desarrollo del carcinoma renal de célula clara (CRCC) esporádico.

1.3 El gen *VHL*.

1.3.1 Descripción del gen *VHL*.

Mapeado por Seizinger y colaboradores en 1988 (Seizinger *et al.*, 1988) en el brazo corto del cromosoma 3p25-p26, fue clonado posteriormente por Latif y colaboradores en 1993 (Latif *et al.*, 1993). El gen *VHL*, relativamente pequeño, 14.500 pares de bases en el ADN genómico, consta de tres exones con capacidad para generar dos ARNm mediante un procesamiento alternativo que provoca la pérdida del exón 2 (Figura 3). La expresión del ARNm de *VHL* es ubicua, no está restringida a los tejidos asociados a la enfermedad de VHL (ref) (Kessler *et al.*, 1995; Richards *et al.*, 1996).

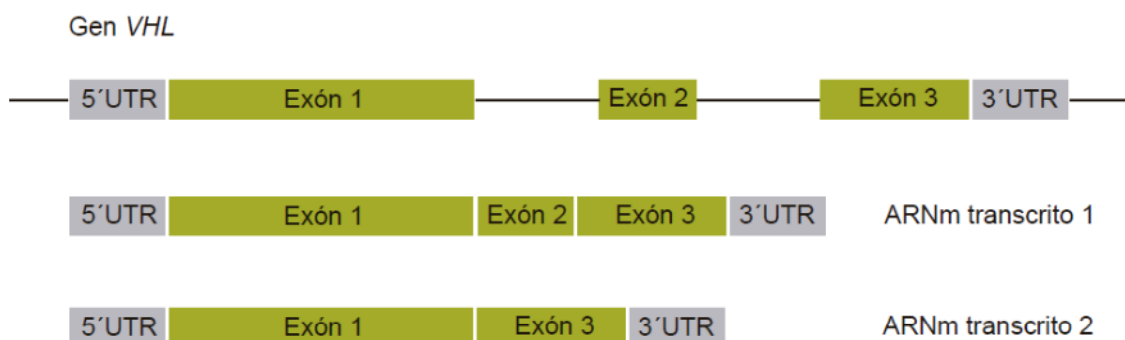


Figura 3. Estructura del gen *VHL*. El gen se compone de tres exones dando lugar tras la maduración del ARNm a dos transcritos. Transcrito 1 compuesto por los tres exones y transcrito 2 compuesto por los exones 1 y 3.

1.3.2 Descripción de la proteína VHL (pVHL).

El gen *VHL* da origen a tres péptidos. A través del transcrito 1 mediante un codón de iniciación de la traducción alternativo en el codón 54 se produce un péptido más pequeño, obteniendo así dos posibles pVHL. En la literatura reciben comúnmente el nombre de pVHL₃₀ (Iliopoulos *et al.*, 1995), para la isoforma completa (del aminoácido 1 al 213) y pVHL₁₉ (Blankenship *et al.*, 1999; Iliopoulos *et al.*, 1998; Schoenfeld *et al.*, 1998), para la isoforma corta (del aminoácido 54 al 213). En ambos casos el nombre lo reciben atendiendo al peso molecular observado, pVHL₃₀ de 24-30 kDa. y pVHL₁₉ de 18-19 kDa. Ambas isoformas parecen mantener la actividad supresora de tumores, siendo las mutaciones en la región desde el aminoácido 1 hasta el 54 muy escasas. Si atendemos a su localización subcelular, pVHL se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma (Duan *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 1998), esto además parece importante para su función como proteína supresora de tumores. Algunos trabajos han descrito que la localización subcelular de pVHL en el citoplasma se encuentra restringida a la isoforma pVHL₃₀ y que la isoforma pVHL₁₉ estaría principalmente localizada en el compartimento nuclear, sugiriendo de esta forma que aunque podrían estar desempeñando funciones solapantes estas no serían del todo idénticas (Hergovich *et al.*, 2003; Iliopoulos *et al.*, 1998).

La proteína VHL se compone principalmente de dos dominios claramente identificables, el dominio β que comprende desde el aminoácido 63 hasta el 155, se ha visto que él se situaría la región encargada de la unión al sustrato y el dominio α desde el aminoácido 156 hasta el 193 (Richards, 2001) (Figura 4). La forma pVHL₃₀ contiene el denominado dominio ácido que comprende desde el aminoácido 1 hasta el 54, y que la isoforma pVHL₁₉ carece.

Por otro lado encontramos al producto del ARNm alternativo, el transcrito 2. La expresión de este transcrito 2 se ha podido observar en algunos tejidos en el proceso de desarrollo embrionario (Richards *et al.*, 1996). Se cree que esta isoforma, producto del transcrito 2 del ARNm del gen *VHL*, carece de la actividad supresora de tumores puesto que se han encontrado tumores que

únicamente presentan la expresión de esta isoforma (Gnarra *et al.*, 1994). La función de esta forma de pVHL no se ha descrito hasta la fecha.

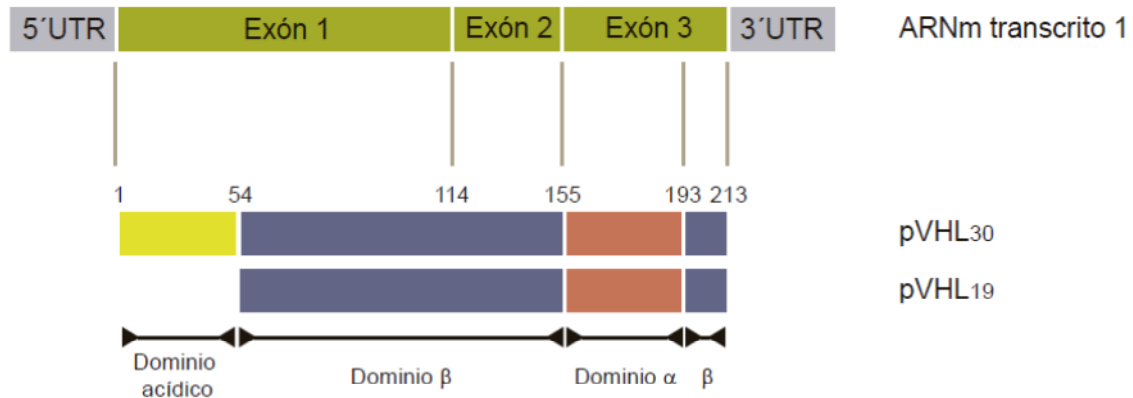


Figura 4. Estructura de la proteína VHL. Representación esquemática de los dominios de la proteína VHL en las isoformas pVHL₃₀ y pVHL₁₉. Se muestra la contribución de cada exón del ARNm a los dominios.

1.3.3 Funciones de pVHL.

La función más estudiada para la proteína pVHL es la de degradación de proteínas por la ruta del proteasoma. Inicialmente se identificó a pVHL como componente de un complejo multiprotéico que contenía dos proteínas más llamadas ElonguinaB y ElonguinaC (Kibel *et al.*, 1995). Más tarde se incluyeron más componentes al complejo, la proteína Culina2 (Cul2) y Ring-box1 (Rbx1) (Kamura *et al.*, 1999; Pause *et al.*, 1997). El conjunto de proteínas que formaban este complejo multiprotéico, en trabajos posteriores, pudo verse que formaban parte de un complejo ubiquitin-ligasa E3 en el que pVHL tendría contacto directo con la proteína Elonguina C (Figura 4) (Iwai *et al.*, 1999; Lisztwan *et al.*, 1999; Stebbins *et al.*, 1999).

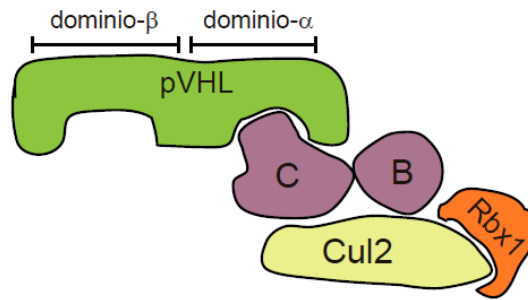


Figura 5. Estructura del complejo ubiquitin-ligasa E3. pVHL forma parte de un complejo multiprotéico junto con ElonguinaC (C), ElonguinaB (B), Cullina 2 (Cul2) y Ring-box1 (Rbx1).

Este complejo ubiquitin-ligasa E3 tiene como sustrato a los factores inducibles en hipoxia HIF1 α y HIF2 α , factores clave en la respuesta adaptativa a la hipoxia y en el desarrollo de estos CRCC.

Debido a esta función de ubiquitinización de los factores HIF α podríamos dividir las funciones de pVHL en funciones HIF α dependientes, como la descrita anteriormente y funciones HIF α independientes, que serían las que llevaría a cabo pVHL sin la interacción con HIF α . La función relacionada con los factores HIF α será abordada más adelante con una mayor profundidad.

En las funciones de pVHL no relacionadas con los factores HIF α se ha podido observar como la mayoría de ellas se producen a través de una interacción bioquímica. Por medio de estudios en los cuales se analizaba el perfil de expresión de genes haciendo un análisis separado del perfil HIF α dependiente del HIF α independiente en células que expresaban o no un pVHL funcional, se pudo ver que la ausencia de pVHL provocaba un cambio en la expresión de genes independientemente de su relación con los factores HIF α (Jiang *et al.*, 2003). Dentro de las funciones descritas para pVHL estarían la regulación de la apoptosis, el control de la senescencia celular, estabilización y mantenimiento de microtúbulos o la regulación de la formación de la matriz extracelular y la adhesión célula-célula (Figura 6).

Regulación de la apoptosis. Tanto HIF como pVHL pueden influir en la función de la proteína p53. HIF1 podría unirse directamente sobre p53 y con ello modular su actividad (An *et al.*, 1998; Sanchez-Puig *et al.*, 2005; Sendoel *et al.*), pero además pVHL es capaz de regular la función de p53

independientemente de la actividad de HIF1 α a través de la inhibición de la ubiquitin-ligasa MDM2, un regulador negativo de p53, provocando una mayor presencia de p53 en el núcleo y con ello más actividad (Roe *et al.*, 2006). La pérdida de pVHL afectaría a ambas formas de regular p53, la dependiente de HIF1 α y a la dependiente directamente de pVHL y con ello la apoptosis mediada por este factor p53. Por otro lado, utilizando células deficientes en actividad pVHL se ha observado una mayor actividad NF- κ B, al menos en parte debido a una actividad HIF dependiente pero por otro lado pVHL tiene la capacidad de unirse con la proteína caseína quinasa 2 (CK2) promoviendo la fosforilación del agonista de NF- κ B, CARD9 y con ello su inhibición (An and Rettig, 2005; Oya *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2007).

Control de la senescencia celular. La senescencia como proceso de parada irreversible del ciclo celular en respuesta a daño en el ADN incluyendo el acortamiento telomérico. Proceso muy importante en la supresión tumoral (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Kim and Sharpless, 2008). Tanto en experimentos *in vitro* como en *in vivo* se ha observado que la inactivación de pVHL con la consecuente acumulación del factor HIF1 α provoca un aumento en la senescencia celular. Sin embargo, esta no parecía ser dependiente de HIF1 α y/o p53 sino que apuntaba a una activación del supresor tumoral Retinoblastoma (pRb) (Young *et al.*, 2008).

Estabilización y mantenimiento de microtúbulos. pVHL estaría asociada estabilizando microtúbulos. Esta habilidad sería independiente tanto de la inhibición a HIF1 α como de su actividad ubiquitin-ligasa. Esta función se pierde en aquellas células que carecen de pVHL y predispone al desarrollo de hemangioblastomas y feocromocitomas pero no al desarrollo de CRCC (Hergovich *et al.*, 2003). Una de las estructuras que se ve afectada por esta función de pVHL sería el cilio primario, estructura especializada en la transducción de señales tanto químicas como mecánicas (Singla and Reiter, 2006).

Regulación de la formación de la matriz extracelular y la adhesión célula-célula. La matriz extracelular (MEC) es una barrera física para la migración celular y la invasión de células cancerosas, pudiendo proporcionar

señales de supervivencia a estas células (Tsukita *et al.*, 2001). pVHL es capaz de regular MEC a través de la inhibición de metaloproteasas (MMPs), enzimas que degradan la MEC. pVHL inhibe la expresión de las metaloproteasas MMP2 y MMP9 además de inducir la expresión de los inhibidores de MMPs, TIMP1 y TIMP2 (Koochekpour *et al.*, 1999). La capacidad de pVHL para organizar la deposición adecuada de MEC no requiere de la unión a los componentes del complejo de ubiquitinización tales como Cul2 y ElonguinaB y C, siendo pVHL regulada en último término mediante ubiquitinización por NEDD8 (Russell and Ohh, 2008; Stickle *et al.*, 2004. Además se ha asociado a pVHL funciones en el mantenimiento de las uniones intercelulares tales como las uniones adherentes o las uniones estrechas puesto que células que han perdido pVHL tienen defectos a la hora de mantener estas uniones {Calzada, 2006 #95).

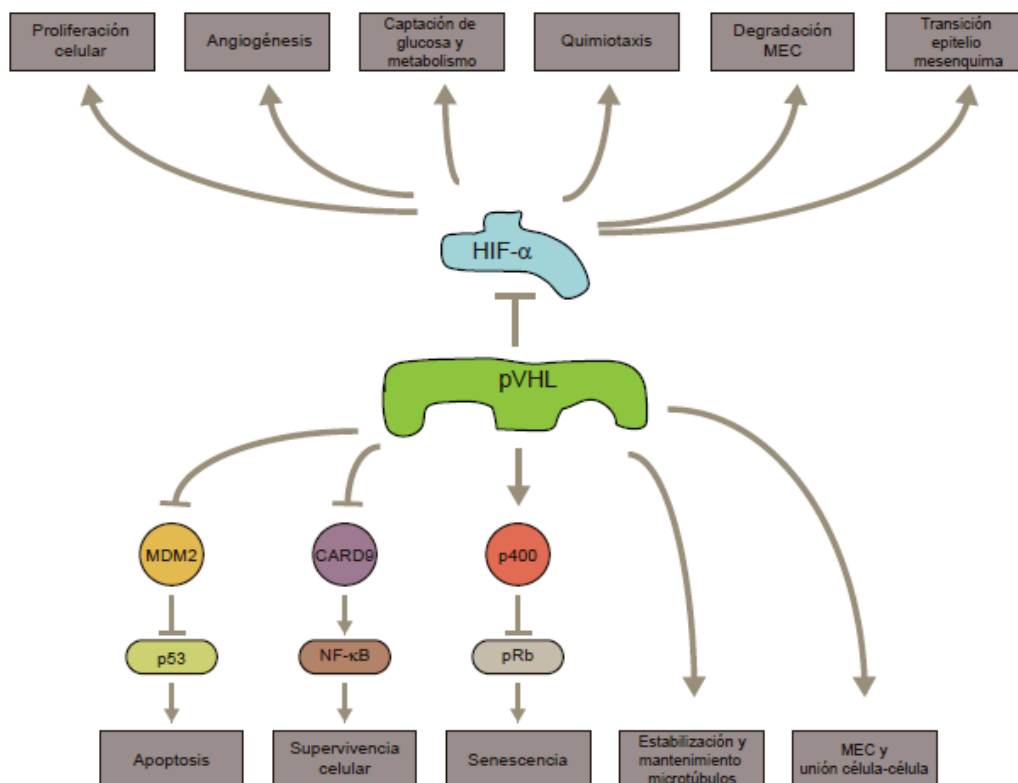


Figura 6. La inactivación de pVHL afecta a rutas dependientes e independientes de HIF

1.3.4 Mutaciones en pVHL.

Principalmente las mutaciones en pVHL afectan a los dominios β y α de la proteína y se encuentran mínimamente localizadas en el dominio ácido o el pseudodominio β localizado entre los aminoácidos 193 y 213 (Hes *et al.*, 2005). Los residuos más susceptibles de mutación en el dominio β se encuentran localizados en la región comprendida entre los aminoácidos 67 y 117, esta región es importante para la unión de los factores HIF α . Los más susceptibles en el dominio α se encuentran localizados en la región donde se produce la unión con la ElonguinaC, entre los aminoácidos 157 y 170. Las mutaciones que afectan a estas regiones producen la estabilización de los factores HIF α (Tanimoto *et al.*, 2000).

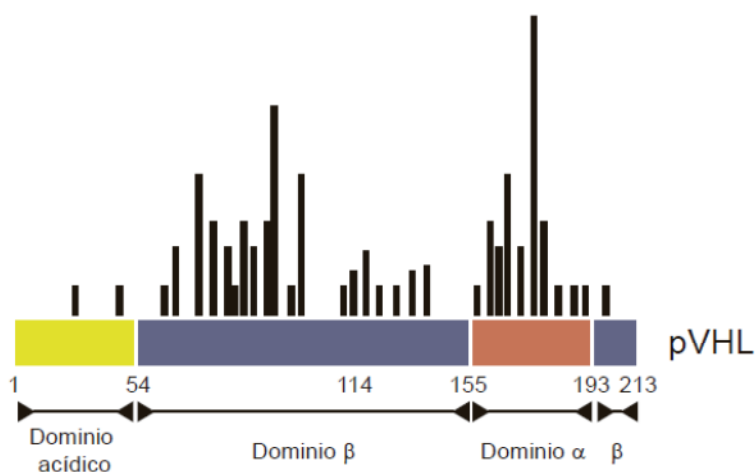


Figura 7. Distribución de las mutaciones en la proteína pVHL.

2. El oxígeno y la respuesta a la hipoxia.

Las especies aerobias han desarrollado mecanismos moleculares para detectar las variaciones en el aporte de O_2 y regular de esta manera las numerosas funciones celulares que requieren de él, respondiendo a escenarios de hipoxia o hiperoxia (Ward, 2008). Las presiones parciales de O_2 (PO_2) a las cuales están sometidas las células son diferentes dependiendo de la localización anatómica. En la mayoría de los tejidos puede fluctuar entorno a

los valores 20-70 mm Hg (2,5-9,0 KPa), teniendo el máximo registrado en la sangre arterial con un valor de 100mm Hg (13 KPa). En el lado opuesto encontramos a tejidos tales como la médula ósea con valores de PO₂ de 10-20 mm Hg (1,3-2,6 KPa) (Aragones *et al.*, 2009). Durante el desarrollo de diferentes patologías la homeostasis del O₂ puede verse afectada, desbalanceada. En hipoxia crónica por altura o por enfermedad pulmonar se produce una disminución sistémica. En otras patologías como las isquemias, los focos inflamatorios, en el desarrollo de tumores o en el crecimiento del tejido adiposo la disminución en el aporte de O₂ sería de forma local. En algunos grupos celulares o en zonas perinecroticas de tumores pueden alcanzarse valores de PO₂ <0,01 KPa (anoxia) (Ward, 2008).

2.1 La respuesta a hipoxia.

Ante una menor disponibilidad de O₂ las células ponen en marcha unos mecanismos de adaptación para hacer frente a la nueva situación. Estos mecanismos están muy conservados evolutivamente, implican una percepción constante de los niveles de O₂ así como de una maquinaria de respuesta que conlleva un cambio en la expresión génica que tiene como objetivo el restablecimiento del aporte de O₂ y la adaptación del metabolismo para asegurar la supervivencia (Denko, 2008; Kaelin and Ratcliffe, 2008). La reprogramación transcripcional es llevada a cabo por los factores de transcripción inducibles por hipoxia HIF (Gu *et al.*, 1998; Tian *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1995).

2.2 Los factores inducibles en hipoxia HIF.

La familia de factores de transcripción HIF se componen de tres miembros HIF α (HIF1 α , HIF2 α y HIF3 α) y dos miembros HIF β , también denominado ARNT (translocador nuclear del receptor para aril hidrocarburos) (HIF1 β y HIF2 β)(Freeburg and Abrahamson, 2004; Wang *et al.*, 1995). Los factores HIF son miembros a su vez de la familia de factores de transcripción *basic hélix-loop-helix* (bHLH) PAS. Poseen un dominio de unión a ADN y reconocen la secuencia 5'-RCGTG-3' (donde R es una purina) también llamada elemento de respuesta a hipoxia o HRE. La subunidad α posee dos dominios de

transactivación, uno en posición N-terminal (NTAD) y otro en posición C-terminal (CTAD) (Figura 8). Las formas de HIF α más estudiadas son HIF1 α y HIF2 α , presentan un 48% de homología y comparten similitudes estructurales y bioquímicas. La redundancia en factores de respuesta a la hipoxia en organismos superiores hizo pensar que aunque tuvieran funciones similares estas no serían del todo iguales. Se observó que la expresión de ambos factores era diferente entre sí siendo la expresión de HIF1 α ubicua en cambio la HIF2 α estaría más restringida (Shen and Kaelin).

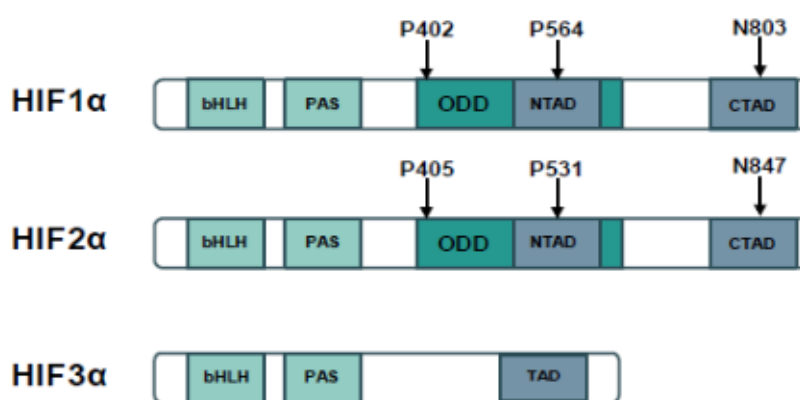


Figura 8. Dominios estructurales de HIF α . Los tres miembros presentan los dominios de unión al ADN (bHLH) y de dimerización con la subunidad β (PAS). También presentan dominios de transactivación (TAD). La subunidad 1 α y 2 α , al contrario que 3 α , presentan además el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD) en el cual se sitúan dos prolinas susceptibles de hidroxilación y una asparagina en el dominio CTAD que regula su activación transcripcional.

2.3 Regulación de los factores inducibles en hipoxia HIF.

Por medio de modificaciones postraduccionales se regula principalmente la expresión de los factores HIF α , puesto que la subunidad HIF β mantiene una expresión constitutiva. Bajo condiciones normales de O₂ (normoxia) los factores HIF α mantienen una vida media muy corta. En cambio, durante un periodo de tiempo donde los niveles de O₂ son limitantes, la vida media de estos factores aumenta significativamente. El mecanismo molecular por el cual ocurre este aumento en la expresión de estos factores esta orquestado por los

denominados sensores de O₂. Estos sensores de O₂ en respuesta a concentraciones de O₂ normales, no limitantes, promueven la hidroxilación de unos residuos de prolina específicos que residen en el ODD (Figura 8), esta hidroxilación desestabiliza en último término a los factores HIF α . La hidroxilación de los factores HIF α esta mediada por una familia de proteínas dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, hierro y O₂ denominadas Prolil-hidroxilasas (PHD1, PHD2 y PHD3) (Bruick and McKnight, 2001; Epstein *et al.*, 2001). Los residuos de prolina hidroxilados sirven para el reconocimiento por la proteína pVHL que mediante el complejo ubiquitin-ligasa E3, al que está asociado, polyubiquitina las subunidades hidroxiladas desencadenando su degradación por el proteasoma (Hoffman *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2001) (Figura 9A). Cuando los niveles de O₂ son limitantes la función de las enzimas PHDs se ve comprometida y con ello la hidroxilación de los factores HIF α que escapan así a la unión con pVHL y a su degradación, aumentando su expresión. Como consecuencia de su acumulación, los factores HIF α se translocan al núcleo promoviendo la transcripción de sus genes diana (Semenza, 2003) (Figura 9B). No es necesario alcanzar condiciones de anoxia para provocar la inhibición de las enzimas PHDs, en condiciones de O₂ moderadas (< 5% O₂) su actividad ya empieza a comprometerse. Este hecho permite entre otros aspectos, adaptar a las células antes de que llegue una situación más severa (Ehrismann *et al.*, 2007; Koivunen *et al.*, 2007).

El dominio de transactivación CTAD incluye la una asparagina susceptible de ser hidroxilada por la asparagil-hidroxilasa FIH (Hewitson *et al.*, 2002; Lando *et al.*, 2002; Mahon *et al.*, 2001). Este dominio CTAD media la interacción con las histonas acetiltransferasas p300/CBP, que actúan como coactivadores ayudando a que la estructura de la cromatina tenga una conformación más permisiva a la transcripción (Arany *et al.*, 1996; Ema *et al.*, 1999). La interacción con estas histonas acetiltransferasas está controlada por medio de la hidroxilación en la asparagina del dominio CTAD por FIH. Es relevante el hecho de que FIH presenta una mayor afinidad por el O₂ que las PHDs, por lo que para que FIH se inhiba completamente es necesario que la hipoxia sea más severa que la que se necesita para inhibir las PHDs (Dayan *et al.*, 2006; Koivunen *et al.*, 2007). Existen escenarios de hipoxia moderada en los cuales

las enzimas PHDs se encuentran inhibidas pero en los que FIH mantiene su actividad con lo que los factores HIF α sólo funcionan con el dominio NTAD. Este hecho permite a las células responder de una manera gradual a las diferentes tensiones de O₂, ajustando así su respuesta, activando únicamente el dominio NTAD en hipoxias moderadas o ambos NTAD y CTAD en hipoxias más severas donde FIH también estaría inhibido.

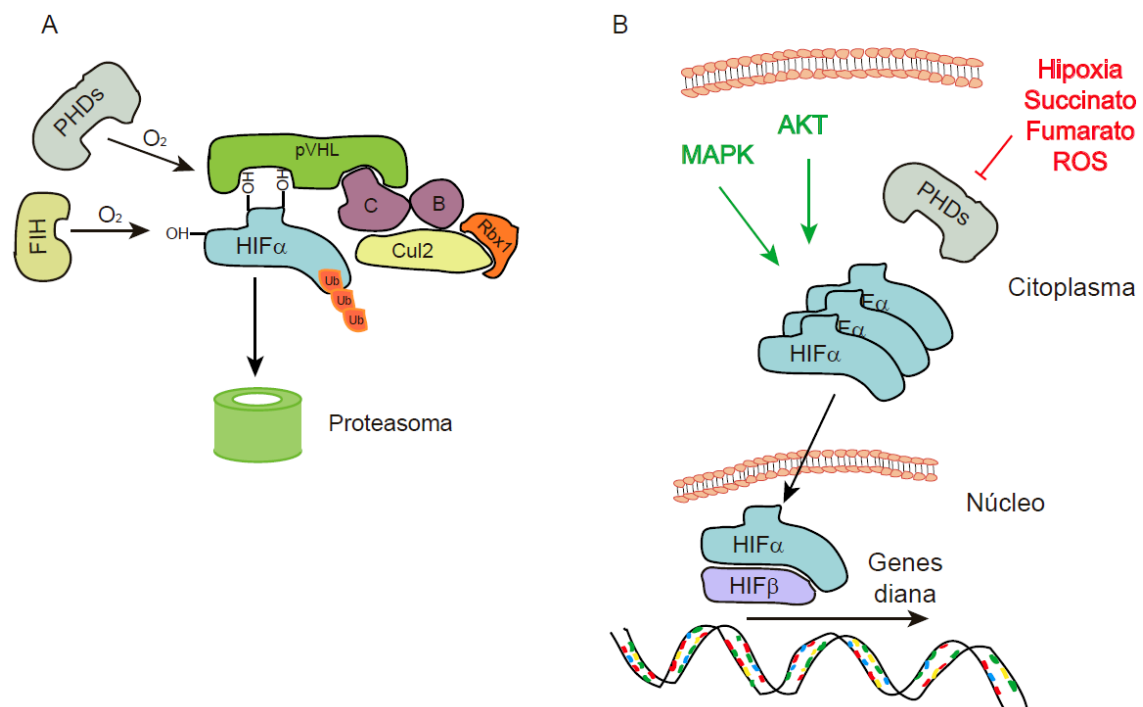


Figura 9. Regulación de HIF α . (A) Mecanismo de degradación de HIF α . En presencia de O₂ las PHDs hidroxilan a HIF α en las prolinas del ODD y FIH en la asparagina del CTAD. HIF α será entonces reconocido por pVHL y poliubiquitinado por el complejo ubiquitin-ligasa degradándose así HIF α por el proteasoma. (B) Estabilización de HIF α . La inhibición de las PHDs por hipoxia así como por succinato, fumarato o especies reactivas de O₂ (ROS) dejaría la estabilización de HIF α que translocaría al núcleo dimerizando con HIF β . Este heterodímero activaría la transcripción de los genes diana.

Además de por la hipoxia HIF α puede acumularse por otros estímulos tales como factores de crecimiento (EGF, FGF2), hormonas (Insulina, IGF1, Angiotensina II, Trombina) (Berra *et al.*, 2000; Gorkach *et al.*, 2001; Page *et al.*, 2008; Page *et al.*, 2002; Zelzer *et al.*, 1998; Zhong *et al.*, 2000) (Figura 9B). Se

ha visto que ciertos factores pro-inflamatorios como el LPS, TNF α e IL1 β estabilizan HIF1 α por medio de un aumento en el ARNm mediada por la vía de NF- κ B (Blouin *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2003).

La dimerización de los factores HIF α con HIF β induce la transcripción de genes diana que contienen el elemento de respuesta a hipoxia (HRE). Hasta fecha se conocen más de 200 genes controlados por este heterodímero. Dentro de los genes controlados por HIF se encuentran genes implicados en el metabolismo energético, angiogénesis, apoptosis, migración, transición epitelio mesénquima, proliferación, suministro de O₂ (Calzada and del Peso, 2007) (Figura 10). HIF1 α y HIF2 α solapan en la expresión de genes diana pero tienen también la exclusividad en algunos como PDK1 para HIF1 α o SLC7A5 para HIF2 α (Elorza *et al.*, 2012; Papandreou *et al.*, 2006).

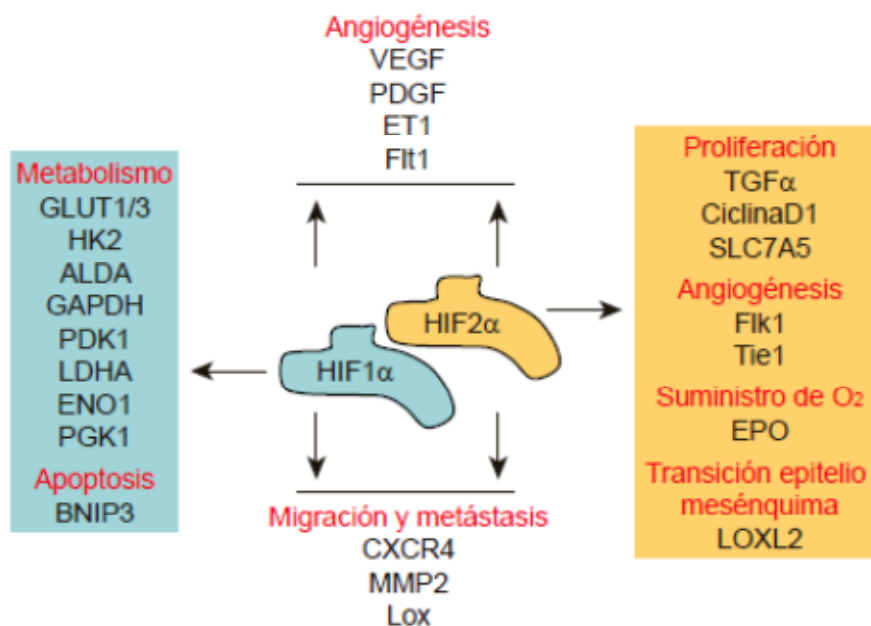


Figura 10. Genes diana de HIF α . Los factores HIF α inducen la expresión de genes envueltos en metabolismo, angiogénesis, migración, suministro de O₂. HIF1 α y HIF2 α regulan genes solapantes como VEGF o CXCR4 pero también dirigen la expresión de genes exclusivos como PDK1 y BNIP3 para HIF1 α o EPO y SLC7A5 para HIF2 α

3. El factor asociado a la hipoxia SART1.

Existen otras rutas descritas para la regulación de HIF tales como la degradación mediada por RACK1 (receptor for activated C-kinase 1), CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein), GSK3 (Glycogen synthase kinase 3) o SART1 (squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells) (Flugel *et al.*, 2007; Koh *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2007; Luo *et al.*), actuando todas ellas de una manera independiente de pVHL. SART1 se ha descrito como un nuevo regulador de HIF1 α independientemente de la tensión de O₂.

SART1, también llamada HAF de factor asociado a la hipoxia, se identificó inicialmente como una proteína nuclear que se expresaba en células proliferantes, tanto en células normales como tumorales también en tejidos proliferativos, siendo indetectable en aquellos que no presentan proliferación (Shichijo *et al.*, 1998). Posteriormente se vio que formaba parte del complejo U4/U6•U5 tri-snRNP (ribonucleoproteína nuclear pequeña) esencial para el ensamblaje de spliceosoma maduro (Makarova *et al.*, 2001). Se pudo ver en ensayos con células de ratón que SART1 era capaz de unirse al promotor de *EPO* promoviendo así un aumento en su transcripción en hipoxia (Gupta *et al.*, 2000). Más tarde se identificó a SART1 como una nueva ubiquitin-ligasa capaz de degradar HIF1 α independientemente de la tensión de O₂. La sobreexpresión de SART1 provocaba un aumento en la degradación de HIF1 α en cambio, la represión de *SART1* mediante ARNs de interferencia dejaba una estabilización independientemente de pVHL o la tensión de O₂. La inclusión de SART1 como regulador de HIF1 α aportaba un nivel más de regulación bajo diversas condiciones.

3.1 SART1 como una proteína multifuncional.

La proteína SART1 puede actuar de varias maneras, como se vio anteriormente puede unirse al ADN aumentando la transcripción de *EPO* y *VEGF* (Gupta *et al.*, 2000). Este papel lo desempeña mediante el N-terminal de la proteína. SART1 era capaz de unirse HIF2 α , en un sitio diferente al de HIF1 α , promoviendo su transactivación (Koh *et al.*). La unión se producía cerca del dominio CTAD de HIF2 α y no interfería con la transactivación mediada por

p300/CBP. Esta función de SART1 se une a la inicialmente descrita degradando HIF1 α . La función estaría localizada en el extremo C-terminal de la proteína, entre los aminoácidos 654 y 800, uniéndose a HIF1 α entre los aminoácidos 296 y 400, región cercana al ODD (Figura 11).

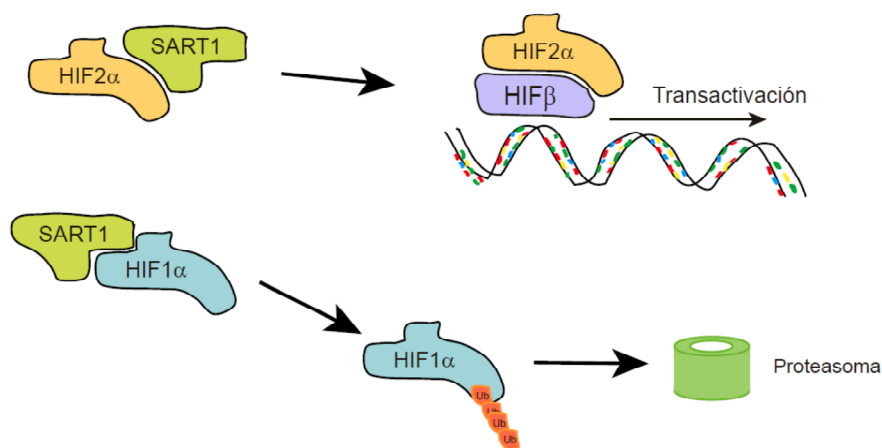


Figura 11. Representación esquemática de la multifuncionalidad de SART1. SART1 actúa como un transactivador de la actividad transcripcional de HIF2 α , uniéndose a él cerca del dominio CTAD. Mediante su extremo C-terminal, SART1 es capaz de unirse en una región cercana al ODD de HIF1 α promoviendo su degradación por el proteasoma.

Se ha podido ver en ensayos de sobreexpresión de SART1 que se encuentra monoubiquitinada (Koh *et al.*, 2008), que de forma contraria a la poliubiquitinización, esta no sirve de señal para la degradación por el proteasoma. Esta monoubiquitinización también se ha observado en supresores de tumores como p53, FOXO (Forkhead box) o PTEN (Phosphatase and tensin homolog), pudiendo afectar a su actividad, estabilidad, localización subcelular o su interacción con otras proteínas (Salmena and Pandolfi, 2007). Además se ha visto que SART1 es susceptible de SUMOilación (Vertegaal *et al.*, 2004).

SART1 se ha propuesto que actuaría de una manera dual con respecto a los factores de transcripción HIF α , asociándolo con el factor HIF1 α en periodos de hipoxia aguda y con HIF2 α en hipoxias crónicas.

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo de tesis es dar respuesta a las incógnitas que existen en torno al comportamiento de los carcinomas renales de célula clara con defectos en la actividad de pVHL cuando se encuentran en un contexto de hipoxia, puesto que como se ha podido observar, aún siendo tumores altamente vascularizados, pueden presentar regiones con bajos niveles de O_2 .

Con esta finalidad se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar el estado de los factores inducibles en hipoxia HIF1 α y HIF2 α así como su actividad transcripcional en condiciones de hipoxia.
2. Analizar el efecto de la actividad mediada por las enzimas proli-hidroxilasas (PHDs) en un contexto celular CRCC.
3. Estudiar la influencia de diferentes mutaciones de *VHL* en el comportamiento de los factores HIF α CRCC.

Materiales y métodos

1. Cultivos celulares y reactivos.

Se utilizaron las líneas celulares derivadas de unos carcinomas renales de célula clara esporádicos, deficientes en la actividad de la proteína pVHL, RCC4 y RCC10, cedidas por el laboratorio del Dr. Michael Ohh (Universidad de Toronto, Canada). También se utilizó la línea celular de carcinoma renal de célula clara A498.

Todas las líneas celulares se cultivaron en medio DMEM suplementado con 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina (100x PAA) y un 10% de suero fetal bovino (FBS, Hyclone Thermo scientific) en un incubador a 37°C, 21% O₂ y 5% CO₂ (Normoxia). Para los tratamientos de hipoxia las líneas celulares se cultivaron en un incubador INVIVO₂-200 (Ruskin Technology, West Yorkshire) siendo la atmosfera para las hipoxias moderadas de 1% O₂, 94% N₂ y 5% CO₂. Para las hipoxias severas 0.1% O₂, 94.9% N₂ y 5% CO₂.

Para los ensayos de inhibición química de las enzimas prolil-hidroxilasas (PHDs) se utilizaron los compuestos químicos dimetil-oxaloil-glicina (DMOG, Enzo Life Sciences) y la desferroxamina (Dfo, Sigma-Aldrich, Inc).

2. Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot.

El análisis de proteínas tras finalizar los diferentes tratamientos se realizó mediante inmunodetección. Las células se lavaron con un tampón fosfato salino (PBS) frío y seguidamente se lisaron en Laemmli (2% SDS, 10% glicerol, 10 mM DTT, 62mM Tris pH 6,8 y 0,004% azul de bromofenol). Las proteínas contenidas en estos lisados se resolvieron en geles de poliacrilamida-SDS al 10% o 15% para la resolución de proteínas pequeñas, posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Se bloquearon las membranas con tampón TBS-T (50mM Tris HCl pH 7,6, 150mM NaCl, 0,05% Tween-20) y 5% de leche en polvo desnatada. Se incubaron posteriormente las membranas con los anticuerpos primarios durante al menos 16 horas a 4°C. Tras la incubación se lavaron las membranas con TBS-T para eliminar las trazas de anticuerpo primario sin hibridar y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario. Para la detección se utilizó quimioluminiscencia potenciada (SuperSignal West Femto Maximum Sensivity Substrate, Thermo

scientific) visualizándose mediante un analizador de imágenes (Image Quant LAS4000 mini, GE Healthcare).

3. Anticuerpos.

Los anticuerpos usados en este trabajo incluyen anticuerpos monoclonales generados en ratón frente a HIF1 α (1:1000) (BD Transduction Laboratories, 610959), VHL (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, SC-135657) y Tubulina (1:2000) (Sigma-Aldrich, T6199). También se utilizaron anticuerpos policlonales generados en conejo frente a HIF2 α /EPAS (1:1000) (Abcam, Ab199), SART1 (1:1000) (Abcam, 95957) y Lamina A/C (1:1000) (Cell Signaling Technology, 2032S). Para la detección de los anticuerpos primarios se utilizó, según el caso, un anticuerpo anti-ratón (1:5000) (Pierce, 32430) o un anti-conejo (1:5000) (Thermo scientific, 31460), todos ellos acoplados a HRP (Horseradish Peroxidase).

4. Inmunofluorescencia de HIF1 α .

Después de los tratamientos, se fijaron las células con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. Posteriormente se permeabilizaron las células con un tampón PBS (0,2% Triton X-100). Para bloquear se utilizó TNB (Tris-NaCl-blocking buffer) (Invitrogen). Se incubaron las muestras con el anticuerpo anti-HIF1 α descrito anteriormente (1:200). Para la detección del anticuerpo primario se utilizó anti-ratón 488 (1:200) (Roche, 1096176). Las muestras se montaron en prolong que contenía para la tinción de núcleos DAPI.

5. Ensayo de inhibición del proteasoma.

Se cultivaron las células en placas de 60 mm en condiciones de normoxia o hipoxia durante 24 horas en presencia o ausencia del inhibidor del proteasoma MG132 0,5-1 μ M (Sigma-Aldrich).

6. Silenciamiento génico mediante ARNs de interferencia.

Los silenciamientos se realizaron mediante ARNs de interferencia utilizando oligonucleótidos siARN humanos dirigidos frente a PHD1 (Santa Cruz Biotechnology, SC-45616), PHD2 (Santa Cruz Biotechnology, SC-45537), PHD3 (Santa Cruz Biotechnology, SC-45799) y VHL (Santa Cruz

Biotechnology, SC-36816) utilizando como control una secuencia aleatoria (scramble, SCR) (Santa Cruz Biotechnology, SC-37007). Las células se transfectaron con dichos siARNs a una concentración final de 100nM usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Las tranfecciones se analizaron 72 horas después, el grado de interferencia y el efecto de la misma.

7. Transducción celular mediante infección lentiviral.

Párculas lentivirales en el vector pGIPZ con shARN frente a SART1 (V3LHS_317695) (V3LHS_317698) (V3LHS_635580) se hizo una mezcla equitativa de partículas lentivirales. Como control se utilizó el vector pGIPZ *non-silencing* (RHS4348) (Thermo scientific). Para realizar la infección se siguieron las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó una selección por medio del antibiótico puromicina (1µg/mL).

8. Extracción de ARN y PCR cuantitativa a tiempo real.

El ARN total procedente de células se aisló mediante el uso de TRI REAGENT (TR-118) según las especificaciones del fabricante. El ARN extraído se cuantificó mediante un Nano-drop (ThermoFisher Scientific; Waltham). Se usó 1µg de cada muestra para realizar una transcripción inversa a ADNc mediante el kit GeneAmp Gold RNA PCR Core kit (Applied Biosystems). Mediante el uso de 1µL de ADNc molde se realizó la reacción de amplificación con Power SYBR Green PCR Master Mix kit (Applied Biosystems). Para cada muestra se realizaron medidas por duplicado y todos los valores se normalizaron en base a los niveles de expresión de β -Actina. Las Parejas de oligonucleótidos usados para las amplificaciones se diseñaron de forma que hibridaran en exones diferentes con el fin de evitar las amplificaciones con el ADN genómico. El diseño de los oligonucleótidos se realizó mediante el programa Primer Express (Applied Biosystems). Las parejas de oligonucleótidos de especifican en la Tabla 3.

Gen	Secuencia 5'-3'	
	F	R
<i>βACTIN</i>	GGCACCCAGCACAATGAAG	CCGATCCACACGGAGTACTTG
<i>HIF1α</i>	AGCCGAGGAAGAAGAACTATGAACATAA	GTGGCCTGTGCAGTGCAA
<i>HIF2α</i>	CTCATCCCTGCGACCATGA	TTCCCAAACCAGAGCCATT
<i>PKD1</i>	GTGGTTTATGTACCATCCCATCTCT	TCCATAGTGGCTCTCATTGCAT
<i>SLC7A5</i>	GTGGAAGAACAAGCCCAAGTG	CCTCTGTGACGAAATTCAGTAATTC
<i>PHD1</i>	GCGCTGCATCACCTGTATCTAT	CCGCCATGCACCTTAACG
<i>PHD2</i>	CCCTCATGAAGTACAACCAGCAT	CATCTGCATCAAATACCAAACAGT
<i>PHD3</i>	GCCGGCTGGGCAAATACTA	CCGGATAGCAAGCCACCAT

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos. Parejas de oligonucleótidos usados para la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real.

9. Fraccionamiento subcelular núcleo/citoplasma.

Se cultivaron las líneas celulares RCC4 y RCC10 en placas de 100 mm se colectaron medio fresco y las centrifugamos a 300 g durante minutos a 4°C. El sedimento, que contiene las células se lavo con tampón PBS frio y repetimos la centrifugación. El sedimento se resuspendió en 100µL de reactivo A (10 mM Hepes pH 8, 50 mM NaCl, 0,5 M sacarosa, 1mM EDTA pH8, 0.5% Triton X-100), transferimos el contenido a tubos de 1,5 mL e incubamos 5 minutos en hielo. Seguidamente centrifugamos a 4000 g durante 3 minutos a 4°C. En el sobrenadante encontraremos la fracción citosólica que se puso en tubos nuevos. El sedimento, por su parte, se resuspendió en 500µL de reactivo B (10 mM Hepes pH 8, 50 mM NaCl, 0,1mM EDTA pH 8, 25% glicerol) y se centrifugo a 4000 g durante 3 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 30µL reactivo C (0,3 M Tris HCl pH 6,8, 2% SDS) y agitamos vigorosamente. Los extractos nucleares en tres ciclos de 15 segundos (20% de amplitud) seguida de una incubación de 15 minutos en hielo. Añadimos 1mM DTT he incubamos 5 minutos a 95°C. Centrifugamos finalmente a 15000 g durante 15 minutos, el sobrenadante contiene la fracción nuclear. Todos los reactivos contienen un coctel de inhibidores de proteasas (Roche). Para su análisis las muestras, se cuantificó la cantidad de proteína mediante reactivo de Bradford (Bio-Rad) según las indicaciones del fabricante.

10. Ensayo de proliferación celular.

Las células de CRCC, RCC4 establemente infectadas se cultivaron en placas multipocillo (24 pocillos). Se sembraron 6 pocillos por condición (10^3 células/pocillo) en medio de cultivo DMEM suplementado con 5% FBS. A los tiempos establecidos se procesaron las muestras fijándolas con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. Las células entonces se incubaron en solución de cristal violeta (0,025% en H_2O) durante 20 minutos. Seguidamente se realizaron tres lavados con H_2O con el fin de eliminar el exceso de solución de cristal violeta. Para disolver el cristal violeta incorporado a las células se utilizó metanol (100%). Analizamos la solución mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540nm.

11. Análisis estadístico.

Los datos experimentales se analizaron estadísticamente mediante el programa GraphPad (versión 5.0). Los datos se analizaron mediante ANOVA seguido de un test de comparación multiparamétrico de Tukey o Bonferroni. Las diferencias significativas se indicaron en las figuras correspondientes mediante asteriscos.

Resultados

1. Los niveles proteicos del factor HIF1 α descienden en condiciones de hipoxia en células de carcinoma renal de célula clara.

1.1. HIF1 α es sensible a diferentes tensiones de oxígeno (O₂) en CRCCs.

A pesar de que se ha descrito que los tumores de carcinoma renal de clara son tumores altamente vascularizados se ha podido observar en otros trabajos que pueden presentar hipoxia (Lawrentschuk *et al.*, 2011), Quisimos caracterizar el efecto que podría tener un ambiente hipóxico en líneas celulares que carecen de la regulación canónica de respuesta a hipoxia dado su déficit de actividad en la proteína supresora de tumores pVHL. Para ver este efecto cultivamos células de carcinoma renal RCC4 y RCC10 en condiciones de normoxia (21% O₂), hipoxia (1% O₂) o hipoxia severa (0,1% O₂) durante diferentes tiempos. Sorprendentemente, cuando analizamos los niveles del factor de transcripción HIF1 α , a nivel de proteína, pudimos observar como se había producido una reducción en los niveles de este factor (Figura 12A y 12B). Además, se podía observar como una bajada tanto dependiente de la concentración de oxígeno como del tiempo de exposición a estas condiciones de cultivo, siendo este hecho más evidente en la línea celular RCC10 (Figura 12B). De forma contraria al efecto observado sobre el factor HIF1 α , el factor HIF2 α no mostraba esta disminución sino que observamos, en algunos ensayos un aumento en sus niveles de proteína, siendo este aumento más variable.

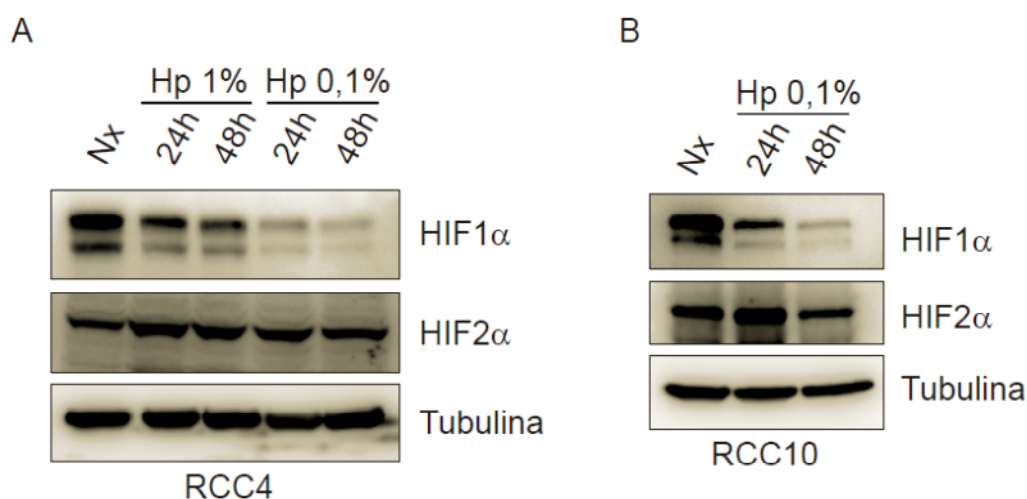


Figura 12. La hipoxia disminuye los niveles de HIF1 α en las líneas celulares RCC4 y RCC10. Análisis por Western blot de la expresión de los factores HIF1 α y HIF2 α . (A) Células de carcinoma renal RCC4 se cultivaron durante los 24 ó 48 h bajo las tensiones de O₂ indicadas en la figura, considerando el 21% de O₂ el estado de normoxia. (B) Células RCC10 cultivadas en hipoxia severa (0,1% O₂) durante los tiempos indicados en la figura.

Analizamos, realizando el mismo tipo de ensayo, los niveles de expresión de HIF1 α y HIF2 α en la línea celular A498 (Figura 13). Esta línea celular pudimos observar también como los niveles de HIF1 α se veían comprometidos, no así los del factor HIF2 α , cuando se cultivaba en condiciones de hipoxia severa.

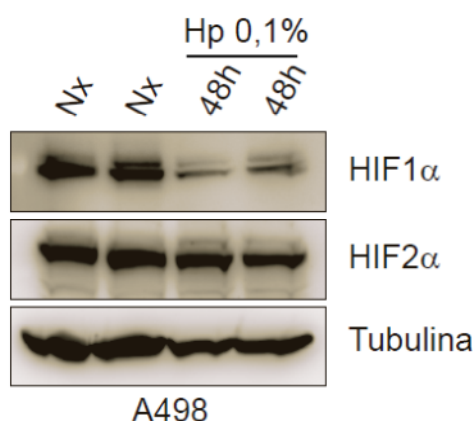


Figura 13. La hipoxia disminuye los niveles de HIF1 α en la línea celular A498. Análisis por Western blot de la expresión de los factores HIF1 α y HIF2 α . Se cultivaron A498 bajo condiciones de hipoxia severa (0,1% O₂) durante 48h.

A la vista de los resultados obtenidos, lo siguiente que quisimos saber era si los cambios observados en la expresión de HIF1 α y HIF2 α tras la exposición de las CRCC a hipoxia tenían consecuencias en la inducción de sus respectivos genes diana. Para ello analizamos genes que se regulan de manera independiente por HIF1 α y HIF2 α (Elorza *et al.*, 2012; Papandreou *et al.*, 2006). Mediante RT-PCR de los ARNm de la línea celular RCC4 sometida a condiciones de hipoxia severa (0,1% O₂) y analizando genes diana de HIF1 α (*PDK1*) así como de HIF2 α (*SLC7A5*) por medio de una PCR cuantitativa,

podimos ver como los niveles de *PDK1* se veían significativamente afectados cuando disminuía la cantidad del factor HIF1 α (Figura 14). Por otro lado el efecto sobre el gen dependiente de HIF2 α , *SLC7A5* era también significativo aumentando su expresión de forma notable.

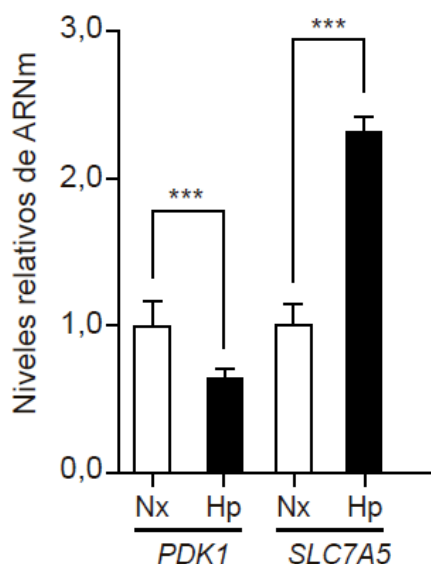


Figura 14. Análisis de genes diana de HIF1 α y HIF2 α : Análisis mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles relativos de ARNm de los genes *PDK1* y *SLC7A5* en células RCC4 sometidas a hipoxia severa (0,1% O₂) durante 72h.. Los datos se han normalizado con respecto a la expresión de β ACTINA. Se muestra la media; las barras de error representan la desviación estándar; n=3. Anova con Test de Bonferroni, ***p<0,001.

1.2. Es necesaria la exposición a periodos largos de hipoxia para observar la disminución de HIF1 α .

Para una mejor caracterización del efecto de la hipoxia sobre los factores HIF1 α y HIF2 α en células de carcinoma renal, se expusieron las líneas celulares RCC4 y RCC10 a diferentes periodos de tiempo de hipoxia severa (0,1% O₂), desde 3 horas hasta 24 horas, pues bajo estos niveles de O₂ el efecto observado en los niveles de estos factores era mayor. Los resultados obtenidos fueron ligeramente diferentes para cada línea celular. En la línea celular RCC4 era necesario un tiempo de exposición (Figura 15A), en estas condiciones de cultivo, de 24 horas para poder ver una reducción en los niveles

de HIF1 α . En cambio, en la línea celular RCC10 el efecto de la disminución en los niveles de HIF1 α podía observarse en tiempos más tempranos indicándonos una diferente sensibilidad comparando ambas líneas celulares (Figura 15B).

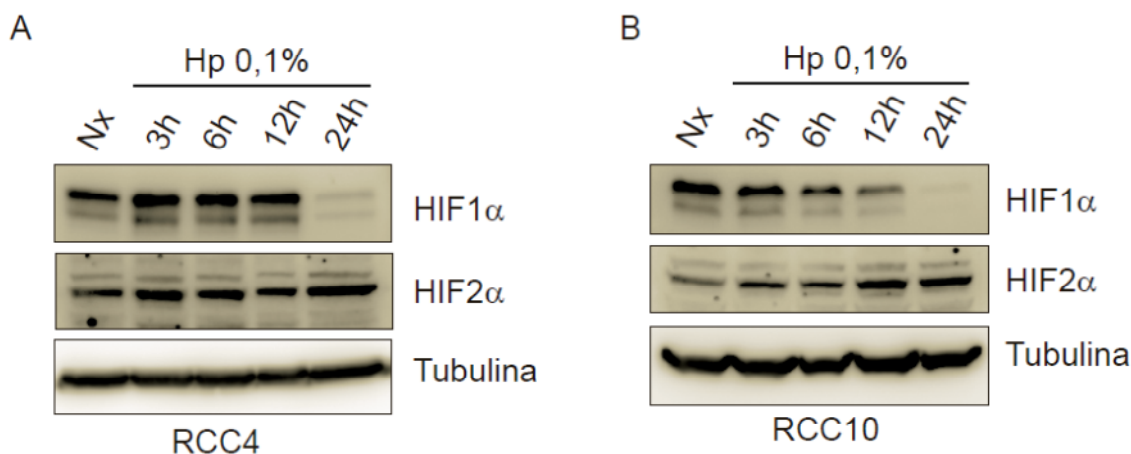


Figura 15. Periodos de 12-24 horas de hipoxias disminuyen los niveles de HIF1 α en las líneas celulares RCC4 y RCC10. Análisis por Western blot de la expresión de los factores HIF1 α y HIF2 α . (A) Células de carcinoma renal RCC4 expuestas a condiciones de hipoxia severa (0,1% O₂) durante los tiempos indicados en la figura. (B) Células de carcinoma renal RCC10 expuestas a condiciones de hipoxia severa (0,1% O₂) durante los tiempos indicados en la figura.

Contrariamente a lo observado con el factor HIF1 α , el factor HIF2 α parecía comportarse de forma similar, observándose en ambas líneas celulares un aumento de su expresión, siendo además este aumento más rápido que la disminución de HIF1 α puesto que a las 3 horas de estímulo hipóxico ya podía observarse.

1.3. La expresión de HIF1 α se restablece con la reoxigenación.

Quisimos saber si la disminución en los niveles de HIF1 α podría ser un proceso reversible. Para ello realizamos un ensayo de reoxigenación. Cultivamos las líneas celulares RCC4 y RCC10 durante 24 horas de hipoxia severa (0,1% O₂). Después de este estímulo las células se cultivaron en condiciones normales de oxígeno realizando una cinética de reoxigenación,

tomando como control el tiempo de 24 horas de hipoxia que equivale a 0 horas de reoxigenación. Observamos de forma clara que se producía una acumulación de HIF1 α a tiempos crecientes de reoxigenación tanto en la línea RCC4 (Figura 16A) como en RCC10 (Figura 16B). También pudimos ver efectos de la reoxigenación en el factor HIF2 α pero en este caso, el efecto era más claro en la línea RCC4, disminuyendo sus niveles de forma clara en esta línea celular pero de una forma variable en RCC10, indicándonos de nuevo las posibles diferencias de sensibilidad de estos procesos en diferentes líneas celulares de carcinoma renal.

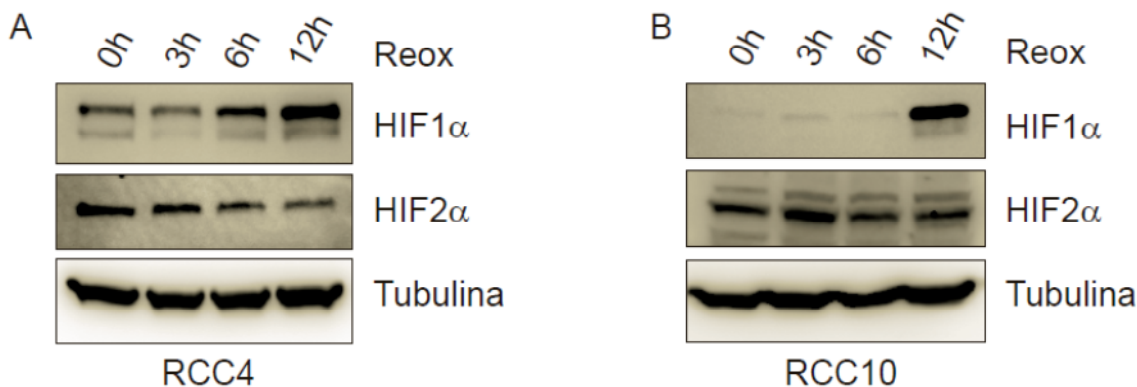


Figura 16. Tensiones de oxígeno normales recuperan la expresión de HIF1 α . Análisis por Western blot de la expresión de los factores HIF1 α y HIF2 α . (A) Se cultivaron células RCC4 durante 24h en condiciones de hipoxia severa (0,1% O₂), después se reoxigenaron en condiciones de normoxia durante los tiempos indicados. (B) Se cultivaron células RCC10 durante 24h en condiciones de hipoxia severa (0,1% O₂), después se reoxigenaron en condiciones de normoxia durante los tiempos indicados.

1.4. La proteína HIF1 α disminuye de una manera independiente de su nivel de expresión de ARNm.

Pensamos que la manera más rápida de analizar las causas de la disminución en los niveles de proteína de HIF1 α era estudiar cómo se comportaba el ARN mensajero (ARNm) de estos factores en las condiciones de cultivo anteriormente descritas. Para ello, realizamos una RT-PCR con el fin de analizar los niveles de ARNm de HIF1 α y HIF2 α mediante la técnica de PCR cuantitativa. Pudimos observar como el ARNm de estos factores se mantenía

constante bajo estas condiciones en la línea celular RCC4 (Figura 17), indicándonos que los niveles de ARNm de estos factores no estarían implicados aparentemente en la disminución del factor HIF1 α , ni en el aumento de HIF2 α . Estos resultados hacían que centráramos nuestra atención en los niveles de proteína de estos factores.

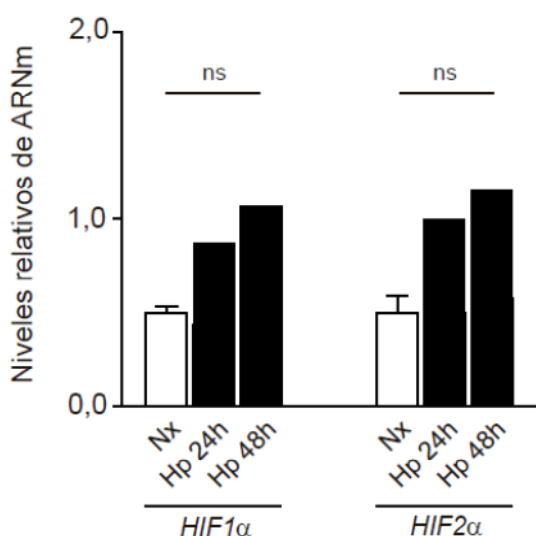


Figura 17. Análisis de los niveles de ARNm de los factores HIF1 α y HIF2 α . Se cultivaron células RCC4 durante 24h y 48h en condiciones de hipoxia severa (0,1% O₂). Análisis mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles relativos de ARNm de los genes *HIF1 α* y *HIF2 α* . Los datos se han normalizado con respecto a la expresión de *β ACTINA*. Se muestra la media; las barras de error representan la desviación estándar; n=3. Anova con Test estadístico de Bonferroni, ns (no significativo).

Tomados en su conjunto, los datos de este primer apartado nos indican que las células de carcinoma renal de célula clara pueden regular negativamente al factor HIF1 α bajo condiciones de hipoxia y que esta regulación se realiza a nivel de proteína. Además, pudimos observar una regulación de los factores HIF1 α y HIF2 α diferencial, disminuyendo el factor HIF1 α y aumentando HIF2 α , provocando un efecto a nivel transcripcional en sus genes diana.

2. La actividad PHD es esencial para mantener los niveles de HIF1 α en CRCC.

2.1. La inhibición farmacológica de las PHDs disminuye los niveles de HIF1 α .

A la vista de los resultados obtenidos en el análisis del comportamiento de las líneas celulares de carcinoma renal de célula clara RCC4 y RCC10 en

condiciones de oxígeno bajas, la siguiente cuestión que quisimos abordar fue si en este proceso jugaba algún papel la ruta canónica de respuesta a hipoxia. Para ello lo primero que contemplamos fue el posible papel de las enzimas prolil-hidroxilasas (PHDs) en este proceso.

Dado que la hipoxia conduce a la inhibición de estas enzimas Utilizamos inhibidores de las PHDs, tales como el dimetil-oxaloil-glicina (DMOG), un análogo del 2-oxo-glutarato y un quelante de hierro, necesario para la actividad PHD, la desferroxamina (Dfo) para comprobar si en condiciones de normoxia y tras la inhibición de las PHDs observábamos la disminución de la expresión de HIF1 α y con ello podíamos confirmar la posible implicación de estas enzimas. Sometimos a ambas líneas, RCC4 y RCC10, a tratamientos con diferentes dosis de inhibidor DMOG en condiciones normales de oxígeno con el fin de evitar procesos dependientes de hipoxia e independientes de la actividad PHD (Figura 18A y 18B). Lo que pudimos observar es que la inhibición de las enzimas PHDs tenía como consecuencia la disminución de la expresión bajada del factor HIF1 α pero no de HIF2 α .

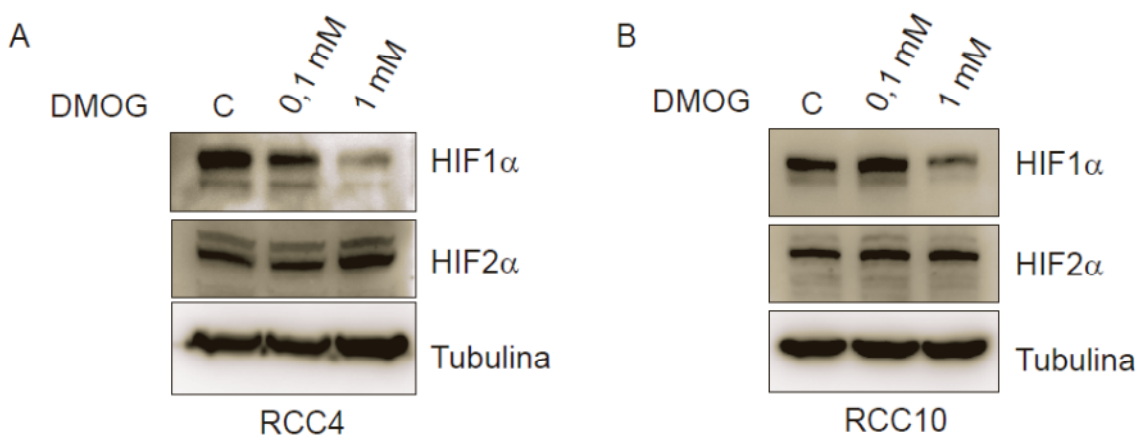


Figura 18. La inhibición química de las enzimas PHD afecta negativamente a los niveles HIF1 α . Análisis por Western blot de la expresión de los factores HIF1 α y HIF2 α . (A) Se cultivaron células RCC4 en condiciones de normoxia con el inhibidor de las enzimas prolil-hidroxilasas DMOG a las concentraciones indicadas. (B) Se cultivaron células RCC10 en condiciones de normoxia con el inhibidor de las enzimas prolil-hidroxilasas DMOG a las concentraciones indicadas.

Obtuvimos resultados similares con tratamientos con Dfo en la línea celular RCC4, observando una bajada significativa en los niveles de HIF1 α (Figura 19)

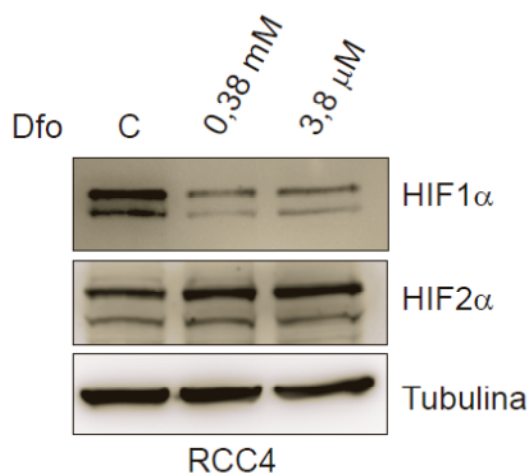


Figura 19. La inhibición química de las enzimas PHD afecta negativamente a los niveles HIF1 α . Análisis por Western blot de la expresión de los factores HIF1 α y HIF2 α . Se cultivaron células RCC4 en condiciones de normoxia con el inhibidor de las enzimas PHDs, Dfo a las concentraciones indicadas.

Además mediante la utilización de varias dosis de inhibidor, en el caso del DMOG (figura 18), pudimos observar como la disminución de la expresión de HIF1 α guardaba una relación con las dosis más altas de los inhibidores de las PHDs

2.2. Contribución de las diferentes PHDs en la expresión de de HIF1 α .

Hemos visto que tanto la ausencia de oxígeno como la inhibición mediante compuestos que disminuyen la actividad PHD dan como resultado una bajada en los niveles de HIF1 α en células de carcinoma real de célula clara. Parece que la actividad PHD es importante para su mantenimiento. Dado que ambos procesos descritos actúan indiscriminadamente sobre las tres PHDs que hasta la fecha regulan al factor HIF1 α , quisimos ver si alguna de ellas poseía un mayor protagonismo en el mantenimiento de este factor. Para

ello, mediante el uso de ARNs de interferencias contra cada una de las PHD intentamos discriminar el papel de cada una de ellas. Mediante RT-PCR cuantitativa comprobamos los niveles de caída de ARNm de cada una de las PHDs (Figura 20).

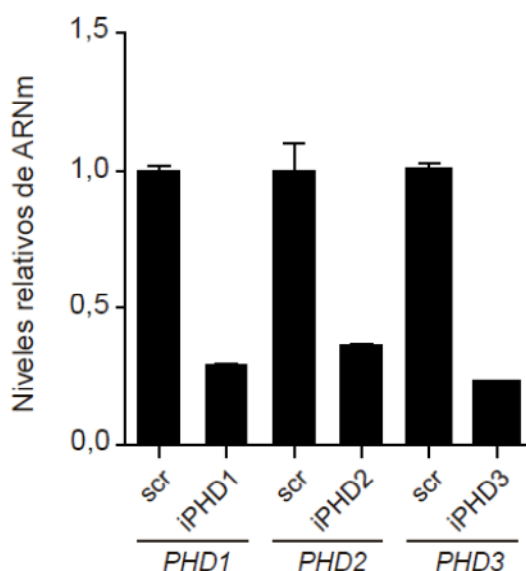


Figura 20. Análisis de la disminución de la expresión de PHDs en ensayos de ARN de interferencia. Análisis mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles relativos de ARNm de los genes *PHD1*, *PHD2* y *PHD3* tras los ensayos de interferencia. Los datos se han normalizado con respecto a la expresión de β ACTINA. Se muestra la media; las barras de error representan la desviación estándar; n=3.

En paralelo se analizaron los niveles de proteína de los factores HIF1 α y HIF2 α (Figura 21). Observamos un comportamiento diferencial en los niveles de HIF1 α con estas interferencias. En primer lugar confirmamos los resultados obtenidos con la inhibición química de las PHDs y en segundo lugar observamos cómo podía existir una mayor implicación en el mantenimiento de HIF1 α por parte de PHD1 y PHD3 dado que no se apreciaba una disminución significativa de la expresión de HIF1 α con las interferencias de PHD2, a pesar de que se ha descrito como su principal regulador (Berra *et al.*, 2003). Por otro lado las interferencias de las diferentes PHDs no parecían tener un efecto significativo en la expresión de HIF2 α , corroborando por tanto los datos ya obtenidos con la inhibición química, mediante DMOG o Dfo, de las PHDs.

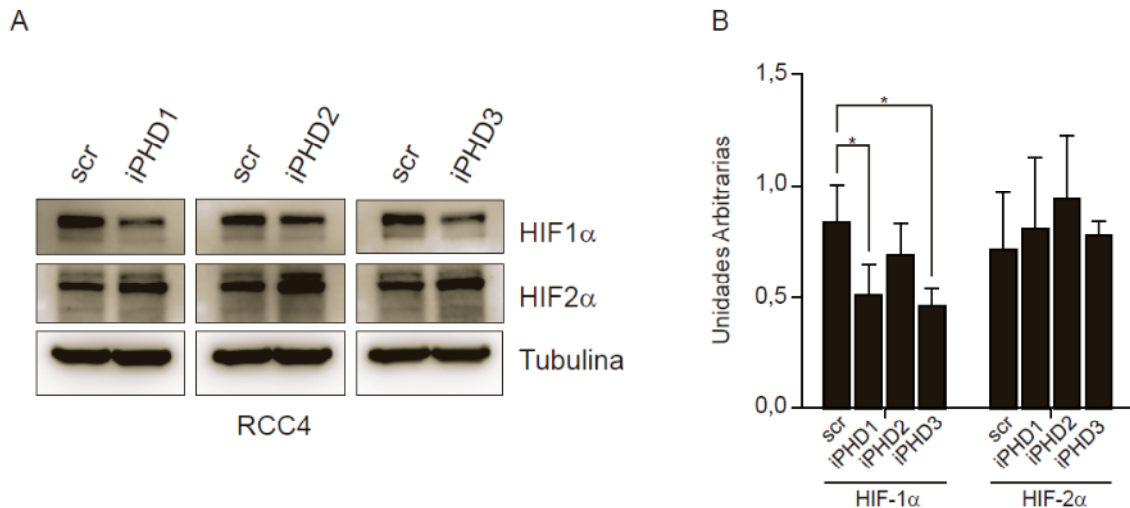


Figura 21. La interferencia selectiva de las diferentes PHDs afecta a la expresión de HIF1α. (A) Análisis por Western blot de la expresión de los factores HIF1α y HIF2α de células RCC4 transfectadas con ARNs de interferencia para las diferentes PHDs (figura 9) y cultivadas en normoxia. Las muestras se analizaron 72h post-transfección (B) Cuantificación Western blot de experimentos de interferencia de PHDs mediante el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>). Las barras de error representan la desviación estándar; n=3. Anova con Test de comparación múltiple de Tukey, * p<0,05.

3. La bajada de los niveles de HIF1α se produce en el núcleo.

Como pudimos observar, la disminución en los niveles de expresión de HIF1α parecía estar relacionada con la ausencia de actividad de las enzimas PHD1 y PHD3 principalmente. La diferente localización subcelular de estas enzimas se ha descrito en (Metzen *et al.*, 2003) según se representa en la (Figura 22)



Figura 22. Localización subcelular de las enzimas PHD. Distribución de la expresión de las diferentes proli-hidroxilasas.

Dada la localización subcelular que muestran las PHDs y los resultados obtenidos anteriormente con los ensayos de interferencia quisimos ver si la disminución en el nivel de HIF1 α correlacionaba con la distribución de PHD1 y PHD3. Para ello realizamos un ensayo de fraccionamiento subcelular en el cual separamos el núcleo del citoplasma. Mediante Western blot analizamos los niveles de expresión de los factores HIF1 α y HIF2 α en cada uno de los compartimentos celulares. Los resultados reflejaban que tanto en la línea celular RCC4 (Figura 23A) como en RCC10 (Figura 23B) la expresión de HIF1 α como de HIF2 α es mayoritaria en el compartimento nuclear. La exposición a condiciones de hipoxia disminuía claramente la expresión de HIF1 α en el núcleo pero no afectaba a la expresión de HIF2 α , el cual se mantenía estable en estas condiciones de hipoxia en el núcleo quedando únicamente algunas trazas en el citoplasma.

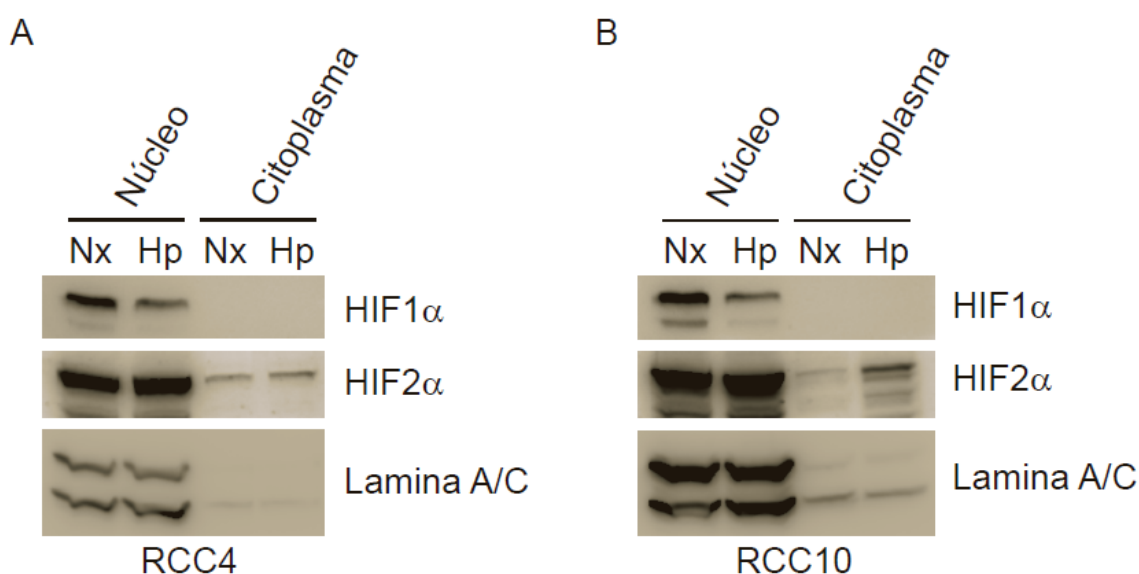


Figura 23. La expresión de HIF1 α es mayoritaria en el compartimento nuclear. Análisis por Western blot de la expresión de los factores HIF1 α y HIF2 α . (A) Fraccionamiento de núcleo y citoplasma de células RCC4 cultivadas en condiciones de normoxia o hipoxia severa (0,1% O₂) durante 24h. (B) Fraccionamiento de núcleo y citoplasma de células RCC10 cultivadas en condiciones de hipoxia severa (0,1% O₂) durante 24h. Se utiliza la proteína nuclear Lamina A/C como control de la separación núcleo/citoplasma.

Para confirmar los datos obtenidos en el ensayo de separación de los compartimentos celulares núcleo y citoplasma realizamos una inmunofluorescencia del factor HIF1 α en la línea celular RCC4 cultivadas en hipoxia durante 24h (Figura 24A). Pudimos verificar los datos obtenidos en el ensayo anterior viendo claramente la localización casi exclusiva en el compartimento nuclear de HIF1 α . Se analizaron varios campos de esta detección de HIF1 α con el software para el análisis de imágenes *ImageJ* (Figura 24B). Observamos de forma clara la disminución significativa del factor HIF1 α .

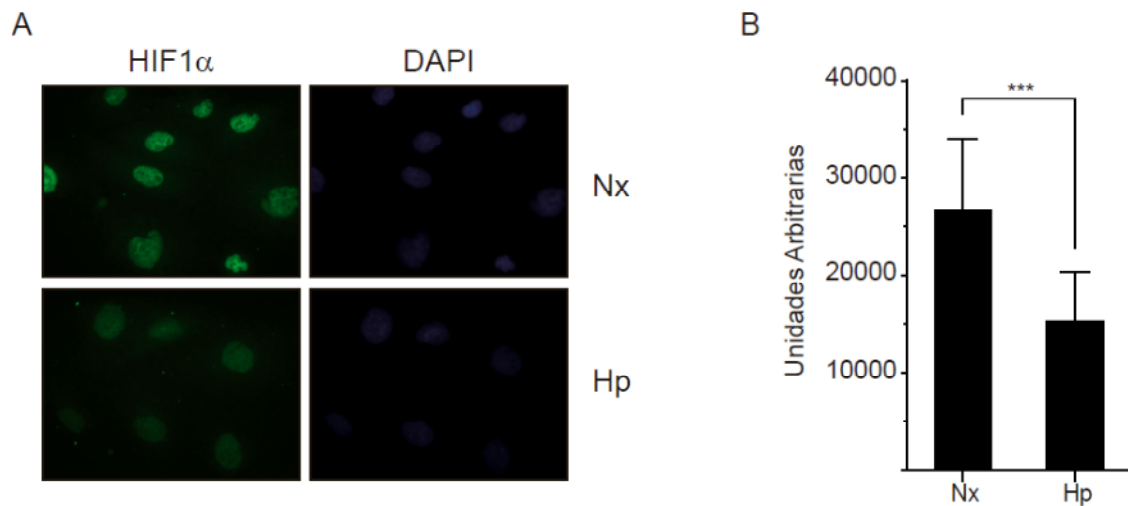


Figura 24. HIF1 α disminuye en el compartimento nuclear. (A) Inmunofluorescencia para el análisis de la expresión del factor HIF1 α en células RCC4 cultivadas en hipoxia severa (0,1% O₂). Utilizamos Dapi como control para la localización del núcleo. (B) Cuantificación de la inmunofluorescencia de HIF1 α , intensidad media de los núcleos. Las barras de error representan la desviación estándar; n=.Anova con Test de comparación múltiple de Tukey, *** p<0,001.

De esta forma pudimos concluir que la bajada de HIF1 α en condiciones de hipoxia ocurría en el compartimento nuclear y esto podía explicar los datos obtenidos en los ensayos de interferencia de las PHDs donde se pudo ver la implicación de una forma más significativa de PHD1 y PHD3 posiblemente debido a su localización subcelular.

4. Diferentes mutaciones en la proteína supresora de tumores pVHL contribuyen a mantener los niveles de HIF1 α en células de carcinoma renal RCC4 y RCC10.

Como hemos podido en nuestro modelo de estudio, la hipoxia disminuye los niveles de HIF1 α . Además, tanto la inhibición de las enzimas PHDs mediante agentes químicos como los ensayos específicos de interferencia de PHDs, implicaban la disminución de la expresión de HIF1 α . Todos estos hechos nos llevan a pensar que los niveles de hidroxilación son importantes para la estabilidad de HIF1 α en este modelo. Esta hidroxilación en HIF1 α sirve para el reconocimiento por pVHL que en condiciones normales marcaría a este factor y a HIF2 α con una poliubiquitinización para su posterior degradación por la vía del proteasoma (Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2001). En cambio en tumores de carcinoma renal de célula clara que presentan mutaciones en pVHL pueden tener afectada su capacidad para degradar HIFs causando su acumulación. Los experimentos de inhibición de las PHDs indicaban que la hidroxilación de HIF1 α era clave para su estabilidad. Dado que esta hidroxilación juega un papel fundamental en el reconocimiento de HIF1 α por pVHL quisimos analizar como afectaba la ausencia de pVHL en el mantenimiento de HIF1 α . Para ello mediante ARNs de interferencia disminuimos los niveles del ARNm de *VHL* y analizamos en condiciones de normoxia el efecto de la ausencia de pVHL sobre la expresión de HIF1 α en las líneas celulares RCC4 y RCC10 (Figura 25).

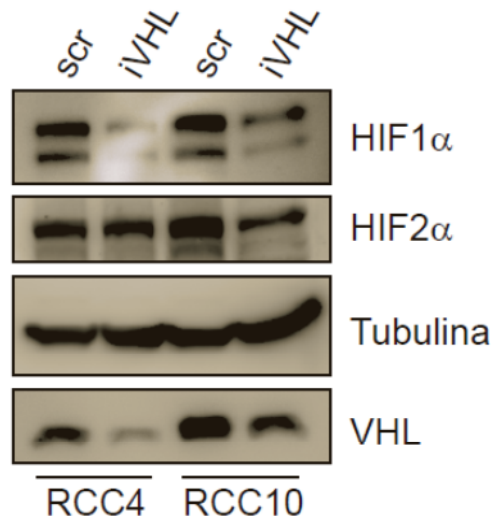


Figura 25. pVHL mutado es necesario para mantener los niveles de expresión de HIF1 α . Análisis por Western blot de la expresión de los factores HIF1 α y HIF2 α en células RCC4 y RCC10 transfectadas con ARNs de interferencia contra *VHL* y cultivadas en normoxia. Las muestras se analizaron 72h post-transfección.

Pudimos observar de forma clara como la ausencia de esta forma mutada de pVHL (pVHL_{MUT}) parecía importante para mantener la expresión del factor HIF1 α en ambas líneas celulares indicándonos la necesidad de una unión entre pVHL_{MUT} y HIF1 α hidroxilado por las enzimas PHDs para mantenimiento de este factor. Mientras tanto y como pudimos ver en figuras anteriores HIF2 α no sufría cambios significativos.

Este conjunto de datos parece abrir la puerta a un nivel de regulación de HIF1 α originado por las características adquiridas por la mutación sufrida por pVHL. Estos resultados nos hicieron pensar que pVHL podría unir HIF1 α y protegerlo de algún evento de regulación negativa.

5. HIF1 α disminuye en células de carcinoma renal por acción de la ubiquitin-ligasa SART1.

5.1 La disminución de HIF1 α es dependiente del proteasoma.

Como pudimos ver en la figura 6, la bajada de HIF1 α no implicaba una regulación a nivel del ARNm de *HIF1 α* . Además, los datos obtenidos posteriormente nos indicaban que HIF1 α estaba siendo regulado a nivel de

proteína. Se han descrito varias rutas de degradación de HIF1 α alternativas a la de pVHL (Flugel *et al.*, 2007; Koh *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2007; Luo *et al.*), todas ellas se tratan de rutas que dependen de la acción de la maquinaria del proteasoma. Para poder ver si en nuestro modelo de estudio la disminución observada de los niveles de HIF1 α implicada una degradación dependiente de proteasoma, hicimos un ensayo de inhibición de esta vía por medio del inhibidor MG132 en las líneas celulares RCC4 y RCC10 (Figura 26).

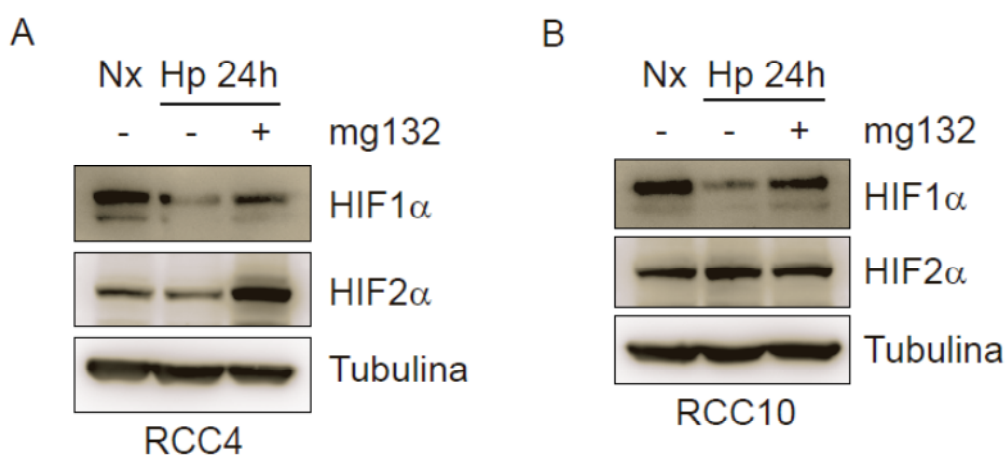


Figura 26. La degradación de HIF1 α en hipoxia es dependiente de proteasoma.. Análisis por Western blot de la expresión de los factores HIF1 α y HIF2 α . (A) RCC4 cultivadas en condiciones de normoxia o hipoxia severa (0,1% O₂) durante 24h con y sin el inhibidor mg132 (1 μ M). (B) RCC10 cultivadas en condiciones de normoxia o hipoxia severa (0,1% O₂) durante 24h con y sin el inhibidor mg132 (0,5 μ M).

Mediante este ensayo de inhibición del proteasoma pudimos observar que la disminución de HIF1 α se revertía cuando se añadía el inhibidor. Este proceso era evidente en ambas líneas celulares. Podíamos concluir que la disminución de HIF1 α causada por la hipoxia era debida a un proceso de degradación proteasoma-dependiente.

5.2 SART1 media en la degradación del factor HIF1 α .

Dado que la disminución de la expresión de HIF1 α , observada en hipoxia, parecía estar implicada la maquinaria del proteasoma, buscamos en la literatura rutas alternativas a la ruta canónica de degradación de HIF1 α . Como

podimos ver se habían descrito varias rutas de degradación alternativas a la ruta canónica. Recientemente se ha descrito una nueva E3-ubiquitin ligasa SART1 (Squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells) también llamada HAF (Hypoxia-associated Factor) que es capaz de ubiquitinar a HIF1 α de una manera independiente de los niveles de O₂ (Koh *et al.*, 2008). Además no provoca ningún efecto negativo sobre el factor HIF2 α si no que contrariamente, se ha descrito que puede potenciar la actividad transcripcional de este factor debido a su doble función sobre los factores HIF α , participando en la degradación de HIF1 α y uniéndose a los complejos de transcripción en los que está unido HIF2 α .

Quisimos ver si SART1 estaba implicada en la disminución de HIF1 α en las líneas celulares de carcinoma renal de célula clara. Para ello realizamos experimentos en los cuales mediante infecciones lentivirales con un conjunto de vectores que expresan shARNs contra el mensajero de *SART1*. Las células infectadas y seleccionadas con estas construcciones lentivirales se cultivaron en condiciones de normoxia y de hipoxia para ver si una bajada en la enzima SART1 impedía la degradación del factor HIF1 α (Figura 27).

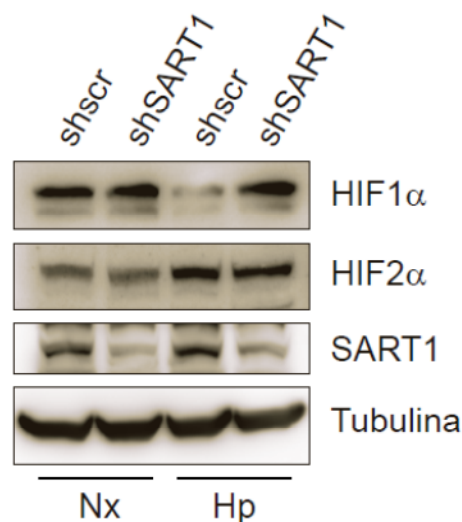


Figura 27. SART1 es necesaria para degradar el factor HIF1 α . Análisis por Western blot de la expresión de los factores HIF1 α y HIF2 α . Células RCC4 infectadas con un conjunto de 3 secuencias de shARNs contra el mensajero de *SART1* y seleccionadas con el antibiótico puromicina cultivadas en condiciones de normoxia e hipoxia severa (0,1% O₂) durante 24h.

Analizando los niveles de HIF1 α en estas condiciones pudimos ver como la ausencia o disminución en los niveles de la enzima SART1 provocaba que HIF1 α mantuviera niveles de expresión similares a los de la situación control en normoxia. En el inmunoblot podía apreciarse un aumento del factor HIF2 α . Estos aumentos no eran tan consistentes entre experimentos como la disminución de HIF1 α .

Se ha descrito en varios trabajos que HIF1 α y HIF2 α mantienen funciones opuestas en cuanto a su papel en la proliferación celular. Todos estos datos indican que HIF1 α se comporta como un represor de la proliferación celular, tanto en células primarias como en transformadas (Carmeliet *et al.*, 1998; Gardner *et al.*, 2001; Gordan *et al.*, 2007; Koshiji *et al.*, 2004; Mack *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2011), actuando por tanto como un supresor tumoral. En cambio, para HIF2 α se ha asignado, en base a estos trabajos, un papel de activador de la proliferación actuando como un oncogén (Kondo *et al.*, 2003; Maranchie *et al.*, 2002; Raval *et al.*, 2005). Para ver si en ausencia de la enzima SART1 apreciábamos cambios en la proliferación de estas células infectadas con los shARNs contra el mensajero de *SART1*, hicimos unos ensayos de proliferación mediante la tinción con el reactivo cristal violeta.

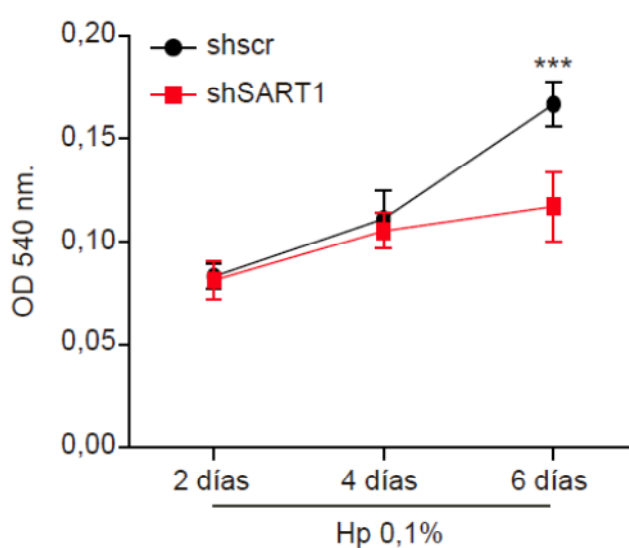


Figura 28. Ensayo de proliferación celular en células RCC4 infectadas con un conjunto de 3 secuencias de shARNs contra el mensajero de *SART1*. Cultivadas (10^3 células/pocillo mw24;

6 pocillos por condición) en condiciones de hipoxia severa (0,1% O₂) durante 2, 4 y 6 días. Análisis de la proliferación mediante tinción con Cristal Violeta midiendo la densidad óptica a 540nm en un espectrofotómetro. Las barras de error representan la desviación estándar; n=6. Anova con Test de comparación múltiple de Tukey, *** p<0,001.

Tras varios días de cultivo celular se podía observar como las células a las cuales se les había interferido el ARNm del gen *SART1* mostraban un nivel de proliferación inferior al de las células infectadas con el shRNA control (shscr) (Figura 28). Con esto podíamos concluir que la inhibición de *SART1* y posiblemente por tanto los mayores niveles de HIF1 α disminuían la proliferación celular en la línea celular RCC4.

Discusión

Con el conjunto de datos obtenidos proponemos un modelo que permite explicar la aparente contradicción de que la exposición a hipoxia de las líneas CRCC haga disminuir los niveles de expresión de HIF1 α (Figura 29). Nuestros datos estarían de acuerdo con una posible competición por HIF1 α entre la proteína supresora de tumores pVHL y la enzima ubiquitin ligasa SART1. Esta competición vendría dada por los sitios de unión que poseen ambas proteínas y la disponibilidad de estos, muy próximos en la secuencia de aminoácidos de HIF1 α .

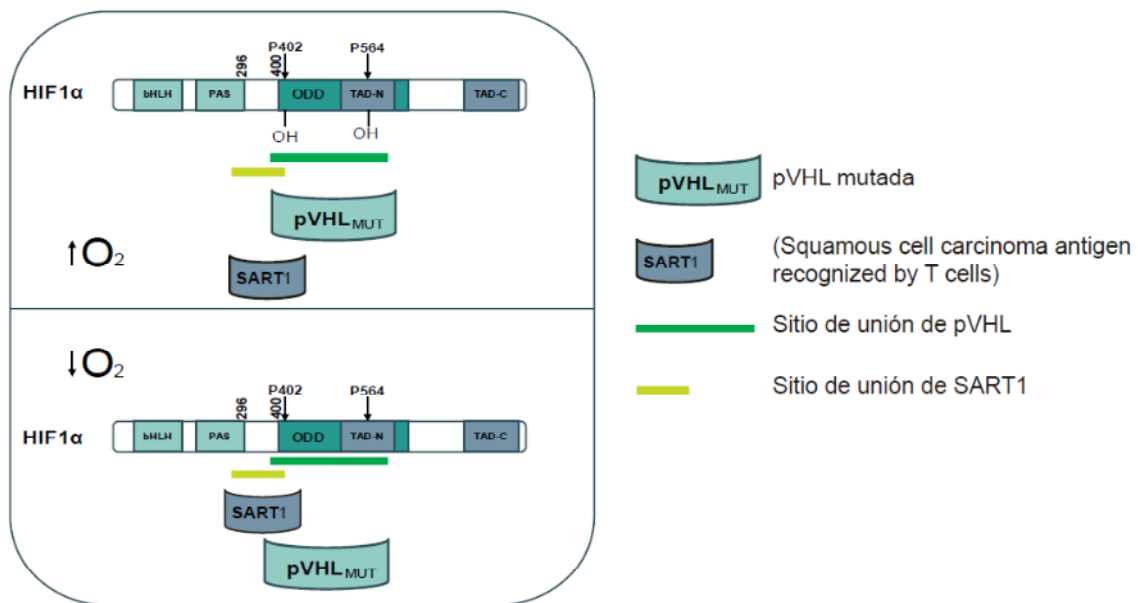


Figura 29. Modelo propuesto para la disminución de HIF1 α en CRCCs. SART1 y pVHL mutada compiten por la unión al factor HIF1 α en células de carcinoma renal de célula clara

En condiciones en las cuales la hidroxilación de HIF1 α es posible, pVHL podría estar uniéndose a HIF1 α , ocupando el sitio en el cual SART1 tendría su secuencia específica para el reconocimiento y unión a HIF1 α impidiendo de esta manera que pudiera ubiquitinar, con la consecuente degradación. Así, pVHL mutada estaría permitiendo la acumulación de HIF1 α en estas líneas celulares. En cambio, cuando la hidroxilación de HIF1 α se compromete, como ocurre en la hipoxia, pVHL mutada (pVHL_{MUT}) es incapaz de unirse a HIF1 α , liberando y haciendo accesible el sitio de unión de SART1, posibilitando la ubiquitinización de HIF1 α y degradación por la vía del proteasoma.

Tanimoto y colaboradores describieron, en el año 2000, como se podría obtener la estabilización de los factores HIF α por medio de mutaciones en

pVHL. Observaron que las mutaciones en ambos dominios de la proteína influían en la regulación de los factores HIF α , ya sea por mutación en el dominio β impidiendo la unión del sustrato a pVHL, en este caso HIF α , o por la mutación en el dominio α que dejaría a pVHL sin la posibilidad de poder unirse a ElonguinaC y con ello impidiéndole formar parte del complejo de ubiquitinización (Tanimoto *et al.*, 2000) (Figura 30).

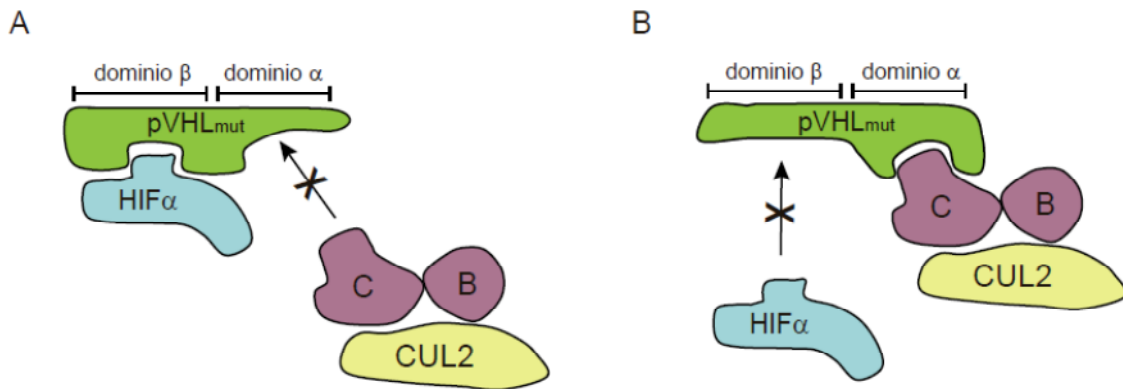


Figura 30. Mutaciones en pVHL. (A) mutaciones de pVHL que afectan a su actividad ubiquitinasa. (B) Mutaciones de pVHL que afectan a la capacidad de unir sustrato.

Las líneas celulares analizadas en este trabajo poseen mutaciones en *VHL* muy diferentes.

La línea celular RCC4, un carcinoma renal de célula clara, muestra una mutación que provoca un cambio de aminoácido, una serina por un triptófano en posición 65 (pVHL_{S65W}). La mutación, dada su localización, estaría situada en el dominio β de pVHL. Esta mutación debería hacer a la pVHL de la línea RCC4 incapaz de regular HIF α por no poder unirlos. Como hemos podido mostrar a tenor de los resultados obtenidos con nuestros experimentos en esta línea celular, RCC4 parece tener un pVHL con capacidad para unir el sustrato aun teniendo la mutación de pVHL en la posición 65 de su secuencia. La zona más importante que se ha descrito para el reconocimiento de pVHL a los factores HIF α estaría comprendida entre los aminoácidos 90 y 113. En trabajos, donde se muestran ensayos de interacción de este tipo de mutación en pVHL con los factores HIF α , se pudo observar que pVHL_{S65W} era capaz de interactuar con los factores HIF α . Además, esta forma de pVHL mostraba un déficit en la unión con ElonguinaC (Clifford *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2005).

La línea celular RCC10 mostraba una mutación en *VHL* que implicaba la delección de cuatro nucleótidos, perdiendo el aminoácido 159 (Lys) y cambiando el marco de lectura, lo que da origen a un codón de parada de la traducción prematuro en la posición 169 de la secuencia de la proteína (Krieg *et al.*, 2000). Uno de los efectos que esta delección tiene sobre las funciones de pVHL es su incapacidad para unir ElonguinaC y con ello reclutar el complejo de ubiquitinización, al carecer del un dominio α funcional. Por otro lado, posee un dominio β intacto, manteniendo la capacidad para unir los factores HIF α .

En cuanto a la línea celular A498, en este caso, también se observaría una delección de 4 nucleótidos en *VHL*, esta vez afectando a los codones 142-143, produciendo nuevamente un cambio en el marco de lectura y generando un codón de parada prematuro en la posición 157 de pVHL (Shinojima *et al.*, 2007). Todas estas mutaciones, aun siendo diferentes entre ellas muestran una característica común, la posibilidad de unir sustrato, en este caso los factores HIF α , a la vista del lugar donde presentan las mutaciones y los resultados obtenidos por nuestros experimentos. Esto nos hace pensar que probablemente las líneas celulares de CRCC con una pVHL_{MUT} que no hayan perdido la capacidad para unir los factores HIF α podrían comportarse de igual forma que las utilizadas para este trabajo.

Una de las características de los CRCC es la expresión de los factores HIF α . Esta expresión no es igual en todos los CRCC sino que se diferencian en la capacidad para poder expresar HIF1 α y HIF2 α o únicamente HIF2 α . No existen evidencias de tumores de CRCC con la expresión de HIF1 α sólo (Gordan *et al.*, 2008; Maxwell *et al.*, 1999). Otra de las características de estos tumores es la alta probabilidad de sufrir delecciones del cromosoma 14q, esta delección está asociada a una peor prognosis (Alimov *et al.*, 2004; Kaku *et al.*, 2004; Klatte *et al.*, 2009; Mitsumori *et al.*, 2002). HIF1 α , situado en el cromosoma 14q, es uno de los genes frecuentemente afectados por esta delección, no sólo en tumores renales sino también en melanomas. Aproximadamente el 45% de los tumores renales sufren esta delección del cromosoma 14q afectando prácticamente todos a la expresión de HIF1 α (Shen *et al.*, 2011). Existen por lo tanto un gran número de CRCC con la expresión potencial de HIF1 α , en la cual el mecanismo de regulación que hemos descrito

en esta tesis doctoral podría jugar un papel. Como hemos podido ver anteriormente, uno de los requisitos para mantener la expresión de HIF1 α en las líneas analizadas era que se pudiera mantener la capacidad de unión de pVHL con HIF1 α . Para contextualizar los casos de expresión o no del factor HIF1 α podríamos realizar una clasificación en base a la capacidad de pVHL de poder unir o no HIF1 α (Figura 31). Mediante esta clasificación hipotetizamos, en base a los datos obtenidos, que aquellos tumores renales (CRCC) que contengan una mutación en pVHL permisiva para unir sustrato, pero que cuya actividad para degradar HIF α se haya perdido, podrían mantener la expresión de ambos factores, HIF1 α y HIF2 α . Por otro lado, los tumores renales (CRCC) que carezcan de este tipo de pVHL, es esperable que mediante la acción de la proteína SART1 los niveles de HIF1 α sean muy inferiores, pudiendo mostrar un comportamiento parecido a aquellos tumores que han perdido HIF1 α por culpa de la delección del cromosoma 14q. Existiría también la posibilidad de que teniendo un pVHL capaz de unir HIF1 α no tengamos expresión del mismo por haber sufrido la pérdida del cromosoma 14q. En este caso, encontraríamos que sólo se produciría la expresión de HIF2 α . Por lo que atendiendo a las posibilidades de expresión de los factores HIF α mediante la posibilidad de unirse a pVHL_{MUT}, el mecanismo de regulación de HIF1 α que describimos durante el desarrollo de esta tesis doctoral, podría ponerse en funcionamiento únicamente en aquellos tumores en los cuales es posible esta interacción.

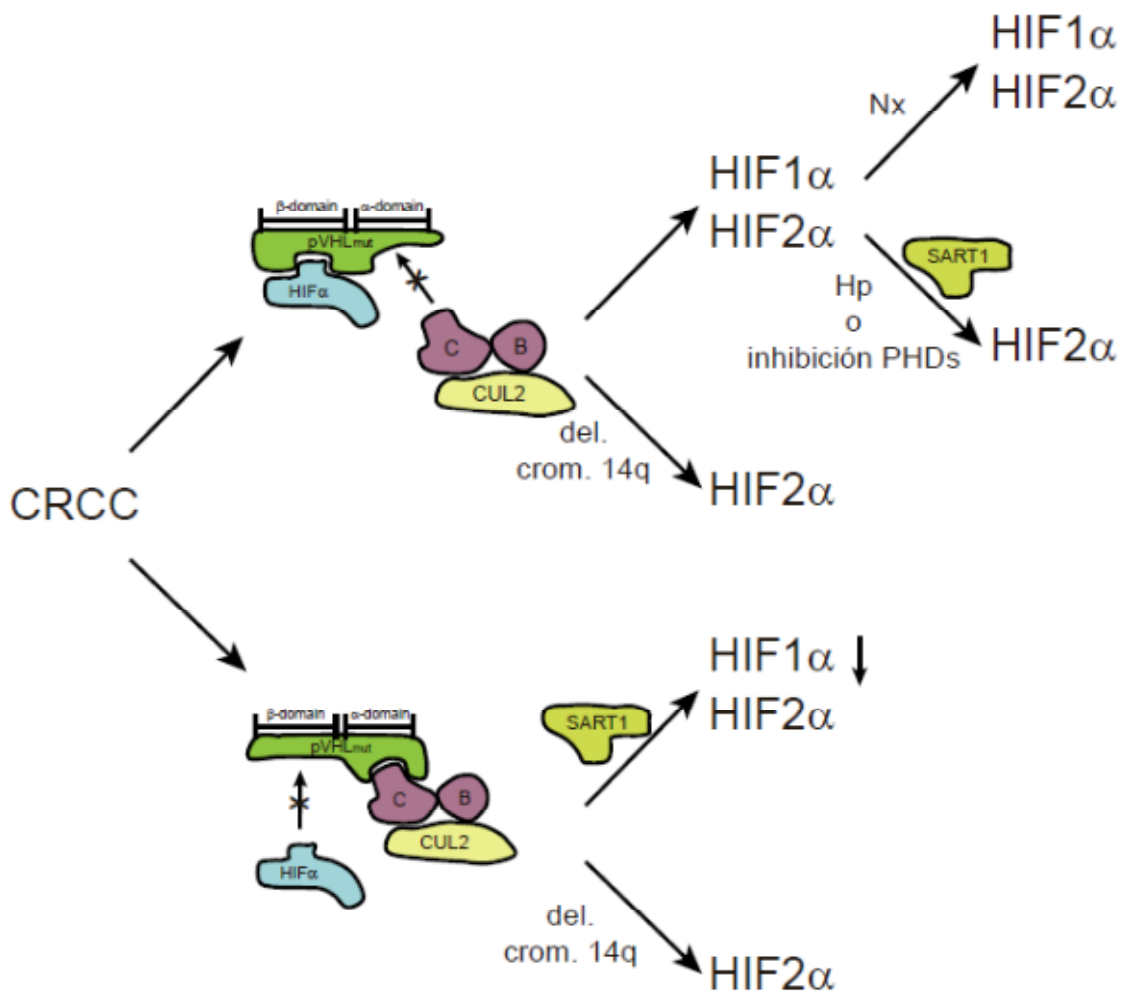


Figura 31. Clasificación de los carcinomas renales de célula clara por su pVHL_{MUT}. Mediante la capacidad de unir o no sustrato hipotetizamos el comportamiento de CRCC en la expresión de los factores HIFα indicando en cada caso cuales de estos estarían expresados.

Los CRCC se han descrito como unos tumores altamente vascularizados debido a la alta producción de factores angiogénicos como el factor VEGF (Linehan *et al.*, 2009; Patard *et al.*, 2009). En estos tumores es esperable que el aporte de O₂ esté asegurado, pero se ha podido ver que los vasos sanguíneos producidos en tumores en los cuales existe una activación crónica de la angiogénesis y un desbalance entre las diferentes señales proangiogénicas, son aberrantes. La vasculatura de esta manera se caracteriza por la aparición precoz de capilares enrevesados, con una excesiva ramificación, se produce además falta de estanqueidad con un flujo sanguíneo irregular (Baluk *et al.*, 2005; Nagy *et al.* 2010). Esto hace pensar que los

tumores de CRCC con una alta producción de factores angiogénicos podrían presentar zonas hipóxicas. Recientemente, un grupo de investigación que estudia la aplicación de diferentes tipos de sondas para la detección de hipoxia en tumores sólidos, ha visto que en tumores de CRCC aparecen focos hipóxicos (Lawrentschuk *et al.*, 2011). La aparición de estas zonas de hipoxia podría poner en marcha el mecanismo que se ha descrito en esta tesis doctoral, promoviendo una bajada en los niveles HIF1 α , manteniendo o incluso aumentando los niveles de HIF2 α , con las consecuencias que podría tener para el comportamiento del tumor.

El comportamiento que puede presentar un CRCC en base a la expresión de los factores HIF α es muy distinto. Cada vez existen más evidencias en torno a la influencia de la expresión de HIF1 α y HIF2 α para el desarrollo de los CRCC. Para el desarrollo de los CRCC el papel del factor HIF2 α es fundamental. Se ha podido ver que la expresión de HIF2 α es necesaria y suficiente para el crecimiento de líneas celulares CRCC transformadas pero no la expresión de HIF1 α (Kondo *et al.*, 2003; Kondo *et al.*, 2002; Maranchie *et al.*, 2002; Zimmer *et al.*, 2004). A HIF2 α se le ha atribuido el papel de oncoproteína, ya que no existen evidencias de CRCC sin la expresión de este factor. Cuando se elimina la expresión de HIF2 α en CRCC con pVHL_{MUT}, se suprime su capacidad para formar tumores en ratones *nude* (Kondo *et al.*, 2003; Zimmer *et al.*, 2004). De forma contraria la sobreexpresión de HIF2 α , pero no de HIF1 α en líneas en las cuales se ha restaurado un pVHL funcional, podía anular la función supresora de tumores de pVHL en ensayos de xenotransplante (Kondo *et al.*, 2002; Maranchie *et al.*, 2002; Raval *et al.*, 2005). Además, recientemente se ha descrito un mecanismo por el cual HIF2 α puede promover un aumento en la proliferación celular al inducir el transportador de aminoácidos SLC7A5 que conllevaba un aumento en la actividad del regulador de la síntesis proteica mTORC1 (Elorza *et al.*, 2012). En cambio, al factor HIF1 α se le asocia con un papel de supresión tumoral. La sobreexpresión de HIF1 α se ha podido observar en otros tipos de cáncer (Zhong *et al.*, 1999). En cáncer de cérvix y de pecho la sobreexpresión de HIF1 α está asociada con un pronóstico desfavorable (Birner *et al.*, 2000; Schindl *et al.*, 2002), mientras que en cáncer de pulmón se pudo observar una asociación favorable (Volm and Koomagi, 2000). Para los CRCC

se ha podido observar que el aumento en la expresión de HIF1 α sería un factor de pronóstico favorable (Lidgren *et al.*, 2005). El gen *HIF1 α* reside en el cromosoma 14q y como hemos podido ver anteriormente se encuentra frecuentemente deletado en CRCC (Shen *et al.*, 2011). La pérdida de cromosoma 14q está asociada a un pronóstico desfavorable (Klatte *et al.*, 2009). Estudios funcionales tanto *in vitro* como *in vivo* mostraron que la sobreexpresión de HIF1 α en células con una pVHL normal frenaba el crecimiento del tumor mientras que la supresión de HIF1 α en células deficientes para pVHL aumentaba el crecimiento (Biswas *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2011). El contraste en las funciones de ambos factores puede estar sustentado en el papel que juegan en cuanto a su interacción con c-Myc, aunque también por otras razones antes descritas. HIF1 α estaría suprimiendo la actividad c-Myc, en cambio HIF2 α estaría promoviendo la transactivación o transrepresión de genes específicos de c-Myc (Gordan *et al.*, 2007; Gordan *et al.*, 2008; Gordan and Simon, 2007). Dada la diferencia de funciones entre los factores HIF α y la importancia que tiene para estos tumores la presencia de HIF1 α , la ausencia provocada en zonas hipóxicas del tumor de HIF1 α , por acción de la proteína SART1, podría provocar un aumento en la malignidad de manera local, haciendo que el comportamiento, de las células que sufren esta regulación, en cuanto a crecimiento aumente por la expresión únicamente del factor HIF2 α .

Aunque nuestros resultados se han centrado más en situaciones donde la carencia de O₂ es patente, pudimos ver que no sólo la hipoxia podía desencadenar el mecanismo de regulación propuesto. La inhibición de las enzimas PHDs por medio de compuestos químicos, tales como el DMOG o la Dfo, también desencadenaba el mecanismo descrito, puesto que lo que se pudo concluir es que la hidroxilación de HIF1 α era importante para su expresión en las líneas analizadas. Existen mecanismos por los cuales se podría obtener la inhibición de las enzimas PHDs independientemente de las tensiones de O₂. La actividad PHD puede inhibirse por óxido nítrico (NO) y por los niveles disponibles de Fe (II) (Metzen *et al.*, 2003), especies reactivas de O₂ (Pan *et al.*, 2007), y por intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) (Selak *et al.*, 2005).

El mecanismo descrito en esta tesis podría dar una explicación al efecto observado por algunos trabajos en los cuales se podía observar como la regulación de uno de los factores HIF α influye en los niveles del otro, de forma opuesta (Raval *et al.*, 2005). Una sobreexpresión del factor HIF2 α provocaba una bajada de HIF1 α en células RCC4, sin que los ARNm sufrieran cambios. Nuestro modelo podría proponer que un aumento en los niveles de HIF2 α en esta línea celular, al no perder pVHL_{S65W} su capacidad para unir HIFs, estaría unido principalmente a este HIF2 α dejando libre a HIF1 α para que la proteína SART1 pueda actuar sobre ella. Por otro lado la sobreexpresión de HIF1 α tenía efectos negativos sobre los niveles de HIF2 α aunque de menor intensidad en la línea celular 786-0, la cual carece de un pVHL con capacidad de unir HIFs, posiblemente por la actuación de la doble función de SART1 degradando HIF1 α y uniéndose a los complejos de transcripción mediados por HIF2 α . SART1 podría estar en este caso uniendo principalmente HIF1 α , al ser mayoritario dejando de unirse a los complejos de transcripción vía HIF2 α disminuyendo así la vida media de este factor. Por lo que la competición que podíamos observar para pVHL_{MUT} y SART1 por la unión a HIF1 α pueda ampliarse al factor HIF2 α por la unión tanto a pVHL_{MUT} como a SART1.

El mecanismo descrito en esta tesis doctoral, dada la importancia que tiene la expresión de HIF1 α para la supervivencia de pacientes con CRCC, abre la posibilidad de realizar estudios más exhaustivos para encontrar moléculas inhibitoras de SART1 para que con ello se impida bajar los niveles de HIF1 α en aquellos tumores en los cuales este mecanismo sea operativo y puesto que SART1 muestra una doble función con respecto a los factores HIF α , la inhibición de SART1 podría contribuir de igual manera a una menor expresión de los genes dependientes de HIF2 α .

Conclusiones

1. El estímulo hipóxico regula negativamente los niveles de proteína del factor HIF1 α pero no de HIF2 α en líneas celulares de carcinoma renal de célula clara (CRCC).
2. Para mantener los niveles de HIF1 α en células de CRCC es necesaria la actividad de las enzimas proliil-hidroxilasas, 1 y 3 principalmente, para mantener los niveles de hidroxilación en HIF1 α .
3. HIF1 α disminuye principalmente dada su localización subcelular en el compartimento nuclear.
4. La proteína pVHL expresada por las líneas celulares de CRCC, RCC4 y RCC10, es esencial para el mantenimiento de los niveles de HIF1 α .
5. La disminución en los niveles de proteína de HIF1 α en CRCC, mediante la exposición a condiciones de hipoxia, se produce por un mecanismo dependiente del proteasoma.
6. La proteína ubiquitín-ligasa SART1 media en la degradación de HIF1 α bajo condiciones de hipoxia en células de CRCC.
7. Prevenir la degradación de HIF1 α mediante la inhibición de SART1, podría utilizarse terapéuticamente para disminuir la proliferación de células de CRCC expuestas a tensiones de O₂ bajas.

Bibliografía

Alimov A, Sundelin B, Wang N, Larsson C, Bergerheim U (2004). Loss of 14q31-q32.2 in renal cell carcinoma is associated with high malignancy grade and poor survival. *Int J Oncol* **25**: 179-85.

An J, Rettig MB (2005). Mechanism of von Hippel-Lindau protein-mediated suppression of nuclear factor kappa B activity. *Mol Cell Biol* **25**: 7546-56.

An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV, Neckers LM (1998). Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature* **392**: 405-8.

Aragones J, Fraisl P, Baes M, Carmeliet P (2009). Oxygen sensors at the crossroad of metabolism. *Cell Metab* **9**: 11-22.

Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA *et al* (1996). An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 12969-73.

Baluk P, Hashizume H, McDonald DM (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* **15**: 102-11.

Banks RE, Tirukonda P, Taylor C, Hornigold N, Astuti D, Cohen D *et al* (2006). Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer. *Cancer Res* **66**: 2000-11.

Beroukhim R, Brunet JP, Di Napoli A, Mertz KD, Seeley A, Pires MM *et al* (2009). Patterns of gene expression and copy-number alterations in von-hippel lindau disease-associated and sporadic clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res* **69**: 4674-81.

Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J* **22**: 4082-90.

Berra E, Milanini J, Richard DE, Le Gall M, Vinals F, Gothie E *et al* (2000). Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem Pharmacol* **60**: 1171-8.

Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G (2000). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* **60**: 4693-6.

Biswas S, Troy H, Leek R, Chung YL, Li JL, Raval RR *et al* (2010). Effects of HIF-1alpha and HIF2alpha on Growth and Metabolism of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma 786-0 Xenografts. *J Oncol* **2010**: 757908.

Bjornsson J, Short MP, Kwiatkowski DJ, Henske EP (1996). Tuberous sclerosis-associated renal cell carcinoma. Clinical, pathological, and genetic features. *Am J Pathol* **149**: 1201-8.

Blankenship C, Naglich JG, Whaley JM, Seizinger B, Kley N (1999). Alternate choice of initiation codon produces a biologically active product of the von Hippel Lindau gene with tumor suppressor activity. *Oncogene* **18**: 1529-35.

Blouin CC, Page EL, Soucy GM, Richard DE (2004). Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood* **103**: 1124-30.

Bruick RK, McKnight SL (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **294**: 1337-40.

Calzada MJ (2010). Von Hippel-Lindau syndrome: molecular mechanisms of the disease. *Clin Transl Oncol* **12**: 160-5.

Calzada MJ, del Peso L (2007). Hypoxia-inducible factors and cancer. *Clin Transl Oncol* **9**: 278-89.

Campisi J, d'Adda di Fagagna F (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 729-40.

Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M *et al* (1998). Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* **394**: 485-90.

Chen F, Kishida T, Yao M, Hustad T, Glavac D, Dean M *et al* (1995). Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype. *Hum Mutat* **5**: 66-75.

Clifford SC, Cockman ME, Smallwood AC, Mole DR, Woodward ER, Maxwell PH *et al* (2001). Contrasting effects on HIF-1alpha regulation by disease-causing pVHL mutations correlate with patterns of tumourigenesis in von Hippel-Lindau disease. *Hum Mol Genet* **10**: 1029-38.

Collins ET (1894). Intra-ocular growths (two cases, brother and sister, with peculiar vascular new growth, probably retinal, affecting both eyes). *Trans Ophthalmol Soc U K.* **14**: 141-149.

Dayan F, Roux D, Brahim-Horn MC, Pouyssegur J, Mazure NM (2006). The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cancer Res* **66**: 3688-98.

Denko NC (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* **8**: 705-13.

Duan DR, Humphrey JS, Chen DY, Weng Y, Sukegawa J, Lee S *et al* (1995). Characterization of the VHL tumor suppressor gene product: localization, complex formation, and the effect of natural inactivating mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 6459-63.

Ehrismann D, Flashman E, Genn DN, Mathioudakis N, Hewitson KS, Ratcliffe PJ *et al* (2007). Studies on the activity of the hypoxia-inducible-factor hydroxylases using an oxygen consumption assay. *Biochem J* **401**: 227-34.

Elorza A, Soro-Arnaiz I, Melendez-Rodriguez F, Rodriguez-Vaello V, Marsboom G, de Carcer G *et al* (2012). HIF2alpha acts as an mTORC1 activator through the amino acid carrier SLC7A5. *Mol Cell* **48**: 681-91.

Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K *et al* (1999). Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J* **18**: 1905-14.

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR *et al* (2001). *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* **107**: 43-54.

Flugel D, Gorlach A, Michiels C, Kietzmann T (2007). Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Mol Cell Biol* **27**: 3253-65.

Freeburg PB, Abrahamson DR (2004). Divergent expression patterns for hypoxia-inducible factor-1beta and aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter-2 in developing kidney. *J Am Soc Nephrol* **15**: 2569-78.

Gardner LB, Li Q, Park MS, Flanagan WM, Semenza GL, Dang CV (2001). Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. *J Biol Chem* **276**: 7919-26.

Gnarra JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H *et al* (1994). Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* **7**: 85-90.

Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC (2007). HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell* **11**: 335-47.

Gordan JD, Lal P, Dondeti VR, Letrero R, Parekh KN, Oquendo CE *et al* (2008). HIF-alpha effects on c-Myc distinguish two subtypes of sporadic VHL-deficient clear cell renal carcinoma. *Cancer Cell* **14**: 435-46.

Gordan JD, Simon MC (2007). Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev* **17**: 71-7.

Gorlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, Berchner-Pfannschmidt U, Roth U, Brandes RP *et al* (2001). Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1

signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res* **89**: 47-54.

Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA (1998). Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr* **7**: 205-13.

Gupta M, Mungai PT, Goldwasser E (2000). A new transacting factor that modulates hypoxia-induced expression of the erythropoietin gene. *Blood* **96**: 491-7.

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.

Hes FJ, Hoppener JW, Luijt RB, Lips CJ (2005). Von hippel-lindau disease. *Hered Cancer Clin Pract* **3**: 171-8.

Hewitson KS, McNeill LA, Riordan MV, Tian YM, Bullock AN, Welford RW *et al* (2002). Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem* **277**: 26351-5.

Hippel Ev (1904). Ueber eine sehr seltene erkrankung der nethaut. *Graefe Arch Ophthalmol* **59**: 83-106.

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**: 1019-27.

Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG, Jr. (1995). Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat Med* **1**: 822-6.

Iliopoulos O, Ohh M, Kaelin WG, Jr. (1998). pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 11661-6.

Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M *et al* (2001). HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292**: 464-8.

Iwai K, Yamanaka K, Kamura T, Minato N, Conaway RC, Conaway JW *et al* (1999). Identification of the von Hippel-lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 12436-41.

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ *et al* (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**: 468-72.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E (2010). Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* **60**: 277-300.

Jiang Y, Zhang W, Kondo K, Klco JM, St Martin TB, Dufault MR *et al* (2003). Gene expression profiling in a renal cell carcinoma cell line: dissecting VHL and hypoxia-dependent pathways. *Mol Cancer Res* **1**: 453-62.

Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Neckers L (2003). IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J* **17**: 2115-7.

Kaelin WG, Jr. (2007). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res* **13**: 680s-684s.

Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* **30**: 393-402.

Kaku H, Ito S, Ebara S, Ouchida M, Nasu Y, Tsushima T *et al* (2004). Positive correlation between allelic loss at chromosome 14q24-31 and poor prognosis of patients with renal cell carcinoma. *Urology* **64**: 176-81.

Kamura T, Conrad MN, Yan Q, Conaway RC, Conaway JW (1999). The Rbx1 subunit of SCF and VHL E3 ubiquitin ligase activates Rub1 modification of cullins Cdc53 and Cul2. *Genes Dev* **13**: 2928-33.

Kessler PM, Vasavada SP, Rackley RR, Stackhouse T, Duh FM, Latif F *et al* (1995). Expression of the Von Hippel-Lindau tumor suppressor gene, VHL, in human fetal kidney and during mouse embryogenesis. *Mol Med* **1**: 457-66.

Kibel A, Iliopoulos O, DeCaprio JA, Kaelin WG, Jr. (1995). Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C. *Science* **269**: 1444-6.

Kim WY, Kaelin WG (2004). Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* **22**: 4991-5004.

Kim WY, Sharpless NE (2008). VHL inactivation: a new road to senescence. *Cancer Cell* **13**: 295-7.

Klatte T, Rao PN, de Martino M, LaRochelle J, Shuch B, Zomorodian N *et al* (2009). Cytogenetic profile predicts prognosis of patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* **27**: 746-53.

Koh MY, Darnay BG, Powis G (2008). Hypoxia-associated factor, a novel E3-ubiquitin ligase, binds and ubiquitinates hypoxia-inducible factor 1alpha, leading to its oxygen-independent degradation. *Mol Cell Biol* **28**: 7081-95.

Koh MY, Lemos R, Jr., Liu X, Powis G (2011). The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1alpha- to HIF-2alpha-dependent signaling promoting

stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res* **71**: 4015-27.

Koivunen P, Tiainen P, Hyvarinen J, Williams KE, Sormunen R, Klaus SJ *et al* (2007). An endoplasmic reticulum transmembrane prolyl 4-hydroxylase is induced by hypoxia and acts on hypoxia-inducible factor alpha. *J Biol Chem* **282**: 30544-52.

Kondo K, Kim WY, Lechpammer M, Kaelin WG, Jr. (2003). Inhibition of HIF2alpha is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. *PLoS Biol* **1**: E83.

Kondo K, Klco J, Nakamura E, Lechpammer M, Kaelin WG, Jr. (2002). Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell* **1**: 237-46.

Koochekpour S, Jeffers M, Wang PH, Gong C, Taylor GA, Roessler LM *et al* (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**: 5902-12.

Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, Horikawa I, Barrett JC, Huang LE (2004). HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J* **23**: 1949-56.

Krieg M, Haas R, Brauch H, Acker T, Flamme I, Plate KH (2000). Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene* **19**: 5435-43.

Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* **16**: 1466-71.

Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML *et al* (1993). Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* **260**: 1317-20.

Lawrentschuk N, Lee FT, Jones G, Rigopoulos A, Mountain A, O'Keefe G *et al* (2011). Investigation of hypoxia and carbonic anhydrase IX expression in a renal cell carcinoma xenograft model with oxygen tension measurements and (1)(2)(4)-cG250 PET/CT. *Urol Oncol* **29**: 411-20.

Lee S, Chen DY, Humphrey JS, Gnarr JR, Linehan WM, Klausner RD (1996). Nuclear/cytoplasmic localization of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product is determined by cell density. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 1770-5.

Lee S, Neumann M, Stearman R, Stauber R, Pause A, Pavlakakis GN *et al* (1999). Transcription-dependent nuclear-cytoplasmic trafficking is required for

the function of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol* **19**: 1486-97.

Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K, Rasmuson T, Vasko J, Ljungberg B (2005). The expression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a favorable independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **11**: 1129-35.

Lindau A (1927). Zur frage der angiomatosis retinai und ihrer hirnkompliation. *Acta Ophthalmol* **4**: 193-226.

Linehan WM, Pinto PA, Bratslavsky G, Pfaffenroth E, Merino M, Vocke CD *et al* (2009). Hereditary kidney cancer: unique opportunity for disease-based therapy. *Cancer* **115**: 2252-61.

Linehan WM, Walther MM, Zbar B (2003). The genetic basis of cancer of the kidney. *J Urol* **170**: 2163-72.

Lisztwan J, Imbert G, Wirbelauer C, Gstaiger M, Krek W (1999). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev* **13**: 1822-33.

Liu YV, Baek JH, Zhang H, Diez R, Cole RN, Semenza GL (2007). RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Mol Cell* **25**: 207-17.

Luo W, Zhong J, Chang R, Hu H, Pandey A, Semenza GL (2009). Hsp70 and CHIP selectively mediate ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha but Not HIF-2alpha. *J Biol Chem* **285**: 3651-63.

Mack FA, Patel JH, Biju MP, Haase VH, Simon MC (2005). Decreased growth of Vhl-/- fibrosarcomas is associated with elevated levels of cyclin kinase inhibitors p21 and p27. *Mol Cell Biol* **25**: 4565-78.

Maher ER, Iselius L, Yates JR, Littler M, Benjamin C, Harris R *et al* (1991). Von Hippel-Lindau disease: a genetic study. *J Med Genet* **28**: 443-7.

Maher ER, Neumann HP, Richard S (2011). von Hippel-Lindau disease: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet* **19**: 617-23.

Mahon PC, Hirota K, Semenza GL (2001). FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* **15**: 2675-86.

Makarova OV, Makarov EM, Luhrmann R (2001). The 65 and 110 kDa SR-related proteins of the U4/U6.U5 tri-snRNP are essential for the assembly of mature spliceosomes. *EMBO J* **20**: 2553-63.

Maranchie JK, Vasselli JR, Riss J, Bonifacino JS, Linehan WM, Klausner RD (2002). The contribution of VHL substrate binding and HIF1-alpha to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. *Cancer Cell* **1**: 247-55.

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME *et al* (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**: 271-5.

Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M *et al* (2003). Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* **116**: 1319-26.

Miller F, Kentsis A, Osman R, Pan ZQ (2005). Inactivation of VHL by tumorigenic mutations that disrupt dynamic coupling of the pVHL-hypoxia-inducible transcription factor-1alpha complex. *J Biol Chem* **280**: 7985-96.

Mitsumori K, Kittleson JM, Itoh N, Delahunt B, Heathcott RW, Stewart JH *et al* (2002). Chromosome 14q LOH in localized clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol* **198**: 110-4.

Nagy JA, Chang SH, Shih SC, Dvorak AM, Dvorak HF (2010). Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost* **36**: 321-31.

Nickerson ML, Warren MB, Toro JR, Matrosova V, Glenn G, Turner ML *et al* (2002). Mutations in a novel gene lead to kidney tumors, lung wall defects, and benign tumors of the hair follicle in patients with the Birt-Hogg-Dube syndrome. *Cancer Cell* **2**: 157-64.

Ohh M, Yauch RL, Lonergan KM, Whaley JM, Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN *et al* (1998). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol Cell* **1**: 959-68.

Oya M, Ohtsubo M, Takayanagi A, Tachibana M, Shimizu N, Murai M (2001). Constitutive activation of nuclear factor-kappaB prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells. *Oncogene* **20**: 3888-96.

Page EL, Chan DA, Giaccia AJ, Levine M, Richard DE (2008). Hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization in nonhypoxic conditions: role of oxidation and intracellular ascorbate depletion. *Mol Biol Cell* **19**: 86-94.

Page EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE (2002). Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem* **277**: 48403-9.

Pan Y, Mansfield KD, Bertozzi CC, Rudenko V, Chan DA, Giaccia AJ *et al* (2007). Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* **27**: 912-25.

Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* **3**: 187-97.

Patard JJ, Rioux-Leclercq N, Masson D, Zerrouki S, Jouan F, Collet N *et al* (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**: 1417-24.

Pause A, Lee S, Worrell RA, Chen DY, Burgess WH, Linehan WM *et al* (1997). The von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene product forms a stable complex with human CUL-2, a member of the Cdc53 family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2156-61.

Pavlovich CP, Schmidt LS (2004). Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer* **4**: 381-93.

Pavlovich CP, Walther MM, Eyer RA, Hewitt SM, Zbar B, Linehan WM *et al* (2002). Renal tumors in the Birt-Hogg-Dube syndrome. *Am J Surg Pathol* **26**: 1542-52.

Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL *et al* (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol* **25**: 5675-86.

Richard S, Gardie B, Couve S, Gad S (2012). Von Hippel-Lindau: how a rare disease illuminates cancer biology. *Semin Cancer Biol* **23**: 26-37.

Richards FM (2001). Molecular pathology of von Hippel-Lindau disease and the VHL tumour suppressor gene. *Expert Rev Mol Med* **2001**: 1-27.

Richards FM, Schofield PN, Fleming S, Maher ER (1996). Expression of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene during human embryogenesis. *Hum Mol Genet* **5**: 639-44.

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.

Russell RC, Ohh M (2008). NEDD8 acts as a 'molecular switch' defining the functional selectivity of VHL. *EMBO Rep* **9**: 486-91.

Salmena L, Pandolfi PP (2007). Changing venues for tumour suppression: balancing destruction and localization by monoubiquitylation. *Nat Rev Cancer* **7**: 409-13.

Sanchez-Puig N, Veprintsev DB, Fersht AR (2005). Binding of natively unfolded HIF-1 α ODD domain to p53. *Mol Cell* **17**: 11-21.

Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwasny W, Gnant M *et al* (2002). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is associated

with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* **8**: 1831-7.

Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P *et al* (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* **16**: 68-73.

Schoenfeld A, Davidowitz EJ, Burk RD (1998). A second major native von Hippel-Lindau gene product, initiated from an internal translation start site, functions as a tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 8817-22.

Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ, Lane AH, Farmer GE, Lamiell JM *et al* (1988). Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature* **332**: 268-9.

Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD *et al* (2005). Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* **7**: 77-85.

Semenza GL (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**: 721-32.

Sendoel A, Kohler I, Fellmann C, Lowe SW, Hengartner MO (2010). HIF-1 antagonizes p53-mediated apoptosis through a secreted neuronal tyrosinase. *Nature* **465**: 577-83.

Shen C, Beroukhim R, Schumacher SE, Zhou J, Chang M, Signoretti S *et al* (2011). Genetic and functional studies implicate HIF1alpha as a 14q kidney cancer suppressor gene. *Cancer Discov* **1**: 222-35.

Shen C, Kaelin WG, Jr. (2012). The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Semin Cancer Biol* **23**: 18-25.

Shichijo S, Nakao M, Imai Y, Takasu H, Kawamoto M, Niiya F *et al* (1998). A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **187**: 277-88.

Shinojima T, Oya M, Takayanagi A, Mizuno R, Shimizu N, Murai M (2007). Renal cancer cells lacking hypoxia inducible factor (HIF)-1alpha expression maintain vascular endothelial growth factor expression through HIF-2alpha. *Carcinogenesis* **28**: 529-36.

Singla V, Reiter JF (2006). The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* **313**: 629-33.

Stebbins CE, Kaelin WG, Jr., Pavletich NP (1999). Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science* **284**: 455-61.

Stickle NH, Chung J, Klco JM, Hill RP, Kaelin WG, Jr., Ohh M (2004). pVHL modification by NEDD8 is required for fibronectin matrix assembly and suppression of tumor development. *Mol Cell Biol* **24**: 3251-61.

Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L (2000). Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J* **19**: 4298-309.

Tian H, McKnight SL, Russell DW (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* **11**: 72-82.

Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, Barclay E, Jaeger EE, Kelsell D *et al* (2002). Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet* **30**: 406-10.

Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 285-93.

Vanharanta S, Buchta M, McWhinney SR, Virta SK, Peczkowska M, Morrison CD *et al* (2004). Early-onset renal cell carcinoma as a novel extraparaganglial component of SDHB-associated heritable paraganglioma. *Am J Hum Genet* **74**: 153-9.

Vertegaal AC, Ogg SC, Jaffray E, Rodriguez MS, Hay RT, Andersen JS *et al* (2004). A proteomic study of SUMO-2 target proteins. *J Biol Chem* **279**: 33791-8.

Volm M, Koomagi R (2000). Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res* **20**: 1527-33.

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**: 5510-4.

Ward JP (2008). Oxygen sensors in context. *Biochim Biophys Acta* **1777**: 1-14.

Yang H, Minamishima YA, Yan Q, Schlisio S, Ebert BL, Zhang X *et al* (2007). pVHL acts as an adaptor to promote the inhibitory phosphorylation of the NF-kappaB agonist Card9 by CK2. *Mol Cell* **28**: 15-27.

Ye Y, Vasavada S, Kuzmin I, Stackhouse T, Zbar B, Williams BR (1998). Subcellular localization of the von Hippel-Lindau disease gene product is cell cycle-dependent. *Int J Cancer* **78**: 62-9.

Young AP, Schlisio S, Minamishima YA, Zhang Q, Li L, Grisanzio C *et al* (2008). VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nat Cell Biol* **10**: 361-9.

Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS (2001). HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9630-5.

Zbar B, Brauch H, Talmadge C, Linehan M (1987). Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Nature* **327**: 721-4.

Zbar B, Kishida T, Chen F, Schmidt L, Maher ER, Richards FM *et al* (1996). Germline mutations in the Von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in families from North America, Europe, and Japan. *Hum Mutat* **8**: 348-57.

Zbar B, Klausner R, Linehan WM (2003). Studying cancer families to identify kidney cancer genes. *Annu Rev Med* **54**: 217-33.

Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B (1998). Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. *EMBO J* **17**: 5085-94.

Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM *et al* (2000). Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* **60**: 1541-5.

Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D *et al* (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* **59**: 5830-5.

Zhou J, Schmid T, Brune B (2003). Tumor necrosis factor-alpha causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1alpha through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *Mol Biol Cell* **14**: 2216-25.

Zimmer M, Doucette D, Siddiqui N, Iliopoulos O (2004). Inhibition of hypoxia-inducible factor is sufficient for growth suppression of VHL-/- tumors. *Mol Cancer Res* **2**: 89-95.

Anexo I

El Trabajo presentado en esta tesis doctoral se haya fundamentalmente descrito en el manuscrito (en estos momentos en revisión en revista internacional).

Ángel Ordóñez-Navadijo, Esther Fuertes-Yebra, Bárbara Acosta-Iborra, Eduardo Balsa, Julián Aragonés, Manuel O. Landazuri.” **Mutant versions of von Hippel-lindau (VHL) can protect HIF1 α from SART1-mediated degradation in clear cell renal cell carcinoma.** (En revisión).

